

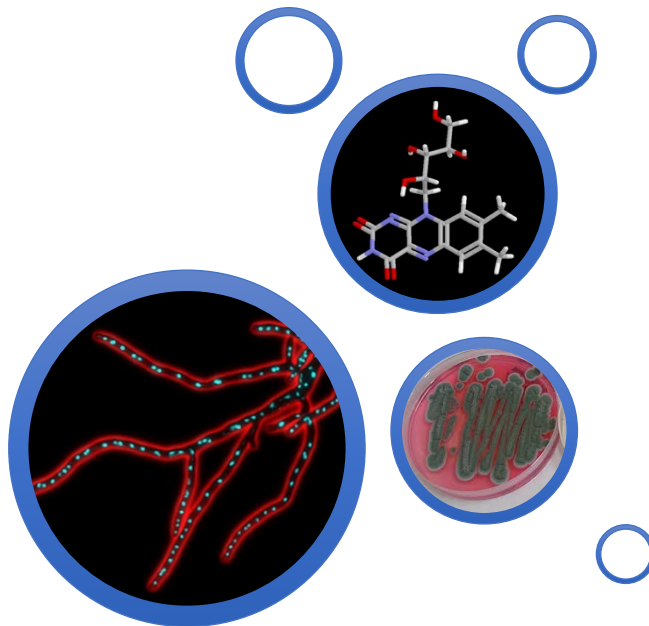


**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**  
**Grado en Biotecnología**



**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**Curso académico: 2019-2020**

**Biosíntesis de riboflavina a partir de aislados eucariotas  
procedentes del compostaje de residuos lignocelulósicos  
empleando sustratos residuales**



**Autora: Celia López Ortega**  
**Director: José Joaquín Moreno Casco**  
**Codirector: Juan Antonio López González**  
**Departamento de Biología y Geología**  
**Área de Microbiología**

## Índice

Resumen.....	4
Abstract.....	5
I. Introducción.....	6
1. Producción microbiana de vitaminas.....	6
A. Características de la producción microbiana de vitaminas.....	6
B. Riboflavina (Vitamina B <sub>2</sub> ), características e interés.....	9
2. <i>Ashbya gossypii</i> como agente de interés biotecnológico.....	11
A. Producción de riboflavina.....	11
B. Producción de otras sustancias de valor añadido.....	12
3. Producción fúngica de vitaminas a partir de sustratos residuales.....	14
A. Aplicaciones de la microbiota fúngica presente en compostaje.....	15
II. Objetivos.....	17
III. Materiales y Metodología.....	18
1. Microorganismos del ensayo.....	18
2. Medios de cultivo y sustratos residuales.....	20
3. Diseño experimental.....	22
4. Condiciones de la biosíntesis.....	24
5. Determinación de la producción de riboflavina y la biomasa fúngica.....	24
IV. Resultados y discusión.....	26
1. Producción de riboflavina sobre el medio de cultivo óptimo.....	27
2. Producción de riboflavina sobre medios de cultivo con sustratos residuales.....	35
V. Conclusiones.....	37
VI. Bibliografía.....	38

## **Agradecimientos**

Tras 8 meses trabajando en este Trabajo Final de Grado, lo primero que quiero hacer es agradecer a todas las personas que componen el laboratorio del departamento de Microbiología de la Universidad de Almería su acogida. Siempre recordaré el día en el que todas las personas que había allí trabajando dejaron de hacer todo lo que estaban haciendo para ayudarme a encontrar un compuesto que se me había perdido, y solo era una alumna recién llegada que quería hacer su TFG aprendiendo de ellos y con ellos. Eso habla mucho de la calidad de las personas que trabajan allí.

Quiero hacer una mención especial para mis dos Tutores: Joaquín y Juan. Gracias a Joaquín por compartir con nosotros su sabiduría y su experiencia tanto en la ciencia como en la vida en general, alertándonos siempre de que el futuro será difícil, pero todo saldrá bien si se trabaja por y para ello. Gracias a Juan por su dedicación, por las horas en el laboratorio mano a mano con todos, por estar siempre riéndose y por las reuniones por videollamada en tiempos de coronavirus. También quiero mencionar a Macarena y Paqui, trabajar con vosotros ha sido el broche de oro a estos cuatro años de carrera.

También tengo palabras de agradecimiento para todos mis compañeros de laboratorio. Si había que robar placas, se robaban, pero luego siempre se devolvían (o no). Ha sido una pena no poder despedirnos del lugar donde hemos pasado tantas horas trabajando codo con codo. Pero tengo que hacer una mención especial a mis dos pilares: Ana y María. Vosotras hacíais que las tardes eternas tuvieran fin y tuvieran sentido, sobre todo sentido del humor.

Por último y no menos importante, gracias a mis padres por hacer que mi única preocupación fuese estudiar. Dentro de lo que cabe, todo ha sido mucho más fácil. A mi familia, por quitarle hierro al asunto. Y a mis amigas, que también están dentro de la familia, por rescatarme cada fin de semana y sacar lo mejor de mí.

Finalmente, a pesar de que tuve que abandonar el laboratorio meses antes de lo que me hubiera gustado, volveré porque me sentí como en casa y a casa siempre se vuelve.

Gracias.

## Resumen

Las vitaminas han sido sintetizadas históricamente mediante síntesis química industrial, lo que genera una gran cantidad de residuos que dañan la calidad del medio ambiente además de obtener un bajo rendimiento. Para suplir estas carencias, se redirigió la síntesis de vitaminas hacia una producción microbiana que se da de forma espontánea en la naturaleza. Además, en concreto la microbiota fúngica, tiene una elevada capacidad metabólica para utilizar medios de cultivo basados en sustratos residuales con el objetivo de generar compuestos de interés. Este hecho presenta una aplicación fundamental: proporcionar a los residuos una segunda vida en la que son empleados para generar compuestos bioactivos de valor añadido como las vitaminas.

Este trabajo se enfocó en el estudio de la producción de vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina) por parte de una amplia colección de especies fúngicas procedentes del proceso de compostaje de residuos lignocelulósicos para poder realizar un estudio comparativo entre éstas y el hongo productor referencia, *Ashbya gossypii* buscando identificar potenciales productores de la vitamina que se adapten a producirla sobre sustratos residuales o que posean genes de interés para la producción de riboflavina.

Una vez evaluada la producción de riboflavina de todas las cepas, se determinó que las especies más productoras fueron *Galactomyces geotrichum*, *Cryptococcus magnus*, *Penicillium spinulosum*, *Pyrenochaeta sp.*, *Kwoniella mangroviensis* y *Verticillium dahliae*. En base a estos resultados, se ha realizado un estudio en el que se ha indagado en los genes y en las enzimas presentes en cada una de estas especies que hacen que sean buenas productoras de riboflavina llegándose a la conclusión de que presentan genes homólogos a los encontrados previamente en *Saccharomyces cerevisiae*, especie generadora de esta vitamina. El estudio abre la posibilidad de encontrar, sobre cepas ambientales no caracterizadas previamente, nuevos genes de interés para la potente industria de la biotecnología microbiana asociada a la producción de vitaminas.

## Abstract

Vitamins have been synthesized historically through industrial chemical synthesis, which generates a large amount of waste that damages the quality of the environment as well as obtaining low yield. To fill these deficiencies, the synthesis of vitamins was redirected towards a microbial production that occurs regularly in nature. Furthermore, specifically the fungal microbiota has a high metabolic capacity to use media culture based on residual substrates with the aim of generating compounds of interest. This fact has a fundamental application: to provide a second life to waste in which they are used to generate bioactive compounds with added value, such as vitamins.

This work focused on the study of the production of vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin) by a wide collection of fungal species from the composting process of lignocellulosic waste to be able to carry out a comparative study between these and the reference producer fungus, *Ashbya gossypii* looking for identify potential producers of the vitamin that adapt to produce it on residual substrates or that have genes of interest for riboflavin production.

After evaluating the riboflavin production of all the strains, it was determined that the most productive species were *Galactomyces geotrichum*, *Cryptococcus magnus*, *Penicillium spinulosum*, *Pyrenochaeta* sp., *Kwoniella mangroviensis* and *Verticillium dahliae*. Based on these results, a study has been carried out that has investigated the genes and enzymes present in each of these species that make them good riboflavin producers, concluding that they have homologous genes to previously found in *Saccharomyces cerevisiae*, a species that generates this vitamin. The study opens the possibility of finding, on environmental strains not previously characterized, new genes of interest for the powerful industry of microbial biotechnology associated with the production of vitamins.

## I. Introducción

### 1. Producción microbiana de vitaminas

Las vitaminas se definen como micronutrientes esenciales, que son requeridas en cantidades mínimas y que no pueden ser sintetizadas por los mamíferos. Además de sus funciones fisiológicas y nutricionales *in vivo* como factores de crecimiento en humanos, animales, plantas y microorganismos, las vitaminas han sido introducidas en mayores cantidades como aditivos nutricionales en alimentos, y, en los últimos años, se ha incrementado su uso como agentes terapéuticos.

#### A. Características de la producción microbiana de vitaminas

La producción química de vitaminas y su extracción presentan algunas particularidades y desventajas, entre las que destacan la excesiva generación de residuos contaminantes o una baja productividad con un coste elevado. Estas desventajas pretenden ser paliadas mediante la sustitución de la síntesis química por la síntesis biológica llevada a cabo por microorganismos productores de las mismas a través de procesos biotecnológicos.

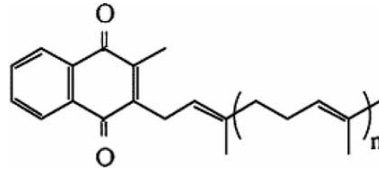
#### Vitamina E

La vitamina E consiste en un grupo de ocho compuestos entre los que se incluyen cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles que existen como homólogos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . En la naturaleza, solo los organismos fotosintéticos son capaces de producir  $\alpha$ -tocoferol. Anteriormente, el  $\alpha$ -tocoferol era obtenido mediante síntesis química y extracción con aceites vegetales, pero este tipo de extracción no es eficiente obteniéndose unos niveles bajos. En contraposición, muchas cepas de la microalga de agua dulce *Euglena gracilis* (Takeyama *et al.*, 1997) y de la microalga marina *Dunaliella tertiolecta* (Abalde *et al.*, 1991) producen  $\alpha$ -tocoferol en concentraciones mayores. El cultivo de microalgas en aguas residuales procedentes de los sistemas de recirculación de la acuicultura es un enfoque novedoso para la producción combinada de valiosos bioproductos y para el tratamiento de este tipo de aguas residuales. El crecimiento, la absorción de nutrientes, el perfil de ácidos grasos y el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en cultivos de *E. gracilis* son elevados en estas condiciones (Tossavainen *et al.*, 2018). Además, es una técnica que permite el reciclaje del agua *in situ*, ya que se incorporan en el propio circuito de recirculación, a la vez que generan  $\alpha$ -tocoferol y otros nutrientes que pueden utilizarse para la alimentación de los peces.

#### Vitamina K<sub>2</sub>

Este tipo de vitamina está constituida por una serie de naftoquinonas que tienen una cadena lateral variable de entre 4 y 13 unidades de isopreno de longitud. Los compuestos se denominan MK-n, donde n denota el número de unidades de isopreno que presenta la molécula (Fig. I.1) (Shearer *et al.*, 1990).

Figura I.1. Estructura de la vitamina K<sub>2</sub>



La vitamina K<sub>2</sub> es producida por bacterias, incluidas algunas cepas que pertenecen al grupo de las bacterias de ácido láctico (LAB), como las que fueron empleadas en el trabajo de Liu *et al.* (2019). En él, seis cepas de *Lactococcus lactis* fueron seleccionadas por su capacidad de producir de MK-5 a MK-10, aunque había diferencias significativas entre las cepas en términos de concentraciones de vitamina K<sub>2</sub>. En este trabajo, la cepa *L. lactis* MG1363 fue seleccionada para estudios bajo diferentes condiciones de crecimiento: fermentación estática (ausencia de oxígeno, ausencia de grupos hemo) y procesos aeróbicos en presencia y ausencia de grupos hemo. Los procesos aeróbicos con fructosa como fuente de carbono resultaron ofrecer las condiciones de crecimiento donde se obtuvo una concentración específica más alta de vitamina K<sub>2</sub>. La conclusión es que la selección de cepas y la optimización de las condiciones de crecimiento ofrecen una estrategia viable para mejorar los procesos biotecnológicos de producción de vitamina K<sub>2</sub>.

### Vitamina B<sub>12</sub>

Una de las moléculas más interesantes en el ámbito médico y científico es la cobalamina o vitamina B<sub>12</sub>. En realidad, bajo esta denominación se incluye un conjunto de moléculas relacionadas (cianocobalamina, metilcobalamina, hidroxicobalamina, etc.) que comparten una estructura química basada en un anillo tetrapirrólico coordinado con cobalto. La importancia de esta vitamina se puso de manifiesto cuando se comprobó que su deficiencia conducía a un tipo de anemia. El estómago produce una sustancia denominada Factor Intrínseco, que es esencial para la absorción de B<sub>12</sub>. Las personas que padecen una enfermedad autoinmune que les hace destruir el Factor Intrínseco no absorben vitamina B<sub>12</sub> y desarrollan una anemia megaloblástica denominada Anemia Perniciosa.

La biosíntesis *de novo* de vitamina B<sub>12</sub> en bacterias debe incluir la biosíntesis de dimetilbenzamidazol (DMBI) a través de la vía de la riboflavina. *Propionibacterium freudenreichii* puede producir vitamina B<sub>12</sub> a través de una vía biosintética anaeróbica. Debido a que la producción de vitamina B<sub>12</sub> por *P. freudenreichii* es un fenómeno asociado al crecimiento, se ha estudiado el efecto de diferentes fuentes de carbono (aceite de salvado de arroz y aceite de argán), nutrientes (1,3-dimetil-2-fenil-2,3-dihidro-1H-benzoimidazol o DMBI) y aminoácidos (L-Serina, L-Triptófano, L-Cisteína, L-Metionina) sobre el crecimiento de *P. freudenreichii* PTCC1674 (Hedayati *et al.*, 2020). Como conclusión de este trabajo, la producción de cianocobalamina por parte de *P. freudenreichii* se optimiza cuando se utiliza como fuente de carbono el aceite de salvado de arroz y, por tanto, resulta una alternativa novedosa, económica y eficaz para la producción de este tipo de vitamina.

### Ácido ascórbico (Vitamina C)

El ácido L-ascórbico es una vitamina hidrosoluble con estructura de lactona que funciona como un metabolito muy importante para la mayoría de los seres vivos. En humanos es necesario para una gran variedad de funciones fisiológicas. El ácido L-ascórbico encuentra su uso principalmente en la industria alimentaria, siendo una vitamina y un antioxidante. Aproximadamente el 50% del ácido ascórbico sintético se usa en vitaminas, suplementos y preparaciones farmacéuticas. Hay diferentes vías de producción, cuya nomenclatura hace referencia a los intermediarios metabólicos que se producen. La más comercial es la oxidación de D-sorbitol o L-sorbosa a ácido 2-ceto-L-gulónico (2-KLG) a través del intermediario L-sorbosona (vía del sorbitol) y la oxidación de D-glucosa a 2-ceto-L-gulonato a través de ácido D-glucónico, ácido 2-ceto-D-glucónico y ácido 2,5 diceto-D-glucónico (vía del ácido 2-ceto-D-glucónico) (Hancock *et al.*, 2002). El método convencional de cultivo en dos pasos se utilizaba para producir ácido 2-ceto-D-glucónico (2-KGA), el precursor de la vitamina C. Para este tipo de fermentación se empleaban especies como *Gluconobacter oxydans* o *Bacillus spp.*, a pesar de su alta eficiencia de producción, el largo período de incubación y una segunda esterilización adicional lo convertía en un proceso tedioso. Por ello, los estudios recientes sobre la mejora de este proceso biotecnológico utilizan un consorcio formado por *Gluconobacter oxydans* y *Ketogulonicigenium vulgare* para realizar una fermentación en un solo paso para la producción de 2-KGA (Wang *et al.*, 2016). Con este cambio, el rendimiento de producción de 2-KGA es comparable al de la fermentación convencional en dos etapas y, además, se comprueba que la interacción metabólica entre las cepas mejora con el mutualismo entre los microorganismos respecto a la situación anterior.

### Biotina (Vitamina H)

La biotina (vitamina H o B<sub>7</sub>) es una vitamina estable al calor, polar, y susceptible a la oxidación. Además, es uno de los cofactores más importantes involucrados en el metabolismo central de las células procariontas y eucariotas. Inicialmente, la síntesis química era la única vía para su producción comercial. Recientemente, se han realizado estudios sobre la producción microbiana de biotina en *Pseudomonas putabilis* a través de estrategias de ingeniería metabólica multinivel: Nivel 1, sobreexpresión de genes que codifican enzimas limitantes involucradas en la síntesis de biotina (modificaciones en el sitio de unión); Nivel 2, desregulación de la biosíntesis de biotina (eliminación del regulador negativo); Nivel 3, mejora en el suministro de cofactores (grupo S-adenosil-L-metionina y [Fe-S]) para la biosíntesis de biotina; Nivel 4, aumentando la disponibilidad del precursor tioéster de pimelato (introducción de la vía BioW-Biol de *Bacillus subtilis*) (Xiao *et al.*, 2019). La combinación de estas herramientas da como resultado una cepa que sobreproduce biotina, con un aumento de la secreción de biotina de más de 460 veces en comparación con la producción química.

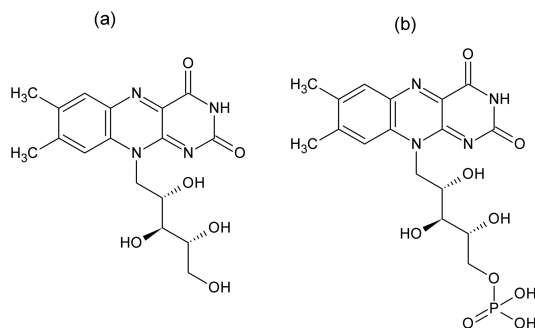


## B. Riboflavina (Vitamina B<sub>2</sub>), características e interés

La riboflavina, también denominada vitamina B<sub>2</sub>, fue descubierta a finales del siglo XIX como un pigmento amarillo verdoso aislado de la leche al que se denominó lactoflavina. Químicamente, pertenece al grupo de las flavinas, caracterizadas por ser pigmentos amarillos (del latín *flavus*: amarillo) que, en presencia de luz UV, emiten una fluorescencia amarillo-verdosa. La riboflavina es un compuesto hidrosoluble, termoestable y altamente fotosensible. En la naturaleza puede aparecer como pigmento libre, como fosfato de riboflavina, sulfato de riboflavina o formando parte de las flavoproteínas.

Su estructura se compone de un anillo de dimetilisoaloxacina con un grupo D-ribitilo en la posición 8 [7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitil) isoaloxacina] (Fig. 1.2a). La actividad biológica de la riboflavina se debe a la capacidad del núcleo de isoaloxacina de estar en tres estados redox: oxidado o estado de quinona, reducido en un electrón o estado de semiquinona (radical) y reducido en dos electrones (totalmente reducido) o estado dehidroquinona. La riboflavina generalmente no tiene funciones metabólicas directas en la célula, a excepción de su actuación como cofactor redox en la bomba de Na<sup>+</sup> NADH:quinona oxidoreductasa de *Vibrio cholerae* (Juárez *et al.*, 2008), pero su importancia biológica estriba en ser precursor de la síntesis de dos cofactores flavínicos, el cofactor mononucleótido de flavina (FMN) y el cofactor dinucleótido de flavina y adenina (FAD) (Fig. 1.2b).

**Figura 1.2. Estructura química de la riboflavina (a) y FMN (b) (Narayanan *et al.*, 2019).**



Además, los derivados flavínicos son capaces emitir bioluminiscencia, por acción la enzima luciferasa sobre FMH<sub>2</sub> (Duane y Hastings, 1975). Este hecho presenta hoy en día una aplicación muy prometedora en la industria textil. Ambas flavinas, la riboflavina y el FMN, son moléculas multifuncionales de base biológica que producen coloración amarilla y exhiben fotoluminiscencia, protección UV y propiedades redox, es por ello por lo que se han estado invirtiendo esfuerzos en obtener tejido celulósico fotoluminiscente empleando riboflavina y FMN. Para ello, Narayanan *et al.* (2019) prepararon soluciones de riboflavina y FMN a pH 7 que fueron utilizadas para la tinción de tejido celulósico. El estudio incluye la determinación del rendimiento de la coloración y la evaluación de la bioluminiscencia de la tela teñida mediante detección espectrofotométrica. El tejido mostró una intensa emisión de color amarillo verdoso y resistencia al lavado de las prendas, de forma que se

concluye que es una técnica factible de ser empleada en la industria textil ya que, además es sostenible.

La riboflavina es usada también en nutrición humana, así como aditivo en alimentación animal. En este sentido, Rychen *et al.* (2018) utilizaron una cepa modificada genéticamente de *Ashbya gossypii* para generar grandes cantidades de riboflavina que incorporaron como aditivo al producto que querían evaluar. Este producto alimenticio contiene un 80% de riboflavina y un 20% de un medio con pocos nutrientes. Aunque la cepa de *A. gossypii* estuviera modificada genéticamente, se ha comprobado que no hay restos de ADN recombinante en el producto final por lo que cumple con la normativa de seguridad y, por tanto, se puede utilizar eficazmente para cumplir con los requisitos nutricionales de los animales y los humanos. Además, el principio activo riboflavina se produce en la naturaleza por lo que no se espera que su uso en nutrición animal pueda aumentar sustancialmente la concentración en el medio ambiente ni suponer un riesgo para el ecosistema.

Su deficiencia en humanos se correlaciona con la pérdida de cabello, inflamación de la piel, deterioro de la visión y falta de crecimiento. Sabiendo que la riboflavina es una vitamina requerida para tener una visión correcta en los humanos, Young *et al.* (2019) se propusieron investigar la eficacia de la aplicación continua con luz pulsada de una solución de riboflavina al 0,1% en el colágeno corneal para comprobar si se detenía la progresión del queratocono (trastorno corneal caracterizado por un adelgazamiento progresivo y una protrusión de la córnea, acompañado de astigmatismo irregular y miopía). Para ello, se escogieron diferentes pacientes que padecían este trastorno y se midió el astigmatismo y la miopía de forma previa al tratamiento y también 12 meses después de éste. Finalmente, resulta ser un tratamiento seguro y eficaz para impedir la progresión del queratocono. También se ha observado que esta vitamina tiene éxito en el tratamiento de la migraña (Krymchantowski *et al.*, 2002) y la malaria (Akompong *et al.*, 2000). Se ha demostrado que *AgYap1p* es un factor de transcripción que desempeña un papel importante en la dirección de las respuestas celulares a diversos tipos de estrés y regula la expresión del gen *AgRIB4* para provocar un aumento de la producción de vitamina dependiente de *AgYap1p* durante el estrés oxidativo (Walther y Wendland, 2012). *AgYap1p* también parece regular la expresión de *AgRIB3* y *AgGSH1*, que intervienen en la codificación de genes de la  $\gamma$ -glutamil-cisteinil sintasa, una enzima limitante de la velocidad de biosíntesis de glutatión (molécula involucrada en la defensa de *A. gossypii* frente al estrés oxidativo) (Kavitha y Chandra, 2014). Estas evidencias muestran que la producción de riboflavina está más relacionada con mecanismos reguladores que con capacidades metabólicas propiamente dichas. De hecho, en comparación con especies cercanas como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, que no sobreproducen riboflavina, *A. gossypii* no posee enzimas exclusivas directamente involucradas en la biosíntesis de esta vitamina, lo que podría explicar su rasgo superproductor (Gomes *et al.*, 2014).

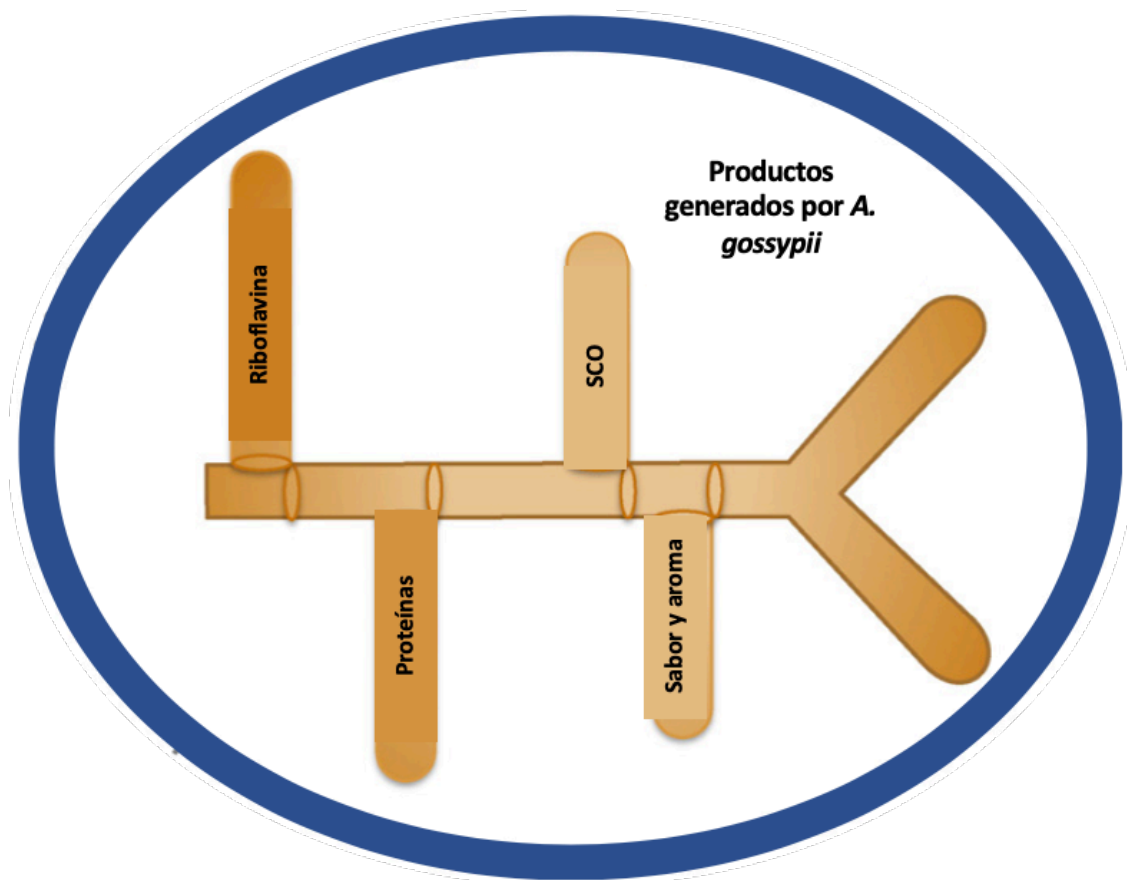
La riboflavina ha sido producida para su comercialización mediante fermentación por sí sola o mediante la combinación de la fermentación con la síntesis química. La ruta fermentativa de la producción de este tipo de vitamina por parte de microorganismos ha sido usada para producirla en

cultivo de un solo paso, obteniendo como resultado un mejor rendimiento y un menor coste de producción (Horiuchi *et al.*, 1999).

## 2. *Ashbya gossypii* como agente de interés biotecnológico

*A. gossypii*, actualmente también conocido como *Eremothecium gossypii*, presenta numerosas aplicaciones biotecnológicas (Fig. I.3) entre las que se encuentra no solo la producción de riboflavina, sino también la producción de single-cell oil, compuestos saborizantes y aromatizantes y proteínas heterólogas (Aguiar *et al.*, 2015).

Figura I.3. Aplicaciones biotecnológicas de *A. gossypii*.



A continuación, se desarrollarán estas cuatro aplicaciones biotecnológicas, prestando especial interés a la producción de riboflavina.

### A. Producción de riboflavina

*A. gossypii* es un sobreproductor natural de riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), lo que confiere a sus micelios un color amarillo característico (Wickerham *et al.*, 1946). La sobreproducción de esta vitamina en *A. gossypii* comienza en la fase estacionaria, cuando la tasa de crecimiento disminuye (Karos *et al.*, 2004; Stahmann *et al.*, 2001). La fase de producción de riboflavina se caracteriza por un fuerte

aumento en la expresión de tres genes (*AgRIB3*, *AgRIB4* y *AgRIB5*), que están regulados a nivel transcripcional (Schlösser *et al.*, 2001, 2007; Walther y Wendland, 2012). Se ha demostrado que la sobreproducción de riboflavina por parte de *A. gossypii* se desencadena por estreses ambientales, como el nutricional y el oxidativo (Kavitha y Chandra, 2009, 2014; Schlösser *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2015; Walther y Wendland, 2012).

*A. gossypii* acumula grandes cantidades de cuerpos lipídicos para almacenar carbono y energía (Ledesma-Amaro *et al.*, 2014; Stahmann *et al.*, 1994). Aunque las fuentes de carbono utilizadas desempeñan un papel determinante en su perfil lipidogénico, *A. gossypii* predominantemente acumula ácidos grasos insaturados (Ledesma-Amaro *et al.*, 2014; Stahmann *et al.*, 1994). Cuando los lípidos se usan como fuente de carbono, el ciclo del glioxilato juega un papel fundamental respecto al crecimiento de *A. gossypii* y la síntesis de riboflavina, y como precursores de GTP y ribulosa 5-P, que se originan a partir del metabolismo de los carbohidratos (Schmidt *et al.*, 1996a, 1996b).

La biosíntesis de riboflavina está estrechamente relacionada con otras vías biosintéticas, como la vía de síntesis de purina, todas ellas compiten para los mismos sustratos. Además de ser utilizada directamente en la vía de biosíntesis de riboflavina, la ribulosa 5-P se puede isomerizar alternativamente a ribosa 5-P (Kruger y von Schaewen, 2003). El GTP, el otro precursor de riboflavina se sintetiza a través de la vía de las purinas, que comienza con la formación de fosfo-ribosil pirofosfato (PRPP), de ribosa 5-P y ATP. El proceso natural mediante el que *A. gossypii* produce riboflavina se encuentra entre los primeros procesos biotecnológicos que reemplazaron al proceso químico de producción de ésta, lo que fue debido a la competitividad económica (Kato y Park, 2012; Lim *et al.*, 2001; Stahmann *et al.*, 2000; zu Berstenhorst *et al.*, 2009). Se ha observado que las cepas silvestres de *A. gossypii* producen hasta 5 g/L de riboflavina en medios de cultivo optimizados, pero cepas mejoradas al azar pueden producir de 14 a 20 g/L de riboflavina (Demain, 1972; Lim *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2011).

## **B. Producción de otras sustancias de valor añadido**

### Proteínas heterólogas

Más allá de la producción de riboflavina, se ha visto que *A. gossypii* puede servir como huésped para la producción de proteínas heterólogas (proteína que se obtiene a partir de una especie o una línea celular distinta a la célula original), hecho que ha recibido mucha atención en los últimos años. Una endo- $\beta$ -1,4-glucanasa (*celA1*) de *Streptomyces halstedii* (Althöfer *et al.*, 2001), dos celulasas de *Trichoderma reesei*, una endoglucanasa I (EGI) y celobiohidrolasa I (CBHI) (Ribeiro *et al.*, 2010), una  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus niger* (Magalhães *et al.*, 2014) y una invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Aguiar *et al.*, 2014) se encuentran entre el repertorio de enzimas heterólogas producidas en este huésped. *A. gossypii* posee la capacidad de secretar enzimas nativas y heterólogas al medio extracelular y reconocer péptidos señal de otros organismos (Aguiar *et al.*, 2014; Althöfer *et al.*, 2001; Magalhães *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2010; Stahmann *et al.*, 1997). *A. gossypii* también puede realizar

las modificaciones posteriores a la traducción proteica, como la glicosilación y otras modificaciones requeridas para la actividad biológica y la estabilidad de las proteínas (Aguiar *et al.*, 2013; Magalhães *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2010).

### Single Cell Oil (SCO)

La adaptación de *A. gossypii* para la producción de Single Cell Oil (SCO) es un ejemplo de cómo las herramientas moleculares *in silico*, es decir, mediante simulación computacional, se han usado en los últimos años en este hongo, lo que ha permitido obtener un rendimiento económico de sus capacidades naturales de producción. La producción de SCO es una gran alternativa para la industria petrolera, que ha visto cómo sus principales fuentes (petróleo crudo, grasa animal y aceite vegetal) han sido vinculadas a efectos negativos tanto ambientales como económicos (Beopoulos *et al.*, 2011). A pesar de ser considerado un microorganismo no oleaginoso (Vorapreeda *et al.*, 2012), *A. gossypii* fue diseñado metabólicamente para adaptarse a la producción de SCO (contenido mínimo del 20% de lípidos en relación con su peso seco celular) (Ledesma-Amaro *et al.*, 2014). Para ello, Ledesma-Amaro *et al.*, (2014) utilizaron dos estrategias diferentes: primero, los genes *AgPOX1* y *AgFOX2*, que están involucrados en la vía de  $\beta$ -oxidación, se silenciaron para evitar la degradación de los ácidos grasos; segundo, una ATP-citrato liasa heteromérica (*Aclp*) de *Yarrowia lipolytica* fue sobreexpresada en *A. gossypii* para permitir la conversión de citrato en acetil-CoA. La adaptación de *A. gossypii* para la producción de SCO genera resultados prometedores. De acuerdo con Ledesma-Amaro *et al.* (2014), la acumulación de lípidos está entre los niveles de más altos conseguidos hasta la fecha en ambos tipos de microorganismos, oleaginosos y no oleaginosos.

### Producción de compuestos saborizantes y aromatizantes

El sector de bebidas fermentadas invierte generosamente en nuevos productos que pueden ofrecer una nueva variedad de percepciones de sabor y aroma, que son características importantes para determinar la calidad del producto. Por lo tanto, se ponen muchos esfuerzos en encontrar nuevos productores naturales. En este sentido, existe un aumento del interés en especies no relacionadas con *Saccharomyces*.

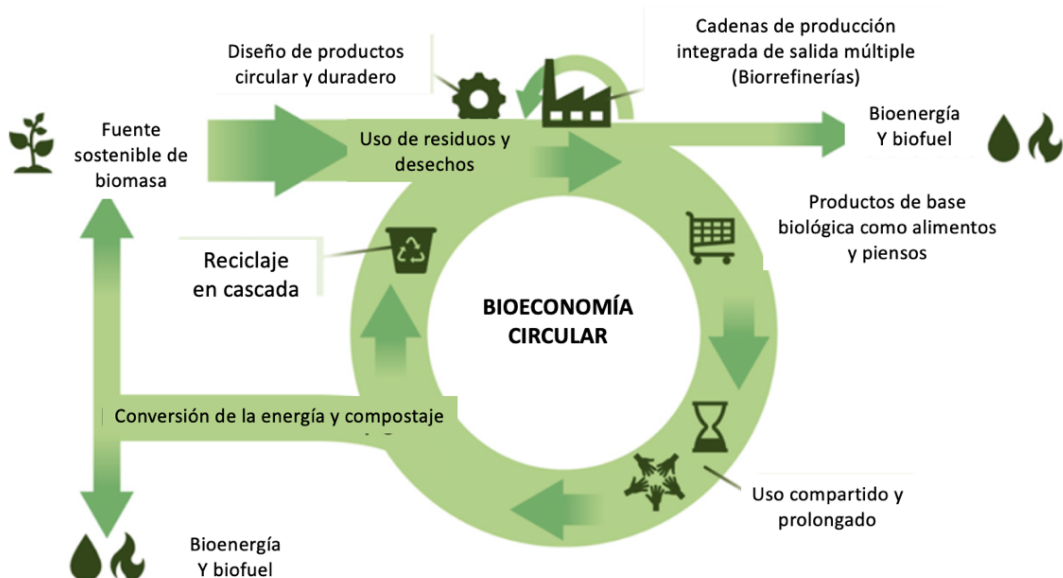
La vía de Ehrlich juega un papel fundamental en el metabolismo del sabor y de los compuestos aromáticos. Mediante la observación de esta vía, Walther y Wendland (2012) han hallado diferencias genéticas significativas entre *A. gossypii* y una especie estrechamente relacionada que también realiza la vía de Ehrlich, *Eremothecium cymbalariae*. Las cepas de *E. cymbalariae* tienen solo un gen relacionado con esta vía (*ARO8a*), mientras que *A. gossypii* codifica cuatro genes (*AgARO8a*, *AgARO8b*, *AgARO10* y *AgARO80*). En comparación con *S. cerevisiae*, *A. gossypii* carece de *ARO9* (Ravasio *et al.*, 2014). Por lo tanto, Ravasio *et al.*, (2014) han explorado la importancia de esta vía en la producción de sabores y aromas por parte de *A. gossypii*. El perfil de compuestos volátiles producidos por *A. gossypii* está caracterizado por unos altos niveles de 2-feniletanol (aroma floral), que son residuales en *E. cymbalariae*, y de alcohol isoamílico (aroma afrutado), también elevado en *E. cymbalariae*. Incluso, se

ha detectado que la producción de 2-feniletanol por *A. gossypii* era mayor que en cepas de *S. cerevisiae*. Por tanto, solo con la utilización de *A. gossypii* podemos conseguir un perfil aromático y saborizante semejante e incluso superior que con otros microorganismos previamente empleados en esta industria.

### 3. Producción fúngica de vitaminas a partir de sustratos residuales

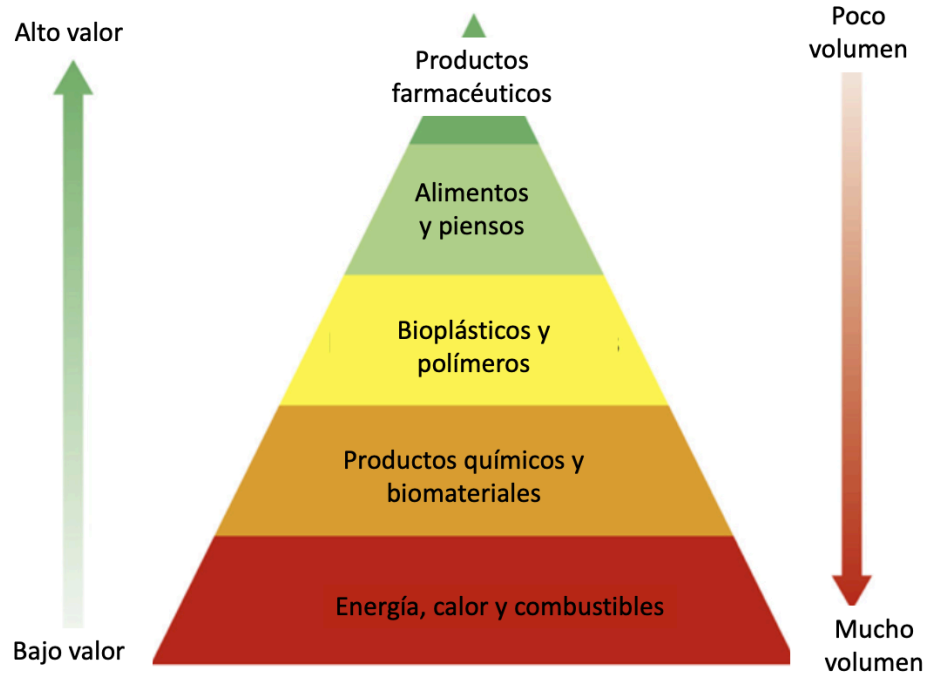
La Organización de las Naciones Unidas (ONU) recoge en su informe United In Science (2019) que la temperatura global promedio del periodo comprendido entre 2015 y 2019 es la más cálida en comparación con cualquier otro período equivalente registrado. Actualmente, se estima en 1,1°C, un grado por encima de los tiempos preindustriales (1850–1900). Esto en datos de efecto invernadero, supone que las emisiones de CO<sub>2</sub> crecieron un 2% y alcanzaron un récord de 37.000 millones de toneladas en 2018. Los sumideros naturales de dióxido de carbono serán menos eficientes cuanto más aumente el porcentaje de emisión. La biomasa desempeñará un papel importante en el cumplimiento de los objetivos climáticos globales establecidos en el acuerdo de París (Creutzig *et al.*, 2015; Daioglou *et al.*, 2019; Rogelj *et al.*, 2018; Rose *et al.*, 2014). Para la industria química, el transporte de mercancías por carretera, el sector marítimo y la aviación, la biomasa es una de las pocas opciones para reemplazar el petróleo por un recurso renovable, reduciendo así las emisiones de gases de efecto invernadero del sector (Agencia Internacional de Energía (AIE), 2018; Bazzanella *et al.*, 2017; Carus *et al.*, 2018; De Jong *et al.*, 2018; Mawhood *et al.*, 2016). De aquí surge el concepto de bioeconomía (BE) que ha sido presentado por la Unión Europea (European Commission, 2012) y en otros casi 50 países del resto del mundo (Fund *et al.*, 2018). La bioeconomía se puede definir como la "producción de energías renovables y recursos biológicos, así como la conversión de estos recursos y desechos en productos de valor añadido, como alimentos, piensos, productos de base biológica y bioenergía" (European Commission, 2012) (Fig. I.4).

Figura I.4. Elementos de la bioeconomía circular (Stegmann *et al.*, 2019)



Las biorrefinerías se definen como "el procesamiento sostenible de biomasa en un espectro de productos comercializables (alimentos, piensos, materiales, productos químicos) y energía (combustibles, energía, calor)" (De Jong *et al.*, 2012). Las biorrefinerías integradas son una combinación de varias tecnologías de conversión de biomasa que permiten una mayor flexibilidad y reducción de costos (McCormick y Kautto, 2013). De este modo, facilitan el uso de desechos y facilitan la producción combinada de productos de alto valor (por ejemplo, productos químicos) (Fig. I.5) con productos de menor valor (por ejemplo, sustratos residuales).

**Figura I.5. Pirámide de productos de valor obtenidos en biorrefinerías (Davis *et al.*, 2017).**



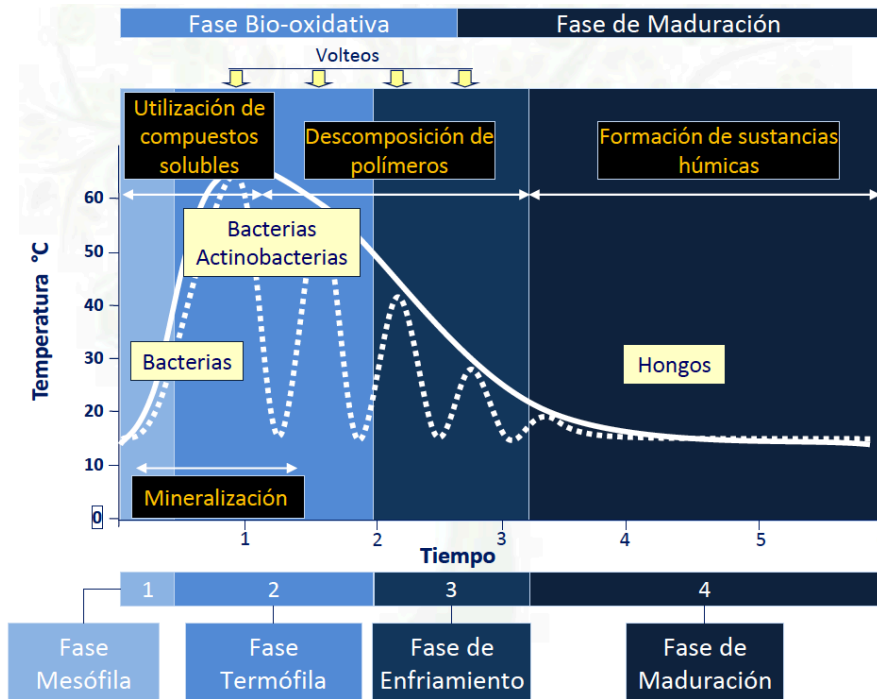
Por ello los microorganismos, que son los organismos vivos con una mayor plasticidad metabólica, son de gran utilidad a la hora de utilizar multitud de residuos, en ocasiones muy recalcitrantes, para generar productos de valor añadido. Además, en particular la microbiota fúngica resulta de gran interés ya que los hongos son muy resistentes frente a condiciones adversas.

#### **A. Aplicaciones de la microbiota fúngica presente en compostaje**

El compostaje es un proceso dinámico, biológico y aeróbico en el que la materia orgánica se estabiliza después de pasar por una fase termófila fomentada por el desarrollo de la degradación biológica, y cuyo rendimiento depende directamente de actividad de los microorganismos (Siles-Castellano *et al.*, 2020). El proceso de compostaje consta de dos fases bien diferenciadas, que a su vez se dividen en subfases (Fig. I.6), donde actúan diversos tipos de microorganismos. El éxito del compostaje como una tecnología sostenible para la gestión de residuos ha provocado un aumento del volumen de residuos tratados de esta forma (Ros *et al.*, 2006). El compostaje se ha convertido en una

herramienta fundamental en el modelo de economía circular promovido en Europa y el número de instalaciones de compostaje industrial está creciendo en toda la geografía europea (Razza *et al.*, 2018).

**Figura I.6. Fases del proceso de compostaje (adaptado de Moreno y Mormeneo, 2011)**



Es destacable el hecho de la plasticidad metabólica que presentan los microorganismos asociados al proceso de compostaje. En particular, se desarrollan a continuación algunas de las posibles aplicaciones que presenta la biodiversidad fúngica asociada al compostaje.

Producción de una D-aminoácido oxidasa termoestable

La D-Aminoácido oxidasa (DAAO, EC 1.4.3.3) cataliza la desaminación oxidativa de D-aminoácidos neutros y básicos usando FAD como cofactor. Esta misma reacción puede ser catalizada por otra enzima de flavina, la D-aspartato oxidasa (DDO, EC 1.4.3.1) (Pollegioni, *et al.*, 2000). Los hongos termófilos han sido una fuente atractiva de enzimas industrialmente útiles, como lipasas, proteasas, xilanasas y celulasas, porque las enzimas de los hongos termófilos suelen ser muy estables. También se ha descubierto que la DDO del hongo termófilo *Thermomyces dupontii* NBRC 30541 tiene una mayor estabilidad térmica que otras DDOs con alta actividad catalítica (Shimekake *et al.*, 2019). Uno de los hongos de interés es *Rasamsonia emersonii*, y ha sido encontrado en el compost creciendo a temperaturas situadas entre los 45 °C y los 50 °C. Este hongo tiene una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas siendo una prometedora fuente de producción de enzimas termoestables, incluida la DAAO. *Rasamsonia emersonii* puede utilizar los D-aminoácidos procedentes del compost para su crecimiento celular y así se ha aislado el gen homólogo productor de DAAO del hongo. Este gen se puede introducir en *E. coli* para poder manipular la producción de DAAO con mayor facilidad y rapidez



(Shimekake *et al.*, 2019). Esta enzima procedente de un hongo termófilo resulta más estable térmicamente y con la misma actividad catalítica que las que proceden de otros eucariotas.

### Eliminación de alpechín mediante compostaje fúngico *in situ*

El método tradicionalmente usado durante las últimas décadas del siglo XX para la eliminación de las aguas residuales procedentes del molido de las aceitunas (alpechín) para generar aceite de oliva fue su acumulación en balsas de evaporación donde se concentraban los sedimentos. Debido al efecto fitotóxico y antimicrobiano del alpechín, las fugas de las balsas pueden contaminar suelos y aguas. Por ello, una buena estrategia reside en la búsqueda de microorganismos que pueden ser utilizados como inóculo para la biorremediación de balsas de alpechín mediante compostaje *in situ*. Martínez-Gallardo *et al.* (2020) han empleado dos hongos aislados de sedimentos alpechín, *Aspergillus ochraceus* H2 y *Scedosporium apiospermum* H16, que presentan capacidades adecuadas para la biorremediación actuando como consorcio. El compostaje elimina la fitotoxicidad y ecotoxicidad de los sedimentos de alpechín agotando sus principales componentes tóxicos.

### Eliminación fúngica de metales pesados

La rápida urbanización y el aumento de la actividad agrícola produce muchos desechos sólidos municipales (MSW), por lo que, es necesario investigar prácticas novedosas para modificar los metales hasta un estado inocuo. Para ello, es necesario conocer los hongos capaces de desarrollar una estrategia de biofiltración utilizándolos para la expulsión de metales pesados procedentes del compost contaminado (MSWC). Manna *et al.* (2020) emplearon seis hongos que fueron aislados de lodos de depuradora (*Trichoderma viride*, *Aspergillus heteromorphus*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus awamori*). Grupos funcionales como amida (-CO-NH<sub>2</sub>), hidroxilo (-OH), aniones carboxilato (-COO<sup>-</sup>), grupos carbonilo (-C=O-), C-F y C-Br fueron responsables de la biosorción de metales pesados por hongos a través de la quelación con metales pesados.

## **II. Objetivos**

Este trabajo está integrado dentro las diversas aplicaciones que derivan de la creación de una colección de cepas tipo aisladas del compostaje de residuos vegetales en el proyecto AGL2009-08405 del Ministerio de Economía y Competitividad. Esta colección consta de 1380 aislados microbianos, de los que el Área de Microbiología de la Universidad de Almería posee una gran cantidad de información metabólica y funcional a través del proyecto AGL2012-36434 también del Ministerio de Economía y Competitividad. Esta numerosa colección de microorganismos cuenta con una amplia representación de aislados fúngicos de interés, debido a que este grupo microbiano ejerce un papel muy destacado dentro del proceso de compostaje. Hasta el momento no se ha estudiado en la colección, dentro del contexto de los proyectos anteriormente citados, la posible generación de vitaminas como la riboflavina, por parte de este grupo microbiano metabólicamente muy versátil.

El objetivo principal de este Trabajo Final de Grado fue la biosíntesis de riboflavina a partir de aislados eucariotas procedentes del compostaje de residuos lignocelulósicos empleando sustratos residuales.

Para alcanzar dicho objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1- Identificar los medios de cultivo y condiciones asociadas a la producción de la vitamina B<sub>2</sub> por parte de *Ashbya gossypii*.
- 2- Realizar un estudio comparativo sobre la producción de riboflavina en un medio de cultivo optimizado para ello, por parte de los aislados fúngicos procedentes del proceso de compostaje.
- 3- Evaluar los niveles de producción de riboflavina por parte de los aislados fúngicos seleccionados sobre sustratos residuales.

### III. Materiales y Metodología

#### 1. Microorganismos del ensayo

Como microorganismo control del experimento se empleó *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii* (Ashby et Nowell) Kurtzman (ATCC® 10895) (NRRL Y-1056 [CBS 109.51])). Este hongo fue elegido por su conocida capacidad de sintetizar riboflavina en grandes cantidades. *A. gossypii* es una de las especies de hongos filamentosos más estudiadas y presenta una estrecha relación con las levaduras. Este hongo fue solicitado al Westerdijk FungalBio Diversity Institute de Holanda.

Otro de los microorganismos del ensayo fue *Aspergillus niger* CECT 2090, elegido porque produce diversos compuestos de gran interés para la industria farmacéutica y alimentaria, como enzimas o ácidos orgánicos. En este caso, *A. niger* fue solicitado a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

El resto de los microorganismos empleados pertenecen a la colección del grupo de investigación BIO-175 del Área de Microbiología de la Universidad de Almería (Tabla III.1), y fueron aislados y caracterizados a partir del proceso de compostaje de residuos lignocelulósicos englobado dentro del proyecto AGL2009-08405 del Ministerio de Economía y Competitividad.

Tabla III.1. Especies empleadas en el ensayo. % Id indica el porcentaje de similitud respecto a la especie de referencia de Mycobank (<http://www.mycobank.org/>)

ID GENERAL	CÓDIGO	IDENTIDAD	% Id
4185	HM-MPR-1A-01	<i>Candida railenensis</i>	99
4186	HM-MPR-1A-02	<i>Rhodotorula glutinis</i>	99
4187	HM-MPR-1A-03	<i>Galactomyces candidum</i>	97
4188	HM-MPR-1A-04	<i>Galactomyces geotrichum</i>	99
4189	HM-MPR-1A-05	<i>Cryptococcus magnus</i>	99
4190	HM-MPR-1A-06	<i>Penicillium spinulosum</i>	99
4191	HM-MPR-1A-07	<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	99
4192	HM-MPR-1A-08	<i>Davidiella tassiana</i>	99
4197	HM-MPR-1A-13	<i>Alternaria brassicae</i>	99
4200	HM-MPR-1A-16	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
4203	HM-MPR-1B-01	<i>Pichia holstii</i>	90
4205	HM-MPR-1B-03	<i>Candida mycentagii</i>	94
4206	HM-MPR-1B-04	<i>Pyrenochaeta unguis-hominis</i>	99
4209	HM-MPR-1B-07	<i>Fusarium equiseti</i>	99
4212	HM-MPR-1B-10	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	99
4215	HM-MPR-1B-13	<i>Fusarium solani</i>	98
4216	HM-MPR-1B-14	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	99
4221	HM-MPR-2A-01	<i>Yamadazyma mexicana</i>	99
4225	HM-MPR-2A-05	<i>Trichoderma atroviride</i>	100
4226	HM-MPR-2A-06	<i>Candida sequanensis</i>	99
4227	HM-MPR-2A-07	<i>Pichia mississippiensis</i>	99
4230	HM-MPR-2A-10	<i>Penicillium commune</i>	100
4231	HM-MPR-2A-11	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99
4237	HM-MPR-2A-17	<i>Penicillium solitum</i>	99
4246	HM-MPR-2A-26	<i>Microdochium nivale</i>	100
4255	HM-MPR-2B-09	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99
4265	HM-MPR-2B-19	<i>Kuraishia capsulata</i>	98
4269	HM-MPR-3A-01	<i>Nakazawaea holstii</i>	99
4275	HM-MPR-3A-07	<i>Fusarium delphinoides</i>	99
4311	HM-MESA1-1A-05	<i>Penicillium brevicompactum</i>	100
4314	HM-MESA1-1A-08	<i>Pichia mexicana</i>	99
4316	HM-MESA1-1A-10	<i>Pyrenochaeta sp.</i>	100
4334	HM-MESA1-1B-07	<i>Cladosporium lignicola</i>	99
4339	HM-MESA1-1B-12	<i>Penicillium coprophilum</i>	97
4346	HM-MESA1-2A-01	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	99
4354	HM-MESA1-2B-01	<i>Pichia fermentans</i>	99
4356	HM-MESA1-2B-03	<i>Cryptococcus albidus</i>	99

ID GENERAL	CÓDIGO	IDENTIDAD	% Id
4360	HM-MESA1-2B-07	<i>Fusarium domesticum</i>	96
4361	HM-MESA1-2B-08	<i>Aspergillus ostianus</i>	99
4370	HM-MESA1-3A-03	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	99
4371	HM-MESA1-3A-04	<i>Cryptococcus flavescens</i>	100
4375	HM-MESA1-3A-08	<i>Acremonium antarcticum</i>	99
4387	HM-MESA1-3B-04	<i>Trichosporon dermatis</i>	99
4415	HM-TER1A-1A-19	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	100
4430	HM-TER1A-1B-12	<i>Verticillium dahliae</i>	99
4432	HM-TER1A-1B-14	<i>Alternaria alternata</i>	100
4443	HM-TER1A-2A-03	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	96
4496	HM-TER1B-1A-09	<i>Emericella rugulosa</i>	100
4632	HM-MESD1-2A-10	<i>Cephalophora tropica</i>	99
4685	HM-MESA2-1B-10	<i>Ochrocladosporium frigidarii</i>	97
4717	HM-TER2A-1A-09	<i>Penicillium dipodomycola</i>	100
4739	HM-TER2A-1B-13	<i>Aspergillus terreus</i>	99
4764	HM-TER2A-2B-09	<i>Alternaria tenuissima</i>	99
4779	HM-TER2A-3B-05	<i>Stemphylium solani</i>	99
4878	HM-MESD2-3A-04	<i>Penicillium polonicum</i>	99
4953	HM-MESA3-3B-09	<i>Preussia australis</i>	89
4966	HM-TER3A-1B-06	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
5019	HM-MESD3-1B-08	<i>Scedosporium prolificans</i>	99
5078	HM-MESA4-2B-01	<i>Scopulariopsis hibernica</i>	98
5079	HM-MESA4-2B-02	<i>Graphium putredinis</i>	99
5214	HM-MES7-1B-04	<i>Penicillium lapidosum</i>	99
5240	HM-MES7-3A-07	<i>Penicillium steckii</i>	96
5262	HM-MAD1-1B-06	<i>Microascus cirrosus</i>	99
5351	HM-PRF-3B-08	<i>Aspergillus flavipes</i>	100
5400	HT-MESD1-3A-04	<i>Talaromyces thermophilus</i>	99

## 2. Medios de cultivo y sustratos residuales

### A) Recuperación del cepario.

Para la recuperación y reactivación del cepario de la colección se emplearon los medios de Rosa de Bengala (RB) y Agar Patata Dextrosa (PDA) (Panreac) (Tabla III.2).

**Tabla III.2. Composición medios de cultivo RB y PDA.**

Medio	Composición	pH
RB	Agar bacteriológico: 15 g/L Cloranfenicol: 0,1 g/L Sulfato magnésico: 0,5 g/L Rosa de bengala: 0,05 g/L Peptona bacteriológica: 5 g/L Dextrosa: 10 g/L Fosfato potásico 1 g/L	7,2
PDA	Agar bacteriológico: 15 g/L Dextrosa: 20 g/L Infusión de patata: 4 g/L	5,6

\*Adicionalmente, se incorporó un refuerzo de agar bacteriológico en ambos medios de cultivo a razón de 5 g/L.

- Preparación medio RB: en primer lugar, se incorporaron los distintos componentes y luego se enrasó con agua destilada hasta el volumen final, posteriormente se introdujo el medio en el autoclave y se esterilizó durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C y a una presión de 1 atm. Una vez autoclavado, se procedió al reparto en placas de Petri.
- Preparación medio PDA: para la preparación de tubos de este medio de cultivo se incorporaron los distintos componentes a un vaso de precipitado y se enrasó con agua hasta el volumen final. Esta preparación se llevó a ebullición y luego se repartió en tubos a razón de 5mL aproximadamente en cada tubo de ensayo con ayuda de un embudo. Una vez repartido el volumen en los tubos, estos se autoclavaron durante 20 minutos a 121 °C y 1 atm de presión. Finalmente, una vez esterilizados se inclinaron y se dejaron solidificar.

#### B) Medios líquidos para la producción de riboflavina.

Para la producción de riboflavina se emplearon distintos medios de cultivo. En primer lugar, se empleó un medio de cultivo optimizado de composición definida (Aguiar *et al.*, 2014) (Tabla III.3).

**Tabla III.3. Composición medio de cultivo optimizado (Aguiar *et al.*, 2014).**

Composición	pH
Glucosa: 20 g/L Tryptona: 10 g/L Myo-inositol: 1 g/L Extracto de levadura: 10 g/L	5-5,5

Para la segunda parte del experimento se emplearon medios de cultivo que contienen sustratos residuales (Tabla III.4 y Tabla III.5).

**Tabla III.4. Medios de cultivo basados en la hidrólisis de hojas de tomate y de alperujo (Modificado de Lara *et al.*, 2001)**

Composición	pH
Hidrolizado de hojas de tomate/alperujo: 15 g/L Extracto de malta: 20 g/L Extracto de levadura: 5 g/L Fosfato diamónico: 0,3 g/L	6,6-7

Para preparar el hidrolizado, el procedimiento experimental fue el siguiente (Suárez-Estrella, 2003):

- Se preparó una mezcla al 10% (p/V) del residuo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5% (V/V).
- Los residuos se autoclavarón durante 2 h a 121 °C.
- Se dejó enfriar.
- Se filtró para eliminar los restos del residuo.
- Se midió el pH y se ajustó hasta 6,6-7 con Ca(OH)<sub>2</sub>.
- Se eliminó el precipitado por filtración.

**Tabla III.5. Medio de cultivo basado en el uso de aceite de cocina usado para la producción de riboflavina (Schwechheimer *et al.*, 2018)**

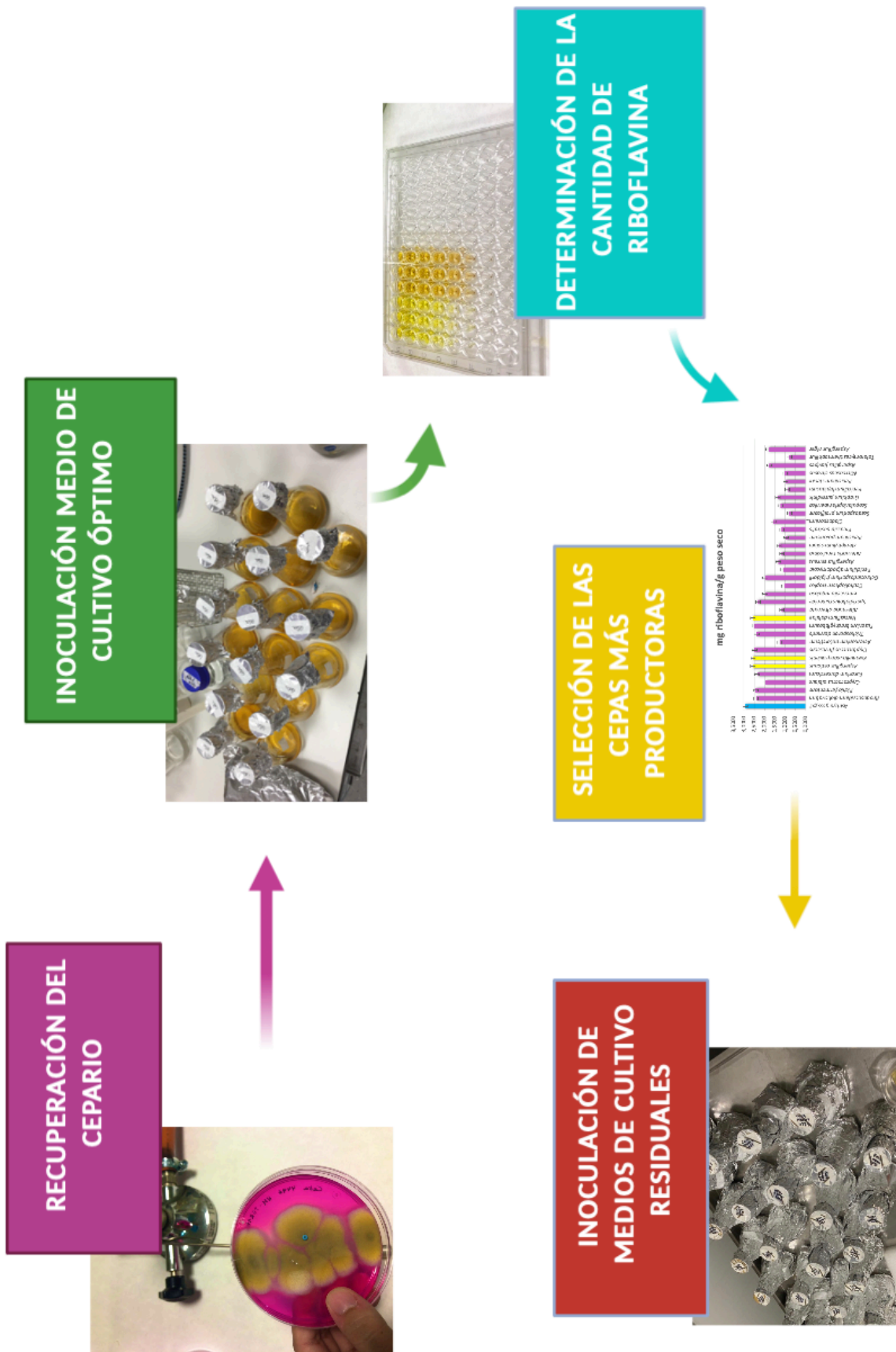
Composición	pH
Glicina: 9,5 g/L Myo-inositol: 0,2 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 1,9 g/L MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O: 0,5 g/L Extracto de levadura: 28,6 g/L Aceite de cocina usado: 156,5 g/L Glutamato sódico: 7,4 g/L Metionina: 1,1 g/L Urea: 9 g/L	6,5

Para la preparación de estos medios de cultivo, en primer lugar, se incorporaron todos los componentes a un vaso de precipitado y posteriormente se le ajustó el pH. Finalmente, se repartió el contenido en matraces a razón de 100 mL en cada matraz y se autoclavarón durante 20 minutos a 121 °C y 1 atm de presión para esterilizarlos.

### 3. Diseño experimental

En la Figura III.1 se recoge un esquema donde se ordenan de forma secuencial los pasos seguidos en el desarrollo del experimento realizado en el presente Trabajo Final de Grado.

Figura III.1. Esquema del diseño experimental seguido en el ensayo.



#### 4. Condiciones de la biosíntesis

En la primera fase del experimento, se inocularon los matraces que contienen el medio de cultivo optimizado (Tabla III.3). La fase de la curva de crecimiento donde mayor cantidad de riboflavina se produce es en la fase estacionaria, lo que indica que la maquinaria celular se destina a la producción de este metabolito disminuyendo la tasa de crecimiento. Por este motivo, este medio de cultivo es óptimo, ya que aporta los nutrientes mínimos necesarios para asegurar la supervivencia del hongo al mismo tiempo que se destina la maquinaria celular hacia la producción de vitamina.

En la segunda fase del experimento, se iban a emplear los matraces que contienen los medios de cultivo con sustratos residuales (Tabla III.4 y Tabla III.5). Lo que se buscaba en esta fase es la sustitución de los componentes químicos de los medios de cultivo por otros componentes que reduzcan el coste obteniendo los mismos beneficios, además de revalorizar los residuos al convertirlos en productos de valor añadido. Por ello, se planificó el empleo de sustratos oleaginosos, como el alperujo o el aceite de cocina usado, ya que el ciclo del glioxilato juega un papel fundamental en la síntesis de riboflavina cuando se acumulan ácidos grasos. Además, se introdujo otro medio de cultivo basado en la hidrólisis de hojas de tomate para que este hidrolizado sea utilizado como una abundante fuente de glucosa para generar Ribosa-5P, que actúa como precursor de la riboflavina.

Una vez inoculados los matraces se cubrieron con papel de aluminio porque la riboflavina es un compuesto fotosensible, finalmente se dejaron incubar en agitación (200 rpm) a una temperatura de 30 °C. Con las primeras cepas del ensayo, entre las que se incluye *A. gossypii*, se recogieron muestras cada 24 h para hacer la determinación de la producción de riboflavina, pero se observó que la máxima producción en el microorganismo control se daba a los 4 días, por ello se comenzaron a tomar muestras únicamente en este tiempo de incubación.

El ensayo para evaluar la producción de riboflavina únicamente pudo completarse en la primera parte del presente Trabajo Final de Grado. Es decir, únicamente se pudo evaluar la producción de vitamina sobre el medio de cultivo óptimo para la producción de esta. Este hecho es debido a la declaración del Estado de Alarma a causa del COVID-19, por lo que no se han podido obtener resultados sobre el empleo de los medios de cultivo con sustratos residuales, aunque estos sí que fueron preparados de forma previa.

#### 5. Determinación de la producción de riboflavina y la biomasa fúngica

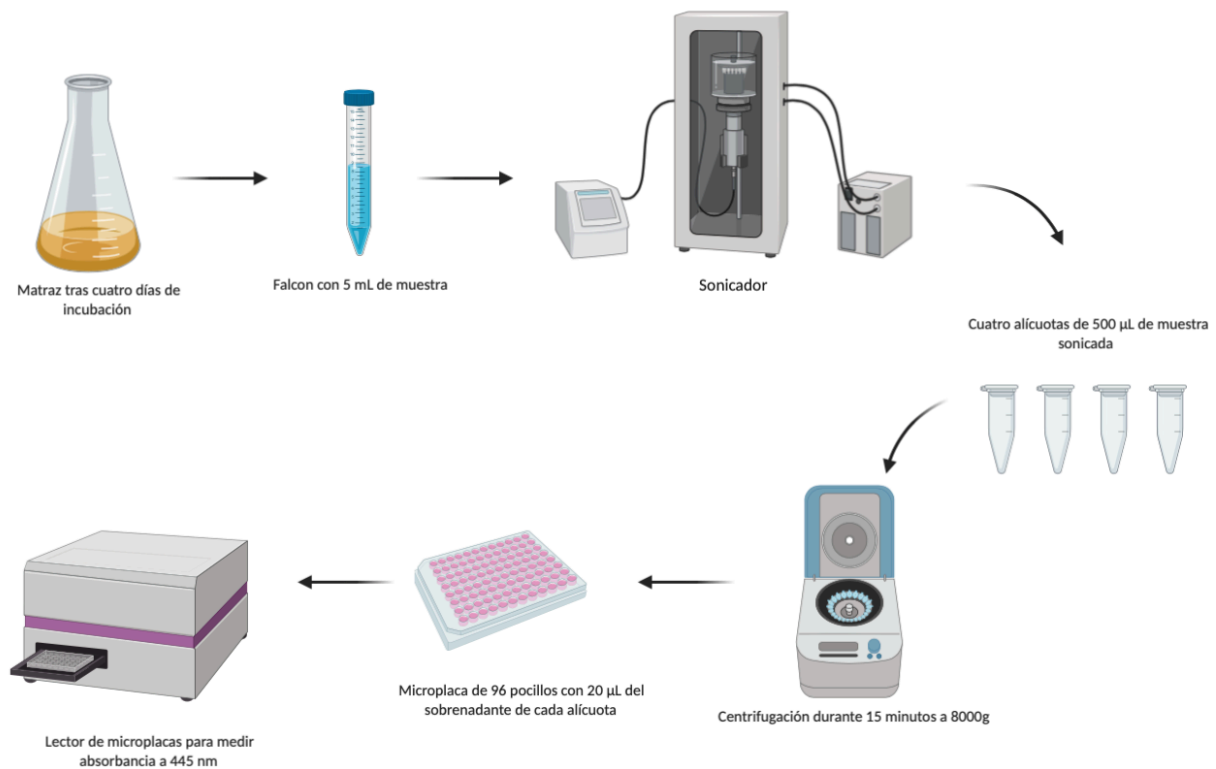
Una vez que pasaron los 4 días de incubación se procedió a la recogida de muestras, para ello se emplearon dos tubos Falcon, uno de ellos fue utilizado para la determinación de la producción y el otro para la cuantificación de la biomasa. El tubo empleado para determinar la concentración de riboflavina fue cubierto con papel de aluminio para preservar la vitamina ya que es altamente fotosensible. Ambos tubos contenían 5 mL de muestra.



Para la determinación de la cantidad de biomasa se procedió a la filtración de esta empleando un embudo y una malla filtrante. La biomasa fue depositada en vidrio de reloj pesado previamente y se dejó secando durante 12 h a 65 °C en la estufa. Finalmente, la cantidad de peso seco fue determinada mediante la diferencia de peso del vidrio de reloj vacío y con la biomasa seca y se expresó como gramo de peso seco por litro de cultivo.

Para la determinación de la cantidad de riboflavina (Fig. III.2) se procedió a la sonicación de las muestras mediante ultrasonidos (Branson Sonicator 150 [Branson Ultrasonics], Amplitud 40%) durante 3 minutos para liberar la riboflavina contenida en el micelio (Toribio *et al.*, 2020). Una vez sonicadas las muestras, se prepararon 4 alícuotas de 500  $\mu$ L cada una en tubos Eppendorfs de 1,5 mL cubiertos con papel de aluminio. Estas alícuotas fueron centrifugadas durante 15 minutos a 8000g. Posteriormente se incorporó 20  $\mu$ L del sobrenadante a una microplaca de 96 pocillos (ThermoFisher) que fue protegida de la luz hasta el momento de medir la absorbancia. Finalmente, se procedió a medir la absorbancia a 445 nm, ya que es la longitud de onda a la cual la riboflavina presenta su máximo de absorción, en un lector de microplacas (Biotek).

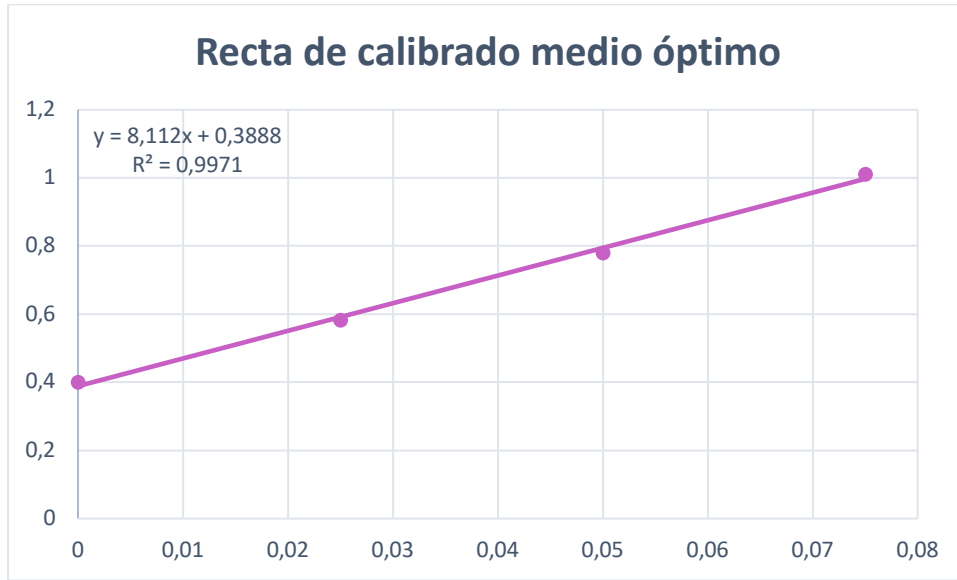
**Figura III.2. Proceso experimental de determinación de la cantidad de riboflavina.**



En primer lugar, se realizó una recta de calibrado para este medio de cultivo usando concentraciones crecientes de riboflavina comercial (Sigma) (Fig. III.3) con la finalidad de poder calcular la concentración de riboflavina presente en cada una de las muestras haciendo uso de la ordenada en el origen y de la pendiente de la recta. Una vez calculadas las concentraciones producidas por cada una de las cepas, se hizo la selección de las cepas que pasarían a la segunda fase del ensayo

con medios residuales en base a los miligramos de riboflavina producidos por cada gramo de peso seco de biomasa. Se eligió que esta forma de medir la concentración de vitamina es la más adecuada para hacer la selección puesto que nos permite establecer una relación entre la producción real en base al crecimiento de la cepa, ya que algunas cepas producen una gran cantidad de vitamina en términos de masa por unidad de volumen, pero al experimentar un gran crecimiento el rendimiento en términos de masa por gramo de peso seco era deficiente.

**Figura III.3. Recta de calibrado del medio de cultivo óptimo.**



La linealidad se ha encontrado en el rango de concentraciones situado entre los valores 0,075 mg/mL y 0 mg/mL llegando a obtener una recta de calibrado cuya  $R^2$  es 0,9971.

#### IV. Resultados y Discusión

A continuación, se describen los resultados obtenidos tras el desarrollo experimental de este trabajo y se realizará la discusión los mismos. Estos resultados están organizados en dos epígrafes diferentes, por lo que en primer lugar se desarrollan los resultados obtenidos a partir del medio de cultivo óptimo para la producción de riboflavina. En este primer apartado, se realiza una comparativa entre la producción de riboflavina por parte del control del experimento (*A. gossypii*) y las cepas seleccionadas de la colección obtenida a partir del proceso de compostaje. En segundo lugar, se desarrollarán los resultados obtenidos sobre los medios de cultivo con sustratos residuales donde se establecerá no solo la comparativa entre la producción de riboflavina de *A. gossypii* respecto a las cepas más productoras de la colección, sino también las diferencias de producción entre los distintos medios de cultivo.

## 1. Producción de riboflavina sobre el medio de cultivo óptimo

Haciendo uso de la recta de calibrado se calcularon las concentraciones de riboflavina a partir del promedio de las absorbancias. Finalmente, se calcularon los pesos secos de biomasa, y con ello se estimó la relación entre los miligramos de riboflavina obtenidos y los gramos de peso seco de biomasa (Tabla IV.1).

**Tabla IV.1. Resultados obtenidos en el ensayo con el medio de cultivo óptimo de *A. gossypii*, *A. niger* y las cepas seleccionadas de la colección.**

Especie	Concentración, mg/L	Peso seco, g/L	mg ribo/g peso seco
<i>Ashbya gossypii</i>	830,59	28	29,664
<i>Candida railenensis</i>	69,6068	50	1,3921
<i>Rhodotorula glutinis</i>	67,4834	28	2,4101
<i>Galactomyces candidum</i>	69,7115	28	2,4897
<i>Galactomyces geotrichum</i>	68,9657	26	2,6525
<i>Cryptococcus magnus</i>	71,1323	28	2,5404
<i>Penicillium spinulosum</i>	77,863	30	2,5954
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	75,943	40	1,8986
<i>Davidiella tassiana</i>	71,1076	32	2,2221
<i>Alternaria brassicae</i>	23,8166	24	0,9924
<i>Fusarium oxysporum</i>	30,7816	30	1,0261
<i>Pichia holstii</i>	26,1434	24	1,0893
<i>Candida mycentagii</i>	24,6148	24	1,0256
<i>Pyrenochaeta unguis-hominis</i>	25,7828	34	0,7583
<i>Fusarium equiseti</i>	25,9338	28	0,9262
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	57,1561	64	0,8931
<i>Fusarium solani</i>	38,3105	44	0,8707
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	37,6818	44	0,8564
<i>Yamadazyma mexicana</i>	23,2588	26	0,8946
<i>Trichoderma atroviride</i>	22,3773	30	0,7459
<i>Candida sequanensis</i>	37,0316	46	0,805
<i>Pichia mississippiensis</i>	39,4786	52	0,7592
<i>Penicillium commune</i>	24,6487	26	0,948
<i>Penicillium chrysogenum</i>	34,9513	60	0,5825
<i>Penicillium solitum</i>	18,072	8	2,259
<i>Microdochium nivale</i>	17,4032	8	2,1754
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32,3595	44	0,7354
<i>Kuraishia capsulata</i>	17,2368	22	0,7835
<i>Nakazawaea holstii</i>	19,2369	20	0,9618
<i>Fusarium delphinoides</i>	38,8098	42	0,924
<i>Penicillium brevicompactum</i>	31,1113	24	1,2963

Especie	Concentración, mg/L	Peso seco, g/L	mg ribo/g peso seco
<i>Pichia mexicana</i>	17,4125	8	2,1766
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	31,4565	12	2,6214
<i>Cladosporium lignicola</i>	18,901	34	0,5559
<i>Penicillium coprophilum</i>	44,6311	46	0,9702
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	32,6122	14	2,3294
<i>Pichia fermentans</i>	17,6898	8	2,2112
<i>Cryptococcus albidus</i>	30,045	16	1,8778
<i>Fusarium domesticum</i>	56,2469	24	2,3436
<i>Aspergillus ostianus</i>	29,555	12	2,4629
<i>Kwoniella mangroviensis</i>	45,2416	18	2,5134
<i>Cryptococcus flavescens</i>	38,8653	16	2,4291
<i>Acremonium antarcticum</i>	47,3188	38	1,2452
<i>Trichosporon dermatis</i>	61,446	26	2,3633
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	64,7251	26	2,4894
<i>Verticillium dahliae</i>	45,3002	18	2,5167
<i>Alternaria alternata</i>	57,4797	50	1,1496
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	45,4573	20	2,2729
<i>Emericella rugulosa</i>	58,7186	30	1,9573
<i>Cephalophora tropica</i>	68,0812	66	1,0315
<i>Ochrocladosporium frigidarii</i>	34,4089	18	1,9116
<i>Penicillium dipodomycola</i>	36,0608	34	1,0606
<i>Aspergillus terreus</i>	52,8322	40	1,3208
<i>Alternaria tenuissima</i>	48,0584	42	1,1442
<i>Stemphylium solani</i>	59,2178	46	1,2873
<i>Penicillium polonicum</i>	40,6003	44	0,9227
<i>Preussia australis</i>	72,6485	62	1,1718
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	56,3609	36	1,5656
<i>Scedosporium prolificans</i>	41,568	54	0,7698
<i>Scopulariopsis hibernica</i>	53,3161	44	1,2117
<i>Graphium putredinis</i>	65,0487	48	1,3552
<i>Penicillium lapidosum</i>	50,7951	58	0,8758
<i>Penicillium steckii</i>	45,7964	48	0,9541
<i>Microascus cirrosus</i>	68,8332	68	1,0123
<i>Aspergillus flavipes</i>	63,8221	36	1,7728
<i>Talaromyces thermophilus</i>	56,2808	72	0,7817
<i>Aspergillus niger</i>	68,787	38	1,8102

En la Figura IV.1 y en la Figura IV.2 se encuentran representados los resultados que figuran en la Tabla IV.1.

Figura IV.1. Producción de riboflavina por parte de las primeras 34 cepas seleccionadas de la colección. Las barras de error se utilizan para representar la desviación típica generada por las cuatro repeticiones realizadas en el ensayo. Las cepas más productoras han sido destacadas en amarillo.

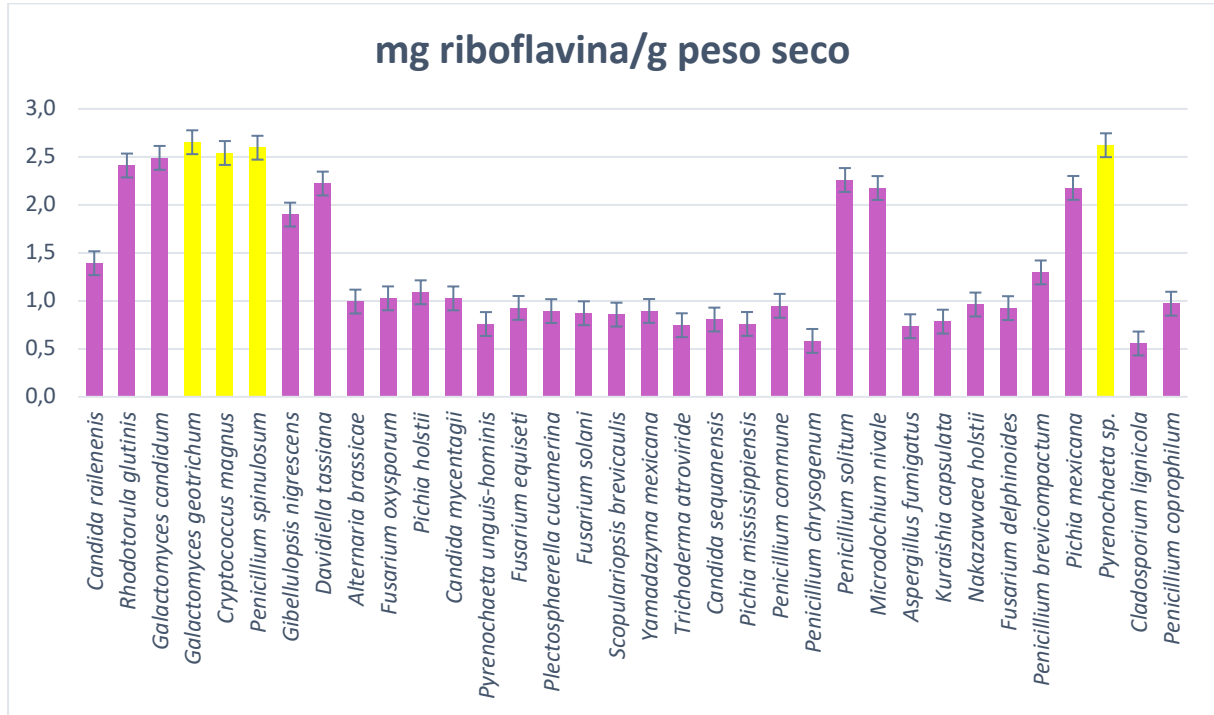


Figura IV.2. Producción de riboflavina por parte de *A. niger* y las últimas 31 cepas seleccionadas de la colección. Las barras de error se utilizan para representar la desviación típica generada por las cuatro repeticiones realizadas en el ensayo. Las cepas más productoras han sido destacadas en amarillo.

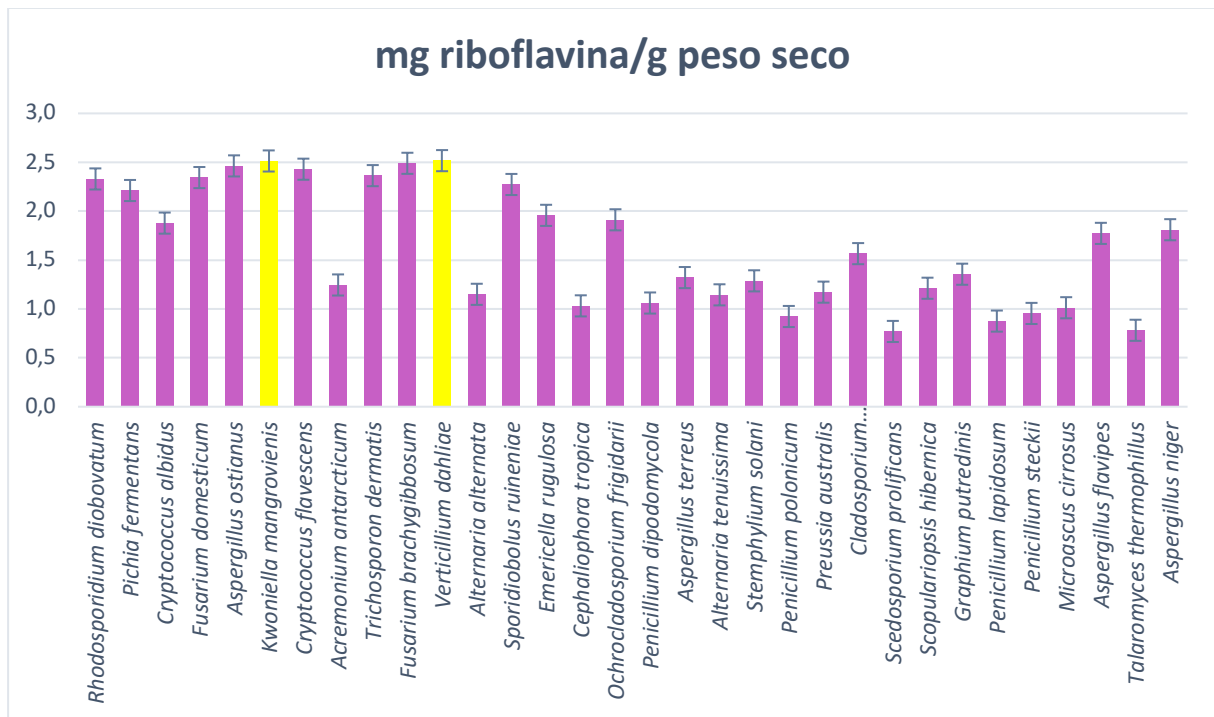


Figura IV.3. Representación de la concentración de riboflavina en mg/L por parte de las 34 primeras cepas de la colección. Las cepas más productoras (>70 mg/L) han sido destacadas en amarillo. Las barras de error se utilizan para representar la desviación típica producida por las 4 repeticiones realizadas en el ensayo.

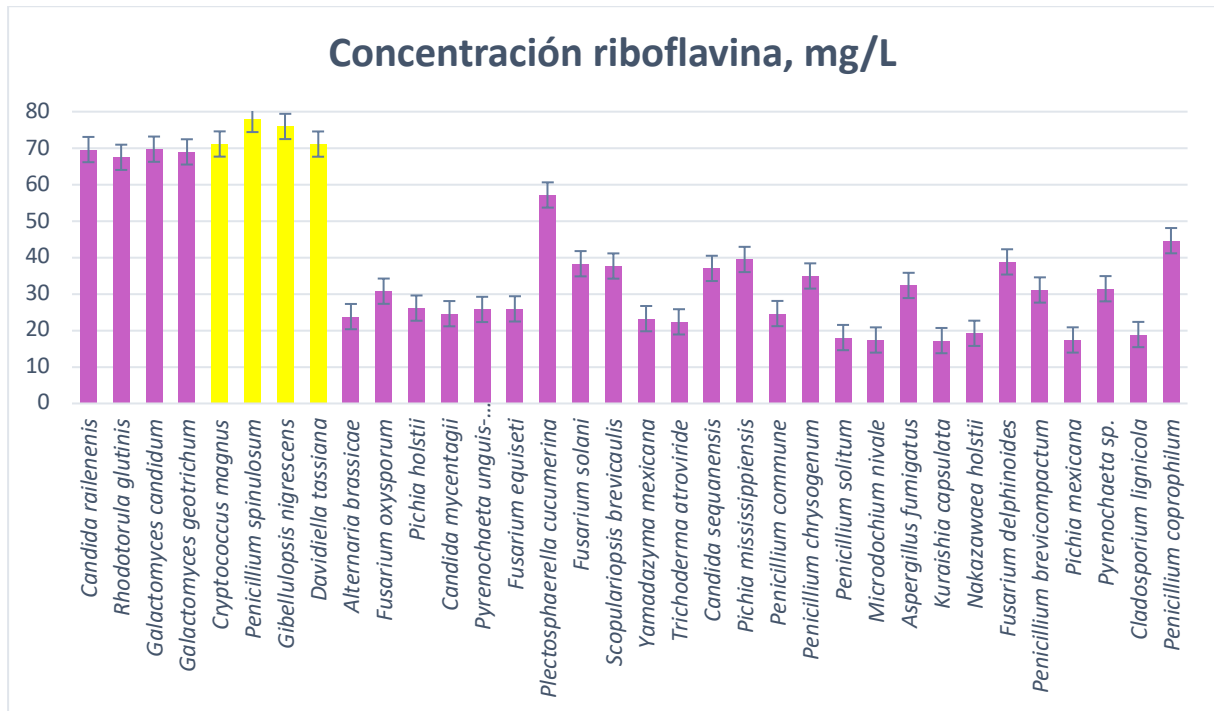
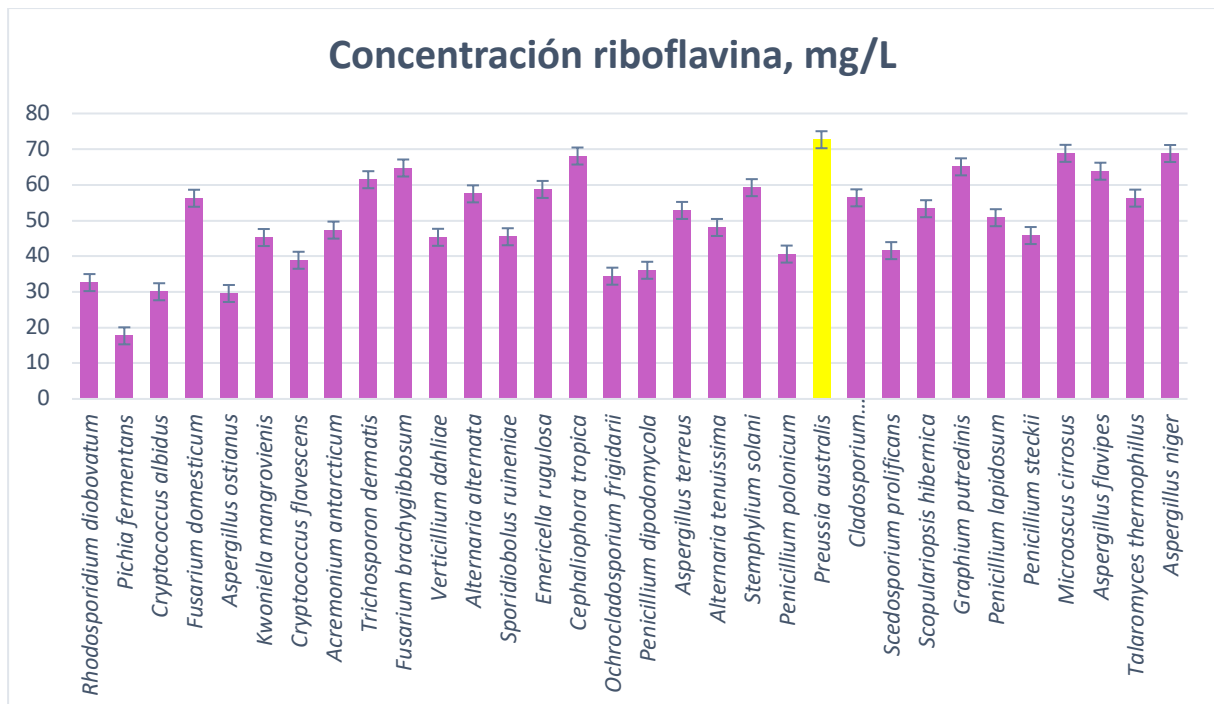


Figura IV.4. Representación de la concentración de riboflavina en mg/L por parte de *A. niger* y de las 31 últimas cepas de la colección. Las cepas más productoras (>70 mg/L) han sido destacadas en amarillo. Las barras de error se utilizan para representar la desviación típica producida por las 4 repeticiones realizadas en el ensayo.



En la Tabla IV.1, la Figura IV.1 y la Figura IV.2 se puede observar que se han obtenido los resultados esperados. Es decir, destacó la producción de riboflavina de *A. gossypii* sobre la capacidad productora de las demás cepas. Sin embargo, hay numerosas cepas que, aunque alejadas, muestran una adecuada capacidad metabólica de generación de riboflavina. Además, también se pudo observar que hay algunas cepas que *a priori* fueron buenas productoras porque sintetizaron concentraciones de riboflavina (Fig. IV.3 y Fig. IV.4) superiores a las que están descritas para cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Gomes *et al.*, 2014). Sin embargo, un número considerable de ellas, al establecer la relación mg de riboflavina/g de peso seco se vio que en realidad no producen tanta vitamina como se esperaba debido a que destinan gran parte de los nutrientes al desarrollo de la biomasa fúngica. Esto también ocurrió a la inversa, hay otras cepas que produjeron poca concentración de riboflavina, pero en relación con el crecimiento de su biomasa fueron muy buenas productoras. Estudios previos en *A. gossypii* han demostrado que la sobreproducción de riboflavina está relacionada con diversos tipos de estrés, como el oxidativo y el nutricional. La producción de riboflavina por parte de *A. gossypii* comienza al final de la fase exponencial de la curva de crecimiento, fase vinculada a la esporulación en cepas silvestres (Stahmann *et al.*, 2001), es por esto por lo que existe una relación inversamente proporcional entre el crecimiento de la cepa y la cantidad de riboflavina producida.

En base a estos resultados, las especies seleccionadas para la siguiente fase del presente Trabajo Final de Grado fueron: *Galactomyces geotrichum*, *Cryptococcus magnus*, *Penicillium spinulosum*, *Pyrenochaeta sp.*, *Kwoniella mangroviensis* y *Verticillium dahliae*. Por lo tanto, parece interesante conocer en detalle a estas especies microbianas y su relación en la literatura especializada con la generación de sustancias de interés biotecnológico.

En *G. geotrichum*, Grygier *et al.* (2019), han descubierto que la expresión de las proteínas depende de las condiciones de crecimiento a las que esté sometido el microorganismo. Estos autores han caracterizado las proteínas expresadas por *G. geotrichum* empleando un medio de cultivo que permite la producción de ácidos grasos poliinsaturados, encontrando un total de 218 proteínas diferentes en la biomasa celular y 206 proteínas en el sobrenadante, de las cuales 40 proteínas coincidían tanto en la biomasa como en el sobrenadante. Las proteínas sintetizadas por *G. geotrichum* consisten en proteínas implicadas en el ciclo de vida celular y en transformaciones bioquímicas para sintetizar compuestos bioactivos. También se han encontrado proteínas cuya función biológica es aún desconocida. Sin embargo, el análisis proteómico permitió identificar las enzimas necesarias para la síntesis de compuestos bioactivos (Du *et al.*, 2018). La proteína implicada en la biosíntesis de vitaminas del grupo B encontrada en el análisis proteómico de *G. geotrichum* es la PDX1-like protein. Esta proteína tiene como sitio de unión la Ribosa-5-fosfato, hecho que explica la relación con la síntesis de Vitamina B<sub>2</sub>. Además, se ha observado un aumento en la producción de riboflavina cuando se encuentra activa la GTPasa, que se encarga de sintetizar GTP. En este hongo, cuya fuente principal de carbono son los ácidos grasos, la biosíntesis de riboflavina comienza en los peroxisomas. El ciclo del glioxilato genera GTP y este, junto con la serina, están implicados en reacciones que conllevan a la biosíntesis de 6,7-dimetil-8-ribitilumazina, compuesto precursor de riboflavina en las últimas etapas de su biosíntesis.

En la base de datos EMBL (European Molecular Biology Laboratory), se establece que *P. spinulosum* presenta un gen homólogo al *VMA1* de *S. cerevisiae*, que codifica para la subunidad catalítica A de una H<sup>+</sup>-ATPasa. La función de esta enzima es mantener un pH ligeramente ácido en diferentes compartimentos de las células eucariotas, como por ejemplo en las vacuolas. El pH ligeramente ácido es el pH óptimo para la producción de vitamina B<sub>2</sub> y para el mantenimiento de esta en los compartimentos celulares donde se almacena como es el caso de la vacuola de las células eucariotas, esto es debido a que el pH alcalino provoca la lisis del micelio cesando la biosíntesis de vitamina.

Según la base de datos EMBL, *Pyrenochaeta* sp., *K. mangroviensis* y *V. dahliae* son capaces de expresar una 3-oxoacil-CoA reductasa de cadena muy larga que se encuentra también en *S. cerevisiae*, tal y como se expone en BRENDA (Enzyme Database), formando parte de un complejo elongador de ácidos grasos. Cuando se acumulan grandes cantidades de ácidos grasos, el ciclo del glioxilato juega un papel fundamental en la biosíntesis de riboflavina, por lo que este hecho explica la capacidad productora de *Pyrenochaeta* sp., de *K. mangroviensis* y *V. dahliae*.

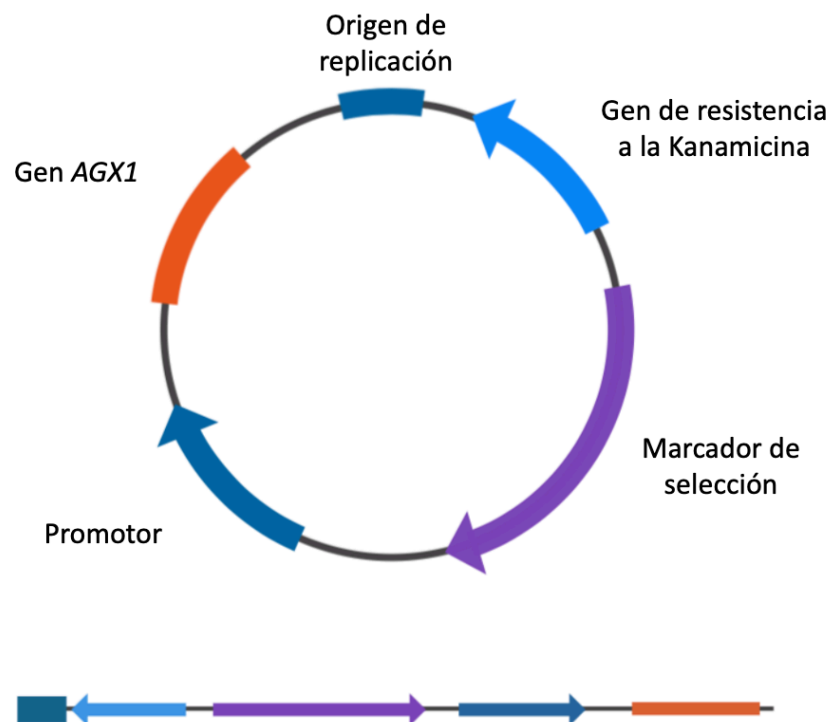
*C. magnus* sintetiza una gran diversidad de enzimas hidrolasas según la base de datos EMBL. Estas enzimas son capaces de catalizar la ruptura de multitud de enlaces químicos empleando como sustrato el agua. Fundamentalmente, estas enzimas se emplean para la hidrólisis de macromoléculas pudiendo generar biomoléculas más sencillas que nuestro hongo puede utilizar para la biosíntesis de vitamina debido a que los sustratos más utilizados para la síntesis de riboflavina son los azúcares sencillos y los aminoácidos libres, cuando la concentración de estos en el medio de cultivo es alta, la biosíntesis de riboflavina incrementa su productividad.

Todos estos aislados fúngicos tienen algo en común, los genes que codifican para enzimas relacionadas con la síntesis de riboflavina presentan homología con los genes propios de *S. cerevisiae* que se encuentran englobados dentro de la red metabólica de este eucariota que también presenta grandes capacidades de producción de vitamina B<sub>2</sub>. En lo que respecta al metabolismo de los aminoácidos, la L-treonina aldolasa de baja especificidad (EC 4.1.2.48) se encuentra en *A. gossypii*, pero presenta homología con el gen *GLY1* de *S. cerevisiae*. Esta enzima está relacionada con la formación de glicina, un precursor de la biosíntesis de purinas (Gomes *et al.*, 2014). Dado que esta enzima es menos específica que la L-treonina aldolasa (EC 4.1.2.5) presente en *A. gossypii* y no en *S. cerevisiae*, se puede concluir que este es uno de los motivos por los que *A. gossypii* se emplea como superproductor, ya que genera mayor cantidad de glicina puesto que hay más sustrato disponible para ello. Sin embargo, en *S. cerevisiae* se encuentra un gen denominado *AGX1* que codifica para una alanina:glioxilato aminotransferasa (EC 2.6.1.44) que está ausente en *A. gossypii*, lo que puede tener un impacto significativo en la biosíntesis de riboflavina ya que conduce a una de las principales rutas de formación de glicina en las levaduras. Kato *et al.* (2006) han construido dos plásmidos (Fig. IV.5) que contienen una secuencia de replicación autónoma de *S. cerevisiae*. Usando estos vectores, se ha insertado el gen *AGX1* en *A. gossypii*. La construcción contiene el gen de resistencia a la kanamicina, bajo el control de un promotor y un terminador además del factor de elongación TEF. Con esta



construcción se ha conseguido una eficiencia de transformación de 10 a 20 transformantes por microgramo de ADN plasmídico y además se ha conseguido incrementar la capacidad productora de *A. gossypii*, ya que en medios de cultivo que contienen glucosa o aceite de colza se han conseguido concentraciones de riboflavina de 20 mg/L y 150 mg/L respectivamente. En presencia de glioxilato, la concentración específica de riboflavina se ha conseguido que sea hasta 2 veces mayor que las cepas de *A. gossypii* que carecen de *AGX1*.

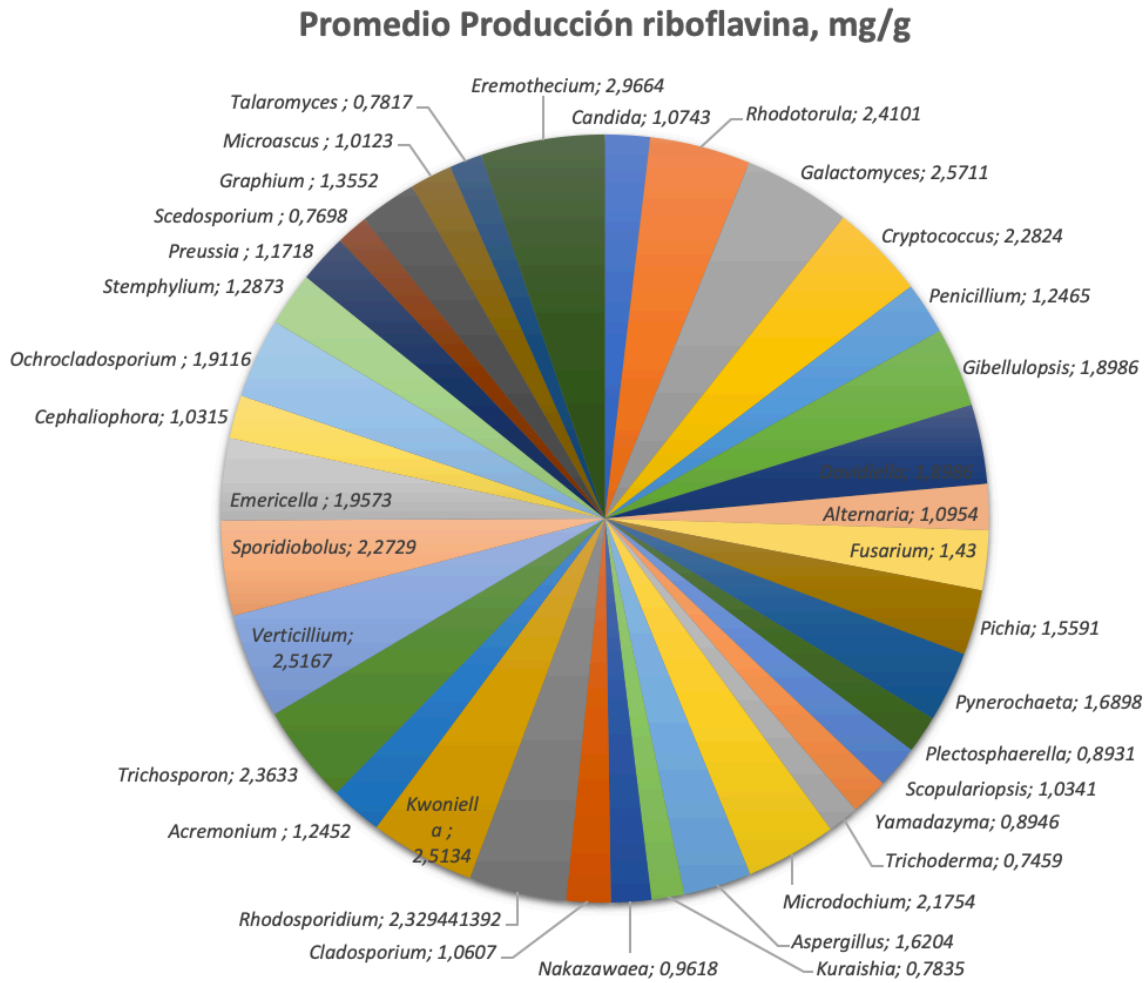
**Figura IV.5. Modelo de construcción génica para la inserción del gen *AGX1* de *S. cerevisiae* en *A. gossypii*.**



Este hecho confirma los estudios previos que afirman la mejora de la producción de vitamina B<sub>2</sub> a través de la introducción de estos genes en *A. gossypii* debido a la capacidad de este de poder expresar proteínas heterólogas. Además, el genoma de *A. gossypii* es más sencillo que el de *S. cerevisiae* y los demás aislados eucariotas con genes homólogos a los de este, lo que proporciona una mayor facilidad de manipulación a la hora de expresar genes exógenos.

Resulta de gran interés realizar un estudio sobre la biodiversidad de géneros fúngicos que se han utilizado en esta fase del experimento de forma que se pueda establecer una relación entre el género y la capacidad de producción de riboflavina. Para ello, haciendo uso de la Tabla IV.1 se han agrupado las especies por géneros y se ha calculado el promedio de la concentración de riboflavina dentro de cada género (Fig. IV.6).

Figura IV.6. Diagrama de sectores donde se observa el promedio de producción de riboflavina de cada uno de los géneros representado en términos de g de riboflavina/g de peso seco de biomasa.



En la Fig. IV.6 se puede observar que hay diversos géneros que fueron muy buenos productores. Para establecer un estudio de biodiversidad por géneros que sea significativo, el análisis se va a realizar teniendo en cuenta solo aquellos géneros que estén representados con más de una especie para poder valorar el promedio de concentración obtenido. Teniendo esto en cuenta, los géneros más productores fueron *Galactomyces* y *Cryptococcus*. Dentro de estos géneros se encuentran las especies *Galactomyces candidum*, *Galactomyces geotrichum*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus flavescens*. Todas estas especies presentaban altos valores de producción, tal y como se observa en la Figura IV.1 y IV.2, y además fueron muy homogéneos dentro de cada género lo que hace que el promedio de la concentración de riboflavina fuese elevado en ambos casos. Por otro lado, en géneros como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pyrenochaeta*, *Penicillium* y *Pichia* se observa que, por lo general, el género no fue buen productor, pero hay una especie dentro de cada uno de los géneros que hace que el promedio de la producción de vitamina aumentase siendo algunas de estas especies pertenecientes al grupo de las más productoras que se seleccionaron para pasar a la siguiente fase del ensayo, como es el caso de *Penicillium spinulosum* y *Pyrenochaeta* sp. Los otros géneros que poseen especies situadas entre las más productoras son *Kwoniella* y *Verticillium*, sin embargo, como no tienen

más representación de especies en este ensayo no se puede establecer una comparativa entre las distintas especies del género como en los casos anteriores.

## 2. Producción de riboflavina sobre medios de cultivo con sustratos residuales

De forma previa al desarrollo de este epígrafe, cabe destacar que todo lo que se expondrá a continuación son los resultados esperados que se hubieran obtenido en caso de haber podido realizar esta última parte del presente Trabajo Final de Grado. Esta última parte, consiste en el análisis de los resultados obtenidos sobre medios de cultivo basados en sustratos residuales, sin embargo, el desarrollo de este último ensayo se ha visto mermado por el Estado de Alarma debido al coronavirus. Por este motivo, se ha tenido que indagar en bibliografía para buscar estudios previos similares donde se usen estos medios de cultivo para la producción de riboflavina, o en su defecto, de otros compuestos bioactivos similares.

Wei *et al.* (2013) investigaron la utilización del aceite de cocina usado por parte de *A. gossypii* para generar riboflavina. Para este experimento usaron *A. gossypii* ATCC 10895-32, una cepa generada mediante mutagénesis con luz ultravioleta. Para determinar el pH inicial óptimo del medio de cultivo, se sometió a la cepa antes mencionada a diferentes tratamientos. La producción de riboflavina y la transformación del aceite son mayores cuando el pH inicial se encuentra en el rango de 6 a 6,5. La concentración de riboflavina alcanza los 4,78 g/L cuando el pH inicial se ajusta a valores próximos a 6,5.

Debido a que todos los parámetros (pH, cantidad de biomasa, aminoácidos libres y azúcares reducidos) fueron monitoreados durante la fermentación, se ha observado que el pH inicial se reduce drásticamente de 6,5 hasta 5,25 en el primer día del ensayo. Durante este periodo, se sintetiza una menor cantidad de riboflavina debido a la acidificación del medio. Sin embargo, después del primer día, el pH va incrementándose y con él lo hace también la síntesis de vitamina. Cuando el pH alcanza valores en el rango de 6,5 a 6,92, *A. gossypii* entra en la fase estacionaria de crecimiento y comienza a sobreproducir riboflavina. La concentración de aminoácidos libres también decrece durante los dos primeros días, así como los niveles de azúcares. Esto es debido a que utilizan los aminoácidos libres para sintetizar sus propias proteínas estructurales y por tanto también se corresponde con la fase inicial de la curva de crecimiento que se corresponde con una zona de crecimiento exponencial. Después de estos primeros días, el incremento de aminoácidos libres y de azúcares se usa para incrementar la producción de riboflavina, pero el aumento del pH alcaliniza el medio de cultivo, lo que provoca la lisis del micelio. Cuando esto ocurre finaliza la producción de riboflavina.

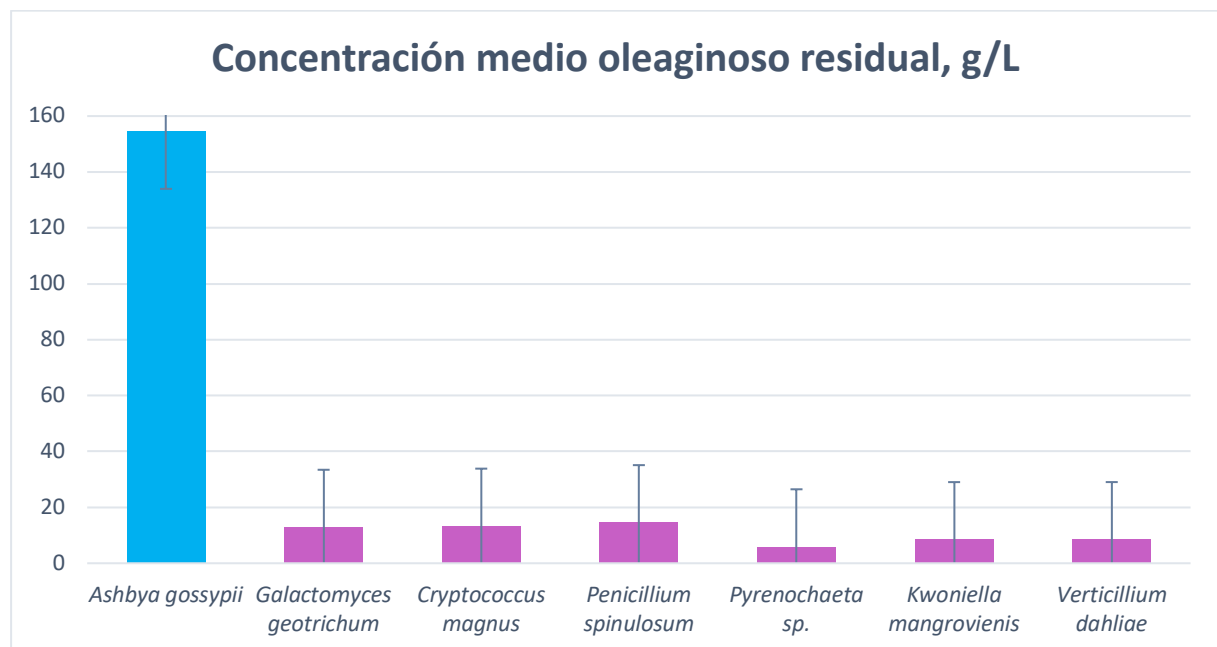
Además, se ha establecido que la concentración de riboflavina obtenida cuando se usan medios de cultivo que emplean sustratos oleaginosos residuales es 5,37 veces menor que la concentración máxima alcanzada por cepas superproductoras de *A. gossypii* empleando medios de cultivo óptimos (Jeong *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2013). Con este dato se puede realizar una estimación de lo que hubiera ocurrido en caso de haber podido inocular los matraces que contenían los medios de cultivo residuales

basados en sustratos oleaginosos compuestos por aceite de cocina usado y residuos de alperujo con la cepa control y las 6 cepas más productoras de la colección procedente del compostaje (Tabla IV.2) (Fig. IV.7).

**Tabla IV.2. Estimación de las concentraciones de riboflavina que se hubieran obtenido al realizar el ensayo con medios de cultivo basados en sustratos residuales oleaginosos.**

Especie	Concentración medio óptimo, mg/L	Concentración medio oleaginoso residual, mg/L
<i>Ashbya gossypii</i>	830,59	154,67
<i>Galactomyces geotrichum</i>	68,9657	12,842
<i>Cryptococcus magnus</i>	71,1323	13,246
<i>Penicillium spinulosum</i>	77,863	14,499
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	31,4565	5,857
<i>Kwoniella mangroviensis</i>	45,2416	8,424
<i>Verticillium dahliae</i>	45,3002	8,435

**Figura IV.7. Concentración de riboflavina expresada en unidades de masa por unidad de volumen. En azul está representada la cepa control (*A. gossypii*) y en rosa las cepas más productoras seleccionadas de la primera fase del experimento. Las barras de error se utilizan para representar la desviación típica producida por las 4 repeticiones del experimento.**



Por otro lado, la biomasa lignocelulósica es una materia prima renovable de bajo costo que presenta en su composición una gran cantidad de celulosa, un carbohidrato ampliamente estudiado para su uso en biorrefinerías para producir bioenergía, biopolímeros, productos farmacéuticos, nutrientes, pigmentos, tensioactivos y otros productos, a partir de diferentes fracciones de biomasa celulósica. Los productos con alto valor económico como las vitaminas B<sub>7</sub>, B<sub>12</sub>, C, E, riboflavina, xilitol

y ácido láctico pueden obtenerse a partir de azúcares liberados después de la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa presentes en la biomasa (Terán *et al.*, 2018). La finalidad de realizar la hidrólisis de los residuos lignocelulósicos es la obtención de azúcares simples que la biomasa fúngica pueda utilizar para incrementar la producción de riboflavina. Esto es debido a que los azúcares son los precursores de los nucleótidos de purinas que intervienen en la biosíntesis de riboflavina. El rendimiento esperado es semejante al que se obtiene en la utilización de los medios de cultivo con sustratos oleaginosos procedentes del alperujo y del aceite de cocina usado (Tabla IV.2) debido a que se basa también en la utilización de los azúcares libres y/o cuerpos lipídicos para la biosíntesis de riboflavina.

## V. Conclusiones

- 1- El proceso de compostaje actúa como una fuente muy importante para la obtención de microorganismos con una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas donde destacan los aislados fúngicos, ya que presentan una versatilidad enzimática y, por tanto, metabólica muy importante para la obtención de productos de valor añadido, como la riboflavina.
- 2- La producción de riboflavina fue muy superior en la especie control (*A. gossypii*) respecto a las especies aisladas del proceso de compostaje, pero se detectaron algunas especies que fueron muy buenas productoras y se situaron por encima de los valores obtenidos por otros productores reconocidos como *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3- Las especies más productoras seleccionadas sobre el medio de cultivo óptimo para la síntesis de vitamina presentaron diversos genes implicados en la síntesis de riboflavina y que tienen homología con genes de *S. cerevisiae*, levadura productora de riboflavina. Por tanto, es de especial interés la inserción de estos genes en el genoma de *A. gossypii*, ya que es más sencillo de manipular que el de las demás especies, para aumentar aún más la producción de riboflavina.
- 4- Los géneros más productores fueron *Galactomyces* y *Cryptococcus*. Se trata de dos géneros levaduriformes próximos taxonómicamente a la cepa control, por lo que, con toda probabilidad, existe la presencia de rutas metabólicas similares que induzcan la generación de riboflavina.
- 5- A pesar de que, según la literatura especializada, la producción de riboflavina sobre medios de cultivo con sustratos residuales es 5,37 veces menor que la producción sobre medios de cultivo optimizados es de especial interés la capacidad de utilización de residuos lipídicos y lignocelulósicos para obtener productos bioactivos de alto valor añadido como la riboflavina.

## VI. Bibliografía

- Abalde, J., Fabregas, J., 1991. Beta-carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources, *Bioresource of Technology* 38 121–125.
- Aguiar, T.Q., Maaheimo, H., Heiskanen, A., Wiebe, M.G., Penttilä, M., Domingues, L., 2013. Characterization of the *Ashbya gossypii* secreted N-glycome and genomic insights into its N-glycosylation pathway. *Carbohydrate Research*, 381, 19-27.
- Aguiar, T.Q., Dinis, C., Magalhães, F., Oliveira, C., Wiebe, M.G., Penttilä, M., Domingues, L., 2014. Molecular and functional characterization of an invertase secreted by *Ashbya gossypii*. *Molecular Biotechnology* 56, 524–534.
- Aguiar, T.Q., Silva, R., Domingues, L., 2015. *Ashbya gossypii* beyond industrial riboflavin production: A historical perspective and emerging biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33, 1774-1786.
- Akompong, T., Ghorri, N., Halder, K., 2000. In vitro activity of riboflavin against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44, 88-96.
- Althöfer, H., Pompeu, M., Revuelta, J.L., Santos, M., Jiménez A., Benito, R., Santamaria, R., Fernandez, J., 2001. Protein production using *Ashbya gossypii*. WO Patent No. 2001/023576.
- Bazzanella, A.M., Ausfelder, F., 2017. Low carbon energy and feedstock for the european chemical industry. Frankfurt am Main. [http://dechema.de/dechema\\_media/Technology\\_study\\_Low\\_carbon\\_energy\\_and\\_feedstock\\_for\\_the\\_European\\_chemical\\_industry-p-20002750.pdf](http://dechema.de/dechema_media/Technology_study_Low_carbon_energy_and_feedstock_for_the_European_chemical_industry-p-20002750.pdf). Consultado en abril de 2020.
- Beopoulos, A., Nicaud, J., Gaillardin, C., 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 1193–1206.
- BRENDA (Enzyme Database). <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.330>. Consultado el 14 de mayo de 2020.
- Carus, M., Raschka, A., 2018. Renewable carbon is key to a sustainable and future-oriented chemical industry. Nova-Institute, Germany.
- Creutzig, F., Ravindranath, N.H., Berndes, G., Bolwig, S., Bright, R., Cherubini, F., Chum, H., Corbera, E., Delucchi, M., Faaji, A., Fargione, J., Haberl, H., Heath, G., Lucon, O., Plevin, R., Popp, A.,

- Robledo-Abad, C., Rose, S., Smith, P., Stromman, A., Suh, S., Masera, O., 2015. Bioenergy and climate change mitigation: an assessment. *Gcb Bioenergy* 7(5), 916–944.
- Daiglou, V., Doleman, J.C., Wicke, B., Faaji, A., van Vuuren, D.P., 2019. Integrated assessment of biomass supply and demand in climate change mitigation scenarios. *Global Environmental Change Journal* 54.
- Davis, C.B., Aid, G., Zhu, B., 2017. Secondary resources in the bio-based economy: A computer assisted survey of value pathways in academic literature. *Waste and biomass valorization* 8, 2229-2246.
- De Jong, E., Higson, A., Walsh, P., Wellisch, M., 2012. Bio-Based Chemicals. Value Added Products from Biorefineries. IEA Bioenergy. <https://www.ieabioenergy.com/> Consultado abril 2020.
- De Jong, S., Van Stralen, J., Londo, Marc, Hoefnagels, R., Faaij, A., Junginger, M., 2018. Renewable jet fuel supply scenarios in the European Union in 2021-2030 in the context of proposed biofuel policy and competing biomass demand. *GCB Bioenergy*, 10, 9.
- Demain, A.L., 1972. Riboflavin oversynthesis. *Annual Review of Microbiology* 26, 369–388.
- Du, C., Wenzel, G.P., 2018. Mining for microbial gems: Integrating proteomics in the postgenomic natural product discovery pipeline. *Proteomics* 2018, 18. [CrossRef] [PubMed]
- Duane, W., Hastings, J.W., 1975. Flavin mononucleotide reductase of luminous bacteria. *Molecular Cell Biochemistry*, 6, 53-64.
- EMBL (European Molecular Biology Laboratory). <https://www.ebi.ac.uk/enzymeportal/ec/1.1.1.330>. Consultado el 14 de mayo de 2020.
- EMBL (European Molecular Biology Laboratory). [https://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi?db=enzymes&query=Cryptococcus%20magnus&requestFrom=ebi\\_index](https://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi?db=enzymes&query=Cryptococcus%20magnus&requestFrom=ebi_index). Consultado el 15 de mayo de 2020.
- European Commission, 2012. Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe. Brussels. [https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/pdf/official-strategy\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/pdf/official-strategy_en.pdf) Consultado abril 2020.
- Fund, C., El-Chichakli, B., Patemann, C., 2018. Bioeconomy Policy (Part III): Update Report of National Strategies Around the World. Berlin. [https://ec.europa.eu/knowledge4policy/publication/bioeconomy-policy-part-iii-update-report-national-strategies-around-world\\_en](https://ec.europa.eu/knowledge4policy/publication/bioeconomy-policy-part-iii-update-report-national-strategies-around-world_en) Consultado abril 2020.

- Gomes, D., Aguiar, T.Q., Dias, O., Ferreira, E.C., Domingues, L., Rocha, I., 2014. Genome wide metabolic re-annotation of *Ashbya gossypii*: new insights into its metabolism through a comparative analysis with *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. BMC Genomics 15, 810.
- Grygier, A., Myska, K., Szwengiel, A., Stuper-Szablewska, K., Pawlicka-Kaczorowska, J., Chwatko, G., Rudzinska, M., 2019. Production of Bioactive Compounds by Food Associated *Galactomyces geotrichum* 38, as Determined by Proteome Analysis. MDPI, Nutrients 2019, 11, 471.
- Hancock, R.D., Viola, R., 2002. Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. Trends Biotechnology, 20, 299-305.
- Hedayati, R., Hosseini, M., Najafpour, G.D., 2020. Optimization of semi-anaerobic vitamin B12 (cyanocobalamin) production from rice bran oil using *Propionibacterium freudenreichii* PTCC1674. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 23, 101444.
- Horiuchi, J., Hiraga, K., 1999. Industrial application of fuzzy control to large-scale recombinant vitamin B<sub>2</sub> production. Journal Bioscience and Bioengineering, 87, 63-70.
- International Energy Agency (IEA), 2018. The Future of Petrochemicals - Towards More Sustainable Plastics and Fertilisers. Journal Information. The future of optimism. American Psychologist, 55(1), 44–55.
- Jeong, B.Y., Wittmann, C., Kato, T., Park, E.Y., 2015. Comparative metabolic flux analysis of an *Ashbya gossypii* wild type strain and a high riboflavin-producing mutant strain. Journal of Bioscience and Bioengineering, 119, 101-106.
- Juárez, O., Nilges, M.J., Gillespie, P., Cotton, J., Barquera, B., 2008. Riboflavin is an active redox cofactor in the Na<sup>+</sup>-pumping NADH: quinone oxidoreductase (Na<sup>+</sup>-NQR) from *Vibrio cholerae*. Journal of Biological Chemistry. 283, 33162-33167.
- Karos, M., Vilariño, C., Bollschweiler, C., Revuelta, J.L., 2004. A genome-wide transcription analysis of a fungal riboflavin overproducer. Journal of Biotechnology 113, 69–76.
- Kato T., Park E.Y., 2006. Expression of alanine:glyoxylate aminotransferase gene from *Saccharomyces cerevisiae* in *Ashbya gossypii*. Applied Microbiology Biotechnology 71, 46–52.
- Kato, T., Park, E.Y., 2012. Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. Biotechnology Letters 34, 611–618.
- Kavitha, S., Chandra, T.S., 2009. Effect of vitamin E and menadione supplementation on riboflavin production and stress parameters in *Ashbya gossypii*. Process Biochemistry 44, 934–938.



- Kavitha, S., Chandra, T.S., 2014. Oxidative stress protection and glutathione metabolism in response to hydrogen peroxide and menadione in riboflavinogenic fungus *Ashbya gossypii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* volume 174, pages 2307–2325 (2014).
- Kruger, N.J., von Schaewen, A., 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 236–246
- Krymchantowski, A.V., Bigal, M.E., Moreira, P.F., 2002. New and emerging prophylactic agents of migraine. *CNS Drugs* 16, 611–634.
- Lara, J., Crispin-Sánchez, J., Amaro J.M., 2001. Producción de Riboflavina (Vitamina B<sub>2</sub>) por *Ashbya gossypii* ATCC 10895. Facultad de Farmacia Universidad de Los Andes, Venezuela, Vol. 42.
- Ledesma-Amaro, R., Santos, M.A., Jiménez, A., Revuelta, J.L., 2014. Strain design of *Ashbya gossypii* for single-cell oil production. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1237–1244.
- Lim, S.H., Choi, J.S., Park, E.Y., 2001. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: an overview. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 6, 75–88.
- Liu, Y., van Bennekom, E.O., Zhang, Y., Abee, T. and Smid, E.J., 2019. Long-chain vitamin K2 production in *Lactococcus lactis* is influenced by temperature, carbon source, aeration and mode of energy metabolism. *Microbial Cell Factories* 18, 129.
- Magalhães, F., Aguiar, T.Q., Oliveira, C., Domingues, L., 2014. High-level expression of *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase in *Ashbya gossypii*. *Biotechnology Progress* 30, 261–268.
- Manna, M.C., Sahu, A., Nirmal De, Thakur, J.K., Mandal, A., Bhattacharjya, S., Ghosh, A., Mahmudur-Rahman, M., Naidu, R., Bhan-Singh, U., Dakhli, R., Sharma, M.P., Misra, S., 2020. Novel bio-filtration method for the removal of heavy metals from municipal solid waste. *Environmental Technology and Innovation* 17, 100619.
- Martínez-Gallardo, M.R., López M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez J.A., Moral, R., Joaquín Moreno, J., 2020. Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through in situ composting assisted by bioaugmentation. *Science of The Total Environment* 703, 135537.
- Mawhood, R., Gazis, E., De Jong, S., Hoefnagels, R., Slade, R., 2016. Production pathways for renewable jet fuel: a review of commercialization status and future prospects. *Biofuels Bioproducts and Biorefining* 10(4), 462–484.

- McCormick, K., Kauto, N., 2013. The bioeconomy in Europe: an overview. *MDPI Sustainability (Switzerland)* 5 (6), 2589-2608.
- Moreno, J. y Mormeneo, S. 2011. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno, J. y Moral, R. *Compostaje*. pp. 111-140. Mundi-prensa, Madrid.
- Narayanan-Iyer, S., Behary, N., Nierstrasz, V., Guan, J., Chen, G., 2019. Study of photoluminescence property on cellulosic fabric using multifunctional biomaterials riboflavin and its derivative Flavin mononucleotide. *Scientific Reports* 9, 8696.
- Park, E.Y., Ito, Y., Nariyama, M., Sugimoto, T., Lies, D., Kato, T., 2011. The improvement of riboflavin production in *Ashbya gossypii* via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 1315–1326.
- Pollegioni, L., Porrini, D., Molla, G., Pilone, M. S., 2000. Redox potentials and their pH dependence of d-amino-acid oxidase of *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis*. *European Journal of Biochemistry* 267, 6624–6632.
- Ravasio, D., Wendland, J., Walther, A., 2014. Major contribution of the Ehrlich pathway for 2-phenylethanol/rose flavor production in *Ashbya gossypii*. *FEMS Yeast Research* 14, 833–844.
- Razza, F., D'Avino, L., L'Abate, G., Lazzeri, L., 2018. The role of compost in bio-waste management and circular economy. In: Benetto, E., Gericke, K., Guiton, M. (Eds.), *Designing Sustainable Technologies, Products and Policies*. Springer, Cham, Switzerland, pp. 133-143.
- Ribeiro, O., Wiebe, M., Ilmén, M., Domingues, L., Penttilä, M., 2010. Expression of *Trichoderma reesei* cellulases CBHI and EGI in *Ashbya gossypii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 1437–1446.
- Rogelj, J., Shindell, D., Jiang, K., Fifita, S., Forster, P., Ginzburg, V., Handa, C., Kheshgi, H., 2018. Mitigation pathways compatible with 1.5°C in the context of sustainable development. In: Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pörtner, H.O., Roberts, D., Skea, J., Shukla, P.R., Pirani, A., Moufouma-Okia, W., Péan, C., Pidcock, R., Connors, S., Matthews, J.B.R., Chen, Y., Zhou, X., Gomis, M.I., Lonnoy, E., Maycock, T., Tignor, M. (Eds.), *Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the Impacts of Global Warming of 1.5°C Above Pre-Industrial Levels and Related Global Greenhouse Gas Emission Pathways, in the Context of Strengthening the Global Response to the Threat of Climate Change*, Ed. T. Waterfield. IPCC.
- Ros, M., Klammer, S., Knapp, B., Aichberger, K., Insam, H., 2006. Long-term effects of compost amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity. *Soil Use and Management* 22, 209-218.

- Rose, S.K., Kriegler, E., Bibas, R., Calvin, K., Popp, A., Van Vuuren, D.P., Wetant, J., 2014. Bioenergy in energy transformation and climate management. *Climatic Change* 123 (3–4), 477–493.
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M.L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P.S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López-Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R.E., Wester, P., Costa, L., Dierick, N., Glandorf, B., Herman, L., Kärenlampi, S., Leng, L., Tebbe, C., Aguilera, J., Manini, P., Tarrés-Call, J., Wallace, R.J., 2018. Safety and efficacy of Vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin) produced by *Ashbya gossypii* for all animal species based on a dossier submitted by BASF SE. *EFSA Journal*, European Comission, EFSA-Q-2012-00953.
- Schlösser, T., Schmidt, G., Stahmann, K.P., 2001. Transcriptional regulation of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Microbiology* 147, 3377–3386.
- Schlösser, T., Wiesenburg, A., Gätgens, C., Funke, A., Viets, U., Vijayalakshmi, S., et al., 2007. Growth stress triggers riboflavin overproduction in *Ashbya gossypii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 569–578.
- Schmidt, G., Stahmann, K.P., Kaesler, B., Sahm, H., 1996a. Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiology* 142, 419–426.
- Schmidt, G., Stahmann, K.P., Sahm, H., 1996b. Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potential antimetabolites for the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiology* 142, 411–417.
- Schwechheimer, S.K., Becker, J., Peyriga, L., Portais, J.C., Sauer, D., Müller, R., Hoff, B., Haefner, S., Schröder, H., Zelder, O., Wittmann, C., 2018. Improved riboflavin production with *Ashbya gossypii* from vegetable oil based on <sup>13</sup>C metabolic network analysis with combined labeling analysis by GC/MS, LC/MS, 1D, and 2D NMR. *Metabolic Engineering* 47, 357-373.
- Shearer, M.J., 1990. Vitamin K and vitamin K-dependent proteins, 1990. *British Journal of Hematology*, 75, 156–162.
- Shimekake, Y., Furuichi, T., Abe, H., Kera, Y., & Takahashi, S., 2019. A novel thermostable d-amino acid oxidase of the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* strain YA. *Scientific Reports* 9, 11948.
- Siles-Castellano, A.B., López, M.J., López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., Estrella-González, M.J., Moreno, J., 2020. Comparative analysis of phytotoxicity and compost quality

- in industrial composting facilities processing different organic wastes. *Journal of Cleaner Production* 252, 119820.
- Silva, R., Aguiar, T.Q., Domingues, L., 2015. Blockage of the pyrimidine biosynthetic pathway affects riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Journal of Biotechnology* 193, 37–40.
- Stahmann, K.P., Kupp, C., Feldmann, S.D., Sahm, H., 1994. Formation and degradation of lipid bodies found in the riboflavin producing fungus *Ashbya gossypii*, *Application of Microbiology and Biotechnology* 42, 121–127.
- Stahmann, K.P., Arst Jr., H.N., Althöfer, H., Revuelta, J.L., Monschau, N., Schlüpen, C., Gätgens, C., Wiesenburg, A., Schlösser, T., 2001. Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environmental Microbiology* 3, 545–550.
- Stahmann, K.P., Bötdecker, T., Sahm, H., 1997. Regulation and properties of a fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubbles, or droplets of lipid or fatty acid. *European Journal of Biochemistry* 244, 220–225.
- Stahmann, K.P., Revuelta, J.L., Suelberger, H., 2000. Three biotechnical process using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 509–516.
- Stegmann, P., Londo, M., Junginger, M., 2019. The circular bioeconomy: Its elements and role in European bioeconomy clusters. *Resources, Conservation and Recycling: X* 6, 100029.
- Suárez-Estrella, F., 2003. Persistencia y capacidad infectiva del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* en residuos vegetales de melón. Tesis Doctoral. Universidad de Almería.
- Takeyama, H., Kanamaru, A., Yoshino, Y., Kakuta, H., Kawamura, Y., Matsunga, T., 1997. Production of antioxidant vitamins, beta-carotene, vitamin C and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z., *Biotechnology and Bioengineering*, 53, 185-190.
- Terán, R., Ajaz, M., Moacir de Souza, M., Marcelino, P., da Silva, S., dos Santos, J.C., 2018. Beyond Ethanol: Contribution of various bioproducts to Enhance the Viability of Biorefineries. *Sustainable Biotechnology-Enzymatic Resources of Renewable Energy*, 155-176.
- Toribio, A.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J., 2020. Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phyto-stimulating agents. *Biotechnology Reports* 26, e00449.

- Tossavainen, M., Lahti, K., Edelman, M., Eskola, R., Lampi, A.M., Piironen, V., Korvonen, P., Ojala, A., Romantschuk, M., 2018. Integrated utilization of microalgae cultured in aquaculture wastewater: wastewater treatment and production of valuable fatty acids and tocopherols. *Journal of Applied Phycology* 31, 1753-1763.
- UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0Y9XSK8>. Consultado el 14 de mayo de 2020.
- UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprot/P17255>. Consultado el 14 de mayo de 2020.
- United Nations, 2019. United in Science. [https://ane4bf-datap1.s3-eu-west-1.amazonaws.com/wmocms/s3fs-public/ckeditor/files/United\\_in\\_Science\\_ReportFINAL\\_0.pdf?XqiG0yszsU\\_sx2vOehOWpCOkm9RdC\\_gN](https://ane4bf-datap1.s3-eu-west-1.amazonaws.com/wmocms/s3fs-public/ckeditor/files/United_in_Science_ReportFINAL_0.pdf?XqiG0yszsU_sx2vOehOWpCOkm9RdC_gN) Consultado abril 2020.
- Vorapreeda, T., Chanae Thammarongtham, C., Cheevadhanarak, S., Laoteng, K., 2012. Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology* 158, 217–228.
- Walther, A., Wendland, J., 2012. Yap1-dependent oxidative stress response provides a link to riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Fungal Genetics and Biology* 49, 697–707.
- Wang, E.X., Ding, M.Z., Ma, Q., Dong X.T. and Yuan Y.J., 2016. Reorganization of a synthetic microbial consortium for one-step vitamin C fermentation. *Microbial Cell Factories* 15, 21.
- Wei, S., Zheng, W., Zhao, F., Jiang, Z., Zhou, D., 2013. Microbial conversion of waste cooking oil into riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Uberlandia* 29, 1000-1006.
- Wickerham, L.S., Flickinger, M.H., Johnston, R.M., 1946. Production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Archives of Biochemistry* 9, 95–98.
- Xiao, F., Wang, H., Shi, Z., Huang, Q., Huang, L., Lian, J., Cai, J., Xu, Z., 2019. Multi-level metabolic engineering of *Pseudomonas putillensis* ATCC31014 for efficient production of biotin. *Metabolic engineering*, corrected proof.
- Young, C., Kum, M., 2019. Effect of the retention ring-assisted continuous application of riboflavin in pulsed-light accelerated corneal collagen cross-linking on the progression of keratoconus. *BMC Ophthalmology*. <https://bmcophthalmol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12886-019-1085-2> Consultado abril 2020.

zu Berstenhorst, S.M., Hohmann, H.P., Stahmann, K.P., 2009. Vitamins and vitamin-like compounds: microbial production. In: Schaechter, M. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, Oxford, pp. 549–561.