

La microbiota ruminal como fuente de enzimas industriales

■ Gonzalo Hervás¹, Pablo G. Toral¹, Laura Blas², Aurelio Hidalgo³ y Pilar Frutos¹

¹Investigadores en el Instituto de Ganadería de Montaña (IGM, CSIC - Universidad de León).

²Investigadora en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO, CSIC-UAM).

³Profesor en la Universidad Autónoma de Madrid e investigador en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO, CSIC-UAM).

► Resumen

El rumen constituye una gran cámara de fermentación colonizada por una compleja comunidad microbiana que está compuesta mayoritariamente por especies que no pueden cultivarse. Por ello, la microbiota ruminal representa una fuente inexplorada de enzimas para la industria biotecnológica. La diversidad funcional de estos microorganismos tiene un alto potencial para el desarrollo de aplicaciones industriales más sostenibles y eficientes (p. ej., para la producción de biodiesel, la degradación de sustancias plásticas o la fabricación de ingredientes de origen biológico). Nuestros equipos de investigación están trabajando con contenido digestivo del rumen de ovejas. Mediante un cribado de alta capacidad, buscamos nuevas enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico (hidratases y deshidrogenasas). Entre sus posibles aplicaciones estaría la de contribuir a la biotransformación; por ejemplo, convirtiendo los ácidos grasos de diversos residuos, como los aceites usados de fritura, en productos con mayor valor añadido (hidroxí- y cetoácidos).

Palabras clave: rumen, bacteria, ácido graso, enzima, microfluídica

► Summary

Ruminal microbiota as a source of industrial enzymes

The rumen is a large fermentation chamber colonised by a complex microbial community that is mostly composed of as-yet uncultured species. Therefore, rumen microbiota represents an unexplored source of enzymes for the biotechnology industry. The functional diversity of these microorganisms has high potential for the development of more sustainable and efficient industrial applications (e.g., for the production of biodiesel, the degradation of plastic substances or the manufacture of bio-based ingredients). Our research teams are working with rumen digesta of sheep. We use high throughput screening to search for new enzymes related to lipid metabolism (hydratases and dehydrogenases). Potential applications include contribution to biotransformation, for example, by converting fatty acids from various waste products, such as used frying oils, into higher value-added products (hydroxy- and keto-acids).

Keywords: rumen, bacteria, fatty acid, enzyme, microfluidics

Contacto con los autores: Gonzalo Hervás: g.hervas@csic.es; Pablo G. Toral: pablo.toral@csic.es; Laura Blas: laura.blas@uam.es; Aurelio Hidalgo: ahidalgo@cbm.csic.es; Pilar Frutos: p.frutos@csic.es

EL RUMEN COMO CÁMARA DE FERMENTACIÓN

De los tres pre-estómagos de ovejas, cabras y vacas, el rumen es el de mayor volumen (supera el 80 % del total) y está visiblemente diferenciado del resto. En él reside una compleja comunidad microbiana, convirtiéndolo en una gran cámara de fermentación de flujo continuo (Newbold y Ramos-Morales, 2020). Esta peculiaridad anatómica y funcional permite que los rumiantes sean capaces de aprovechar los hidratos de carbono estructurales de la pa-

red celular de las plantas. Para ello, los microorganismos ruminales poseen enzimas (p.ej., celulasas, hemicelulasas, pectinasas y ligninasas) que transforman la fibra vegetal en ácidos grasos volátiles, la principal fuente de energía para el animal. Así, los rumiantes pueden transformar una amplia variedad de materias primas de bajo valor añadido, como vegetales y subproductos fibrosos, en alimentos de alto valor como la leche y la carne. Este rasgo distintivo constituye una de las bases de la investigación en el área de la nutrición de rumiantes.

Durante años, el ecosistema ruminal se estudió principalmente mediante el aislamiento y cultivo de sus poblaciones, una metodología que permitió llegar a identificar unas 200 especies bacterianas y describir sus principales actividades metabólicas (*tabla*). Sin embargo, hoy en día sabemos que únicamente una pequeña fracción de la microbiota es cultivable en el laboratorio. La aplicación de técnicas que no dependen del cultivo, como la secuenciación masiva del ADN, ha permitido multiplicar nuestro conocimiento de los microorganismos

mos que colonizan el rumen independientemente de su capacidad para ser aislados y cultivados (Lourenço *et al.*, 2010; Castro-Carrera, 2014). Aunque hace más de

una década ya se habían detectado hasta 12.000 grupos bacterianos (de Menezes *et al.*, 2011), podemos afirmar que aún no se conoce la diversidad y complejidad real de

este ecosistema, ni en lo que se refiere a las poblaciones presentes en el mismo, ni en lo relativo a sus funciones metabólicas (Newbold y Ramos-Morales, 2020). Esta gran

Tabla. Clasificación de algunos de los principales grupos bacterianos del rumen y actividad metabólica representativa (adaptada de Castro-Carrera, 2014).

Filo	Familia	Género	Especie representativa	Actividad metabólica representativa
Bacteroidetes	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>P. ruminicola</i>	Hemicelulolítica y proteolítica
			<i>P. bryantii</i>	Xilanolítica
	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>B. amylophilus</i>	Amilolítica
	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Paludibacter</i>	<i>P. propionigenes</i>	Sacarolítica
	<i>Paraprevotellaceae</i>	<i>Paraprevotella</i>	<i>P. clara</i>	Sacarolítica
Firmicutes	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>B. fibrisolvens</i>	Celulolítica, hemicelulolítica e isomerasa
			<i>B. proteoclasticus</i>	Pectinolítica e hidrogenasa
		<i>Pseudobutyrvibrio</i>	<i>P. ruminis</i>	Sacarolítica
		<i>Blautia</i>	<i>B. hydrogenotrophica</i>	Sacarolítica
		<i>Lachnospira</i>	<i>L. multiparus</i>	Pectinolítica
		<i>Coprococcus</i>	<i>C. spp. Pe15</i>	Metaboliza floroglucinol
		<i>Moryella</i>	<i>M. indoligenes</i>	Sacarolítica
	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>R. flavefaciens</i> y <i>albus</i>	Celulolítica
		<i>Oscillibacter</i>	<i>O. ruminantium</i>	Metaboliza monosacáridos
	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Anaerovibrio</i>	<i>A. lipolyticus</i>	Lipolítica
		<i>Mitsuokella</i>	<i>M. multiacidus</i>	Amilolítica
		<i>Selenomonas</i>	<i>S. ruminantium</i>	Degrada lactato
		<i>Megasphaera</i>	<i>M. elsdenii</i>	Degrada lactato
		<i>Quinella</i>	<i>Q. ovalis</i>	Metaboliza manitol
	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>S. bovis</i>	Pectinolítica, amilolítica e hidroxilasa
	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>E. ruminantium</i>	Hemicelulolítica
	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>C. aminophilum</i>	Degrada aminoácidos
	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Succinoclasticum</i>	<i>S. ruminis</i>	Metaboliza succinato
	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	Hidroxilasa
	Proteobacteria	<i>Succinivibrionaceae</i>	<i>Succinomonas</i>	<i>S. amylolytica</i>
		<i>Succinivibrio</i>	<i>S. dextrinosolvans</i>	Amilolítica y dextrinolítica
		<i>Ruminobacter</i>	<i>R. amylophilus</i>	Proteolítica
<i>Desulfovibrionaceae</i>		<i>Desulfovibrio</i>	<i>D. desulfuricans</i>	Metaboliza sulfatos
Actinobacteria	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. ruminantium</i>	Utiliza ribosa y manitol como sustratos
	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Atopobium</i>	<i>A. minutum</i>	Degrada péptidos y aminoácidos
	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i>	Isomerasa, hidroxilasa y deshidrogenasa
Spirochaetes	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i>	<i>T. bryantii</i>	Pectinolítica
Fibrobacteres	<i>Fibrobacteraceae</i>	<i>Fibrobacter</i>	<i>F. succinogenes</i>	Celulolítica

diversidad funcional es la que despierta el interés de un campo de investigación tan alejado de la nutrición de rumiantes como el de la biotecnología industrial (o biotecnología “blanca”), debido al potencial de los ecosistemas microbianos complejos como herramientas para el desarrollo de nuevas aplicaciones industriales más sostenibles y eficientes (p.ej., para la producción de biodiesel o la fabricación de ingredientes de origen biológico para productos de consumo masivo, como detergentes o artículos de higiene personal; Liu *et al.*, 2009; Ufarté *et al.*, 2018; Duque *et al.*, 2018).

METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS EN EL RUMEN

El metabolismo ruminal de los lípidos de la dieta, en contraste con el de los hidratos de carbono, no es un proceso esencial para proporcionar nutrientes ni a los microorganismos ni al hospedador, pero resulta indispensable para mantener el equilibrio del ecosistema (Lourenço *et al.*, 2010). La masticación y la rumia liberan los lípidos de los alimentos, que quedan expuestos a la acción de las lipasas microbianas. Estas enzimas hidrolizan los enlaces éster y liberan al medio los ácidos grasos de la dieta, mayoritariamente insaturados (ácidos oleico, linoleico y α -linolénico en la figura

1). Como los ácidos grasos insaturados tienen un efecto tóxico sobre el crecimiento microbiano, los microorganismos han desarrollado la capacidad de transformarlos en ácidos grasos más saturados y, por lo tanto, menos perjudiciales, principalmente mediante el proceso de biohidrogenación (Lourenço *et al.*, 2008; Toral *et al.*, 2012). La biohidrogenación incluye reacciones enzimáticas secuenciales, con la acción de isomerasas e hidrogenasas que permiten la saturación de los dobles enlaces de los ácidos grasos, hasta dar el producto final (ácido esteárico o 18:0 en la figura 1). Cabe destacar que algunos de los productos intermedios de esta ruta metabólica tienen actividad biológica (p.ej., los isómeros del ácido linoleico conjugado). Por ello, estos intermedios despiertan interés tanto en producción animal (p.ej., por ser inhibidores de la síntesis de grasa de la leche) como en nutrición humana, pues pueden tener efectos saludables que llegan al consumidor al pasar a la carne y la leche (Shingfield *et al.*, 2008).

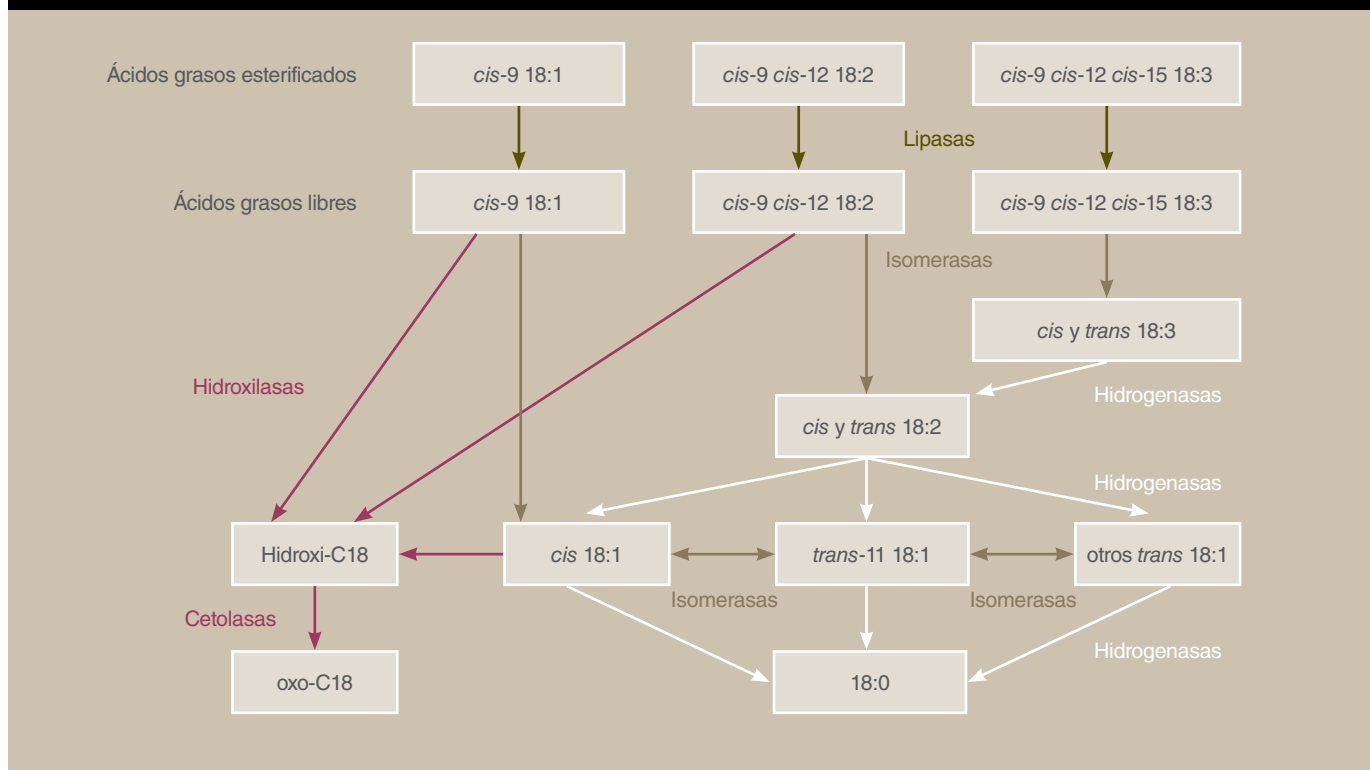
Existe además un proceso estudiado que representa otra alternativa para reducir el efecto tóxico de los ácidos grasos insaturados sobre la microbiota (Jenkins *et al.*, 2006). Implica la acción de enzimas, como las hidratasas, que dan lugar a la

formación de hidroxiácidos, por ejemplo el 10-hidroxi-18:0 (figura 1). A su vez, los hidroxiácidos sirven de sustrato para otras enzimas, las deshidrogenasas, que producen cetoácidos, como el 10-oxo-18:0 (Jenkins *et al.*, 2006). Dado que estos compuestos se identifican y cuantifican raramente, este proceso es aún muy desconocido. No obstante, nuestro equipo del IGM ha demostrado que las concentraciones de estos hidroxi- y cetoácidos pueden ser muy elevadas en el rumen de ovejas que reciben suplementos lipídicos de origen marino (p.ej., microalgas ricas en DHA -ácido docosahexaenoico-). En dichas condiciones hemos visto que los niveles de 10-oxo-18:0 pueden multiplicarse hasta 1.000 veces, lo que parece asociado al incremento de bacterias de la especie *Quinella ovalis* (figura 2; Toral *et al.*, 2012). Aunque esta especie no ha podido ser cultivada, el rumen de las ovejas representa un modelo muy prometedor para ampliar nuestro conocimiento sobre la ruta metabólica de formación de hidroxi- y cetoácidos.

BÚSQUEDA DE ENZIMAS RUMINALES CON APLICACIÓN INDUSTRIAL

Aunque muchas de las enzimas utilizadas actualmente en la industria se han aislado

Figura 1. Metabolismo ruminal de los principales ácidos grasos insaturados presentes en los alimentos y tipos de enzimas implicadas.



de cultivos de microorganismos, la mayor parte de la diversidad microbiana no puede cultivarse, representando una fuente inexplorada de enzimas sobre las que la industria biotecnológica ha puesto el foco de atención. Por ello, la microbiota ruminal (cuya fracción no cultivada puede representar más del 90 % del total) es de enorme interés, pues tal y como se mencionó anteriormente, posee una elevada riqueza en enzimas implicadas en la degradación de la pared celular de los vegetales. Algunas de estas enzimas (p.ej., celulasas, hemicelulasas o ligninasas) tienen aplicación industrial para la producción, entre otros, de bioetanol (Duque *et al.*, 2018). En los últimos años, otro punto de interés son las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico ruminal. Así, los microorganismos y las lipasas y estererasas de origen ruminal resultan de gran utilidad para la degradación de residuos y su posterior revalorización. Por ejemplo, a partir de muestras del rumen de vacas se han identificado varios microorganismos capaces de degradar varios tipos de sustancias plásticas como los poliésteres o una lipasa producida por *Butyrivibrio fibrisolvens* (relacionada con la biohidrogenación ruminal; *tabla*), que es capaz de degradar poliuretano (Ufarté *et al.*, 2017; Quartinello *et al.*, 2021). Esta acción es similar a la de una enzima triacilglicerol lipasa de *Pseudomonas* spp. que ya se comercializa con este objetivo (Biffinger *et al.*, 2015). Otras enzimas aisladas del digestivo de vacas permiten hidrolizar contaminantes ambientales (Ufarté *et al.*, 2018), mientras que lipasas ruminales con alta



Figura 3. Ovejas lecheras de raza Assaf estabuladas en la granja experimental del Instituto de Ganadería de Montaña de León.

afinidad por ácidos grasos de cadena larga podrían ser empleadas para la producción de alimentos funcionales (Liu *et al.*, 2009). Aunque se han hecho diversos estudios sobre el impacto de la composición de la dieta sobre la diversidad y función de las comunidades microbianas ruminales (Castro-Carrera, 2014; Deusch *et al.*, 2017; Lyons *et al.*, 2017), para la identificación y aislamiento de enzimas con aplicación industrial no parecen haberse tenido en cuenta factores relacionados con los animales donantes. Las diferencias individuales en la eficiencia de utilización

de los alimentos podrían estar relacionadas con un distinto aprovechamiento de la fracción fibrosa de los vegetales, debido a una dotación enzimática distinta. De igual modo, características de la ración que consumen, como la inclusión de lípidos mencionada anteriormente, pueden modificar de forma acusada la actividad de la microbiota ruminal y, por tanto, las propiedades de las enzimas que podemos encontrar. Por ello, la utilización de animales rumiantes identificados como más eficientes en la utilización de la dieta o que reciben alimentos no convencionales, como las microalgas marinas, podría resultar novedosa y de interés.

En este sentido, nuestros equipos de investigación de nutrición de rumiantes (IGM) y de descubrimiento de nuevas enzimas para aplicaciones biotecnológicas (UAM/CBMSO) están desarrollando una colaboración de carácter interdisciplinar, que se basa en la relación entre la digestión ruminal, aspecto clave de la investigación del IGM, y la obtención de enzimas con aplicación industrial, aspecto clave de la investigación del grupo de la UAM/CBMSO. Esta colaboración surge a partir de un proyecto de investigación dirigido a estudiar las bases fisiológicas de la eficiencia alimentaria en las ovejas lecheras (*figura 3*). Los resultados obtenidos apuntaron a que el metabolismo lipídico en el rumen sería una de las claves de dicha eficiencia alimentaria y que el uso de ciertos

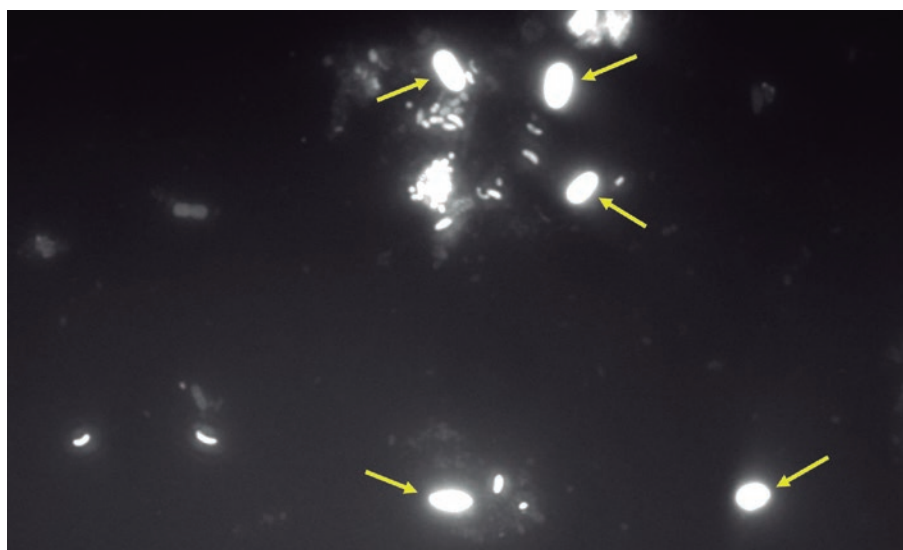
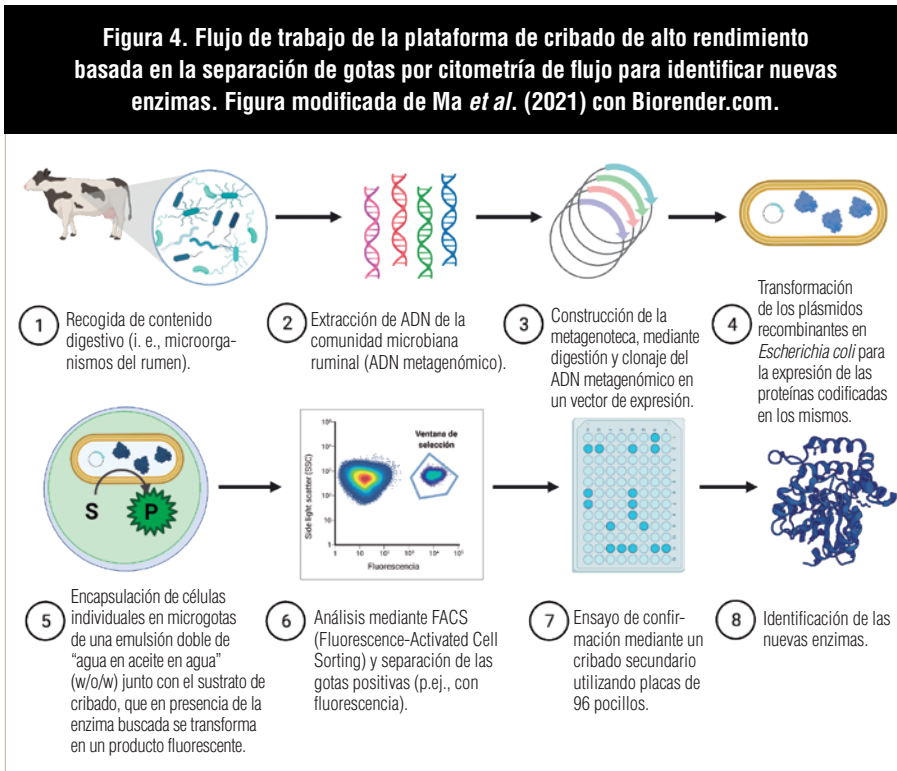


Figura 2. Bacterias ruminales presumiblemente implicadas en la ruta de hidratación de los ácidos grasos (*Quinella ovalis*; son las figuras ovaladas indicadas con flechas amarillas). Fotografía tomada a través de un microscopio de epifluorescencia.



volumen donde, a modo de tubo de ensayo microscópico, se realiza un ensayo enzimático. Como método de detección se utiliza la intensidad de fluorescencia generada por la conversión enzimática, que permitirá la separación de aquellos compartimentos microscópicos de "agua en aceite en agua" que contengan la enzima de interés mediante FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), una técnica ampliamente disponible en los centros de investigación. Esta metodología, que está revolucionando los métodos de cribado funcional mediante la realización de millones de pruebas en menos de un día y por menos de 10 euros, resulta de gran interés ante el reto que supone la elevada diversidad ruminal. En concreto, en nuestro estudio, esperamos que el cribado de los genes presentes en las muestras de contenido digestivo ruminal proporcione nuevas hidratasas y deshidrogenasas. Entre sus posibles aplicaciones estaría la capacidad de contribuir a la biotransformación, p. ej. convirtiendo ácidos grasos insaturados presentes en diversos residuos, como los aceites usados de fritura (domésticos o de industrias alimentarias), en productos con mayor valor añadido (específicamente, hidroxí- y cetoácidos). Este trabajo forma parte del Proyecto de Investigación CSI276P18, financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (ERDF/FEDER).

Bibliografía disponible en www.grupoasis.com/albeitar/bibliografias/AL254Hervas.pdf

suplementos lipídicos podría mejorarla (Hervás *et al.*, 2021; Toral *et al.*, 2021). Las variaciones individuales en la eficiencia alimentaria de estas ovejas no se pudieron asociar con diferencias en la composición de su microbiota ruminal. Sin embargo, la tecnología de secuenciación utilizada (MinION, Oxford Nanopore Technology) permitió un estudio funcional del que se deriva que, en la eficiencia alimentaria, la función de la microbiota ruminal tendría un papel más relevante que su taxonomía (Esteban-Blanco *et al.*,

2020). Es decir, las familias, géneros y especies presentes no serían tan importantes como su actividad enzimática. En la actualidad, estamos trabajando con un conjunto de muestras de ADN recogido en este proyecto, para realizar un cribado de alta capacidad mediante metagenómica funcional en emulsiones de microgotas (microfluídica; Tausin *et al.*, 2020). Como se muestra en la *figura 4*, clones de ADN de microbiota ruminal se encapsulan individualmente en microgotas de unos pocos picolitros de

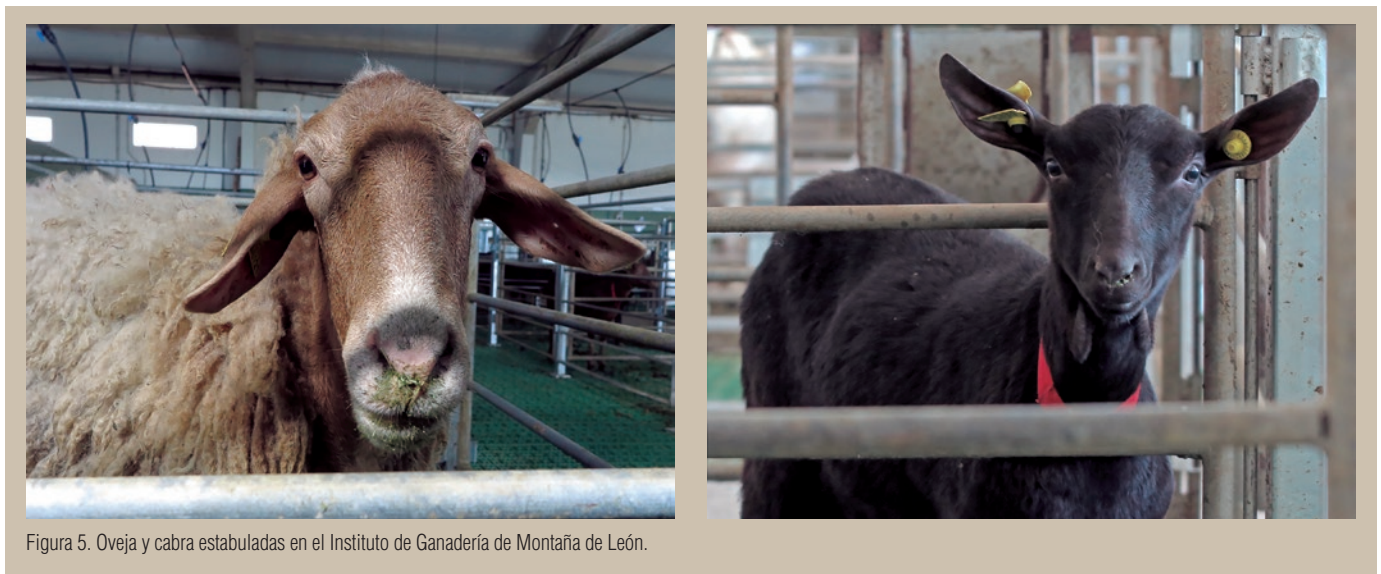


Figura 5. Oveja y cabra estabuladas en el Instituto de Ganadería de Montaña de León.