

# INBIOTEC. Biotecnología microbiana aplicada a la industria farmacéutica, agroalimentaria y medioambiental

Barreiro C, García-Calvo L, García-Estrada C, Kosalková K, Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Sánchez-Orejas C, Sola-Landa A.

@carlos.barreiro@inbiotec.com  
c.barreiro@unileon.es

Parque Científico de León. Avda. Real, 1. 24006 León.



Integrantes del equipo investigador y técnico del Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC)

El Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) es un Centro Tecnológico que surgió en León en 1991 para promover las actividades de investigación, control de calidad y desarrollo tecnológico de interés para las entidades vinculadas a la biotecnología con las que colabora. INBIOTEC inició su andadura bajo la dirección del Prof. Juan Francisco Martín, catedrático de Microbiología de la Universidad de León (ULE), quien, tras su jubilación, cedió el testigo en 2011 al Prof. Elías F. Rodríguez Ferri (Catedrático de Sanidad Animal de la ULE) en la dirección gerente y al Prof. Rafael Balaña Fouce (Catedrático de Toxicología de la ULE) en la dirección científica. Posteriormente, en 2016, la dirección del Instituto recayó en el Dr. Carlos Barreiro (Investigador de INBIOTEC).

El Instituto de Toxicología de Castilla y León (INTOXCAL) nació en 1995, estrechamente ligado a la actividad industrial de León y al mundo de la ciencia. En el año 2010, se unió a INBIOTEC para crear juntos un centro de referencia tecnológica en León, donde, actualmente, constituye el área de Analítica de INBIOTEC.

Tradicionalmente, INBIOTEC se ha dedicado al estudio de todos los aspectos relacionados con la obtención de metabolitos microbianos de interés industrial en el área farmacéutica, agroalimentaria o medioambiental. Esto incluye la selección de cepas productoras, la mejora de condiciones de cultivo, el estudio de la regulación metabólica, análisis ómicos, el escalado a nivel semi-industrial y la purificación de los compuestos de interés. Así,

su participación en contratos directos con empresas, los servicios analíticos a terceros y el desarrollo de proyectos competitivos a nivel europeo, nacional y regional utilizando hongos, levaduras y bacterias, principalmente actinobacterias, le han permitido solicitar más de 15 patentes y realizar más de 400 publicaciones científicas en sus 25 años de existencia.

Algunas de las principales líneas de investigación se detallan a continuación:

## PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES MEDIANTE MICOBACTERIAS

Los compuestos esteroideos de uso clínico presentan 300 formulaciones y generan



Análisis de microorganismos degradadores de madera

unos beneficios anuales superiores a los 6000 millones de dólares. Sin embargo, tras más de 40 años de bioconversiones microbianas siguen existiendo problemas en la producción de esteroides de origen microbiano: i) baja solubilidad de los precursores; ii) inhibición por producto final; iii) producción de esteroides no deseados. INBIOTEC, en colaboración con Gadea Biopharma (AMRI), está abordando varios de estos problemas ayudado por técnicas ómicas, lo que ha facilitado el descubrimiento de dianas génicas que incrementan la producción de los esteroides deseados, la eliminación de productos colaterales y el aumento de la resistencia frente a los productos finales.

### **CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM: MÁS QUE AMINOÁCIDOS**

El estudio de diferentes aspectos de las corinebacterias es una de las líneas más tradicionales y consolidadas del Instituto, además de una de las más internacionales. Así, varios proyectos europeos centrados en la regulación del metabolismo, la obtención de nuevos aminoácidos (valina, aspártico), vitaminas (ácido pantoténico), aminas biogénicas (cadaverina), ácidos dicarboxílicos (málico, succínico), selección de biotipos o la solución de las inhomogeneidades producidas en grandes fermentadores han sido desarrollados por el personal de INBIOTEC.

### **METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN FÚNGICO**

Una de las líneas de investigación que se ha mantenido activa desde los comienzos de INBIOTEC está relacionada con el estudio, en hongos filamentosos (*Penicillium chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum*), de los genes que participan en la biosíntesis, regulación y transporte tanto de antibióticos beta-lactámicos (penicilina y cefalosporina), como de sus intermediarios. Recientemente, este grupo se ha centrado en la caracterización mediante técnicas ómicas del incremento de los títulos de penicilina en cepas de alta producción. Los resultados obtenidos por "ingeniería reversa" permiten crear microorganismos a la carta, mediante ingeniería genética, modificados únicamente en aspectos relacionados con la productividad. Asimismo, desde hace unos años, en INBIOTEC se está llevando a cabo la caracterización molecular de la ruta de biosíntesis de diversas micotoxinas, tales como la roquefortina, la meleagrina o la toxina PR.

### **BIOSÍNTESIS Y REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE STREPTOMYCES**

La biosíntesis y regulación de metabolitos secundarios producidos por cepas de *Streptomyces* (cefamicina C; ácido clavulánico; pimaricina; avermectina; tacrolimus) es una de las líneas clásicas del Instituto. Así, gracias

a las técnicas de transcriptómica y proteómica combinadas con ensayos de unión proteína-ADN y análisis bioinformático, se ha completado el modelo de la regulación por fosfato dependiente de PhoP en *S. coelicolor*, el cual se ha ido extendiendo a otras especies de interés industrial. Las últimas investigaciones se centran en la detección de ARN pequeños implicados en la regulación por fosfato y del metabolismo secundario. Por otra parte, la activación de agrupaciones génicas crípticas y el incremento de la producción de metabolitos de interés industrial en *Streptomyces tsukubaensis* es una fuerte apuesta del centro, que comenzó por la secuenciación de su genoma. Actualmente, el objetivo es mejorar la producción del inmunosupresor tacrolimus, mediante la modificación de su ruta de biosíntesis, y conseguir cepas productoras de análogos con distintas actividades farmacológicas.

### **PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES**

INBIOTEC se ha ocupado de mejorar la producción del carotenoide astaxantina con el hongo levaduriforme *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Este es el principal carotenoide usado a nivel mundial en acuicultura, farmacia y nutracéutica. Así, INBIOTEC ha llevado a cabo estudios sobre la biosíntesis de astaxantina con el fin de obtener cepas sobreproductoras de este compuesto, mejorando los medios de cultivo y los parámetros físicos-químicos de la fermentación.

### **TÉCNICAS ÓMICAS**

Para analizar la expresión génica en diferentes rutas biosintéticas de interés industrial, INBIOTEC ha venido desarrollando estudios en genómica, transcriptómica y proteómica, tanto como servicio a terceros como para su propia investigación o en colaboración con otros grupos. Así, mediante el ensamblaje de lecturas de secuenciación, la anotación funcional de genes y la comparación con otros genomas relacionados, se han publicado los genomas de *P. chrysogenum*, *Mycobacterium neoaurum* y *S. tsukubaensis*. Bajo la modalidad RNA-seq se realizan análisis transcriptómicos (organización de transcritos, inicios de transcripción) que han revelado un elevado número de ARN de pequeño tamaño, de entre 50-300 nt, en genomas de actinobacterias.

Alternativamente, los *microarrays* se utilizan para estudios de expresión diferencial en series temporales o de comparación entre condiciones para eucariotas superiores (ratón) y procariotas (*Streptomyces*, *C. glutamicum*).

El análisis proteómico diferencial mediante electroforesis bidimensional (2D-DIGE) acoplado a técnicas de espectrometría de masas ha sido utilizado en INBIOTEC para el estudio de diferentes sub-proteomas en hongos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Diplodia*), eucariotas superiores (ovejas) y bacterias (*Streptomyces*, *C. glutamicum*), permitiendo en algunos casos hacer ingeniería inversa de cepas de alta producción o mostrar procesamiento post-transcripcionales no detectables mediante otras ómicas.

## ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS Y SEGURIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS

En el área de Analítica se realizan actividades con una doble vertiente: por un lado, soporte en proyectos de investigación propios, y por otro, de servicio a empresas. Dicho soporte incluye el desarrollo y validación de métodos analíticos, ensayos de seguridad, inmunogenicidad y potencia en vacunas, ensayos de estimulación de la inmunidad inespecífica, estudios de residuos de medicamentos en tejidos, estudios de ecotoxicidad, etc. Asimismo, se han desarrollado modelos *in vivo* (modelos animales) e *in vitro* (cultivos celulares) como complemento a la investigación en microbiología y biología molecular, para evaluar la eficacia y seguridad de tratamientos farmacológicos, nuevos alimentos o nuevos compuestos para la protección medioambiental.

## NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

INBIOTEC se ha adaptado a las nuevas tendencias en Biotecnología: biorrefinería, biocontrol, seguridad alimentaria. Dentro del concepto de biorrefinería se trabaja en el descubrimiento y caracterización de enzimas fúngicas con actividad feruloil esterasa o el desarrollo de procesos para el aprovechamiento de la paja de maíz con actinobacterias. En biocontrol, INBIOTEC ha participado en la búsqueda de nuevos recubrimientos

para combatir la corrosión metálica; en la obtención de pesticidas de origen biológico; en la protección de la madera para evitar su degradación, tanto "viva" (biocontrol de enfermedades), como "muerta" (protegiendo la madera presente en estructuras). Finalmente, INBIOTEC, dentro de las nuevas áreas de expansión, también participa activamente en proyectos con empresas relacionados con la caracterización, a nivel de seguridad y eficacia, de ingredientes destinados a formar parte de alimentos, así como con la evaluación de la funcionalidad de bacterias ácido-lácticas en su papel como probióticos.

## REFERENCIAS

- Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A, Martínez-Burgo Y, Robles-Reglero V, Santamarta I, Pérez-Redondo R, Martín J F y Liras P. (2014). A 18-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 2183-95.
- Barreiro C. (editor) (2015). *New trends in Corynebacterium glutamicum: beyond the amino acids*. Nova Science Publishers, Inc, New York.
- Barreiro C, Martínez-Castro M. (2014). Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(2):497-507.
- Barreiro C, Morales A, Vázquez-Iglesias I, Sola-Landa A. (2017). Intra- and extra-cellular proteome analyses of steroid-producer *Mycobacteria*. En: *Microbial Steroids: Methods and Protocols*. Editores: José Luis Barredo e Ignacia Herráiz. Editorial: Springer Science + Bussines Media (New York).
- Barreiro C, Prieto C, Sola-Landa A, Solera E, Martínez-Castro M, Pérez-Redondo R, García-Estrada C, Aparicio JF, Fernández-Martínez LT, Santos-Aberturas J, Salehi-Najafabadi Z, Rodríguez-García A, Tauch A y Martín JF. (2012). Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488 the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). *J Bacteriol* 194: 3756-57.
- Domínguez-Santos R, Kosalková K, García-Estrada C, Barreiro C, Ibáñez A, Morales A, Martín JF. (2017). Casein phosphopeptides and CaCl<sub>2</sub> increase penicillin production and cause an increment in microbody/peroxisome proteins in *Penicillium chrysogenum*. *J Proteomics*.156: 52-62.
- García-Estrada C, Barreiro C, Jami MS, Martín-González J, Martín JF. (2013). The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine cause the reprogramming of metabolism in *Penicillium chrysogenum*, leading to multiple vesicles and penicillin overproduction. *J Proteomics*. 85:129-59.
- García-Estrada C, Kosalková K, Sánchez-Orejás IC. (2018). Extraction and analysis of carotenes and xanthophylls produced by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. In: *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols* (Barreiro C. and Barredo J.L. eds). En prensa.
- García-Estrada C, Martín JF. (2016). Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Appl Microbiol Biotechnol*. 19: 8303-13.
- Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF. (2010). Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Mol Cell Proteomics*. 2010 9:1182-9.
- Jami MS, García-Estrada C, Barreiro C, Cuadrado AA, Salehi-Najafabadi Z y Martín JF. (2010). The *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. *Mol Cell Proteomics* 9: 2729-44.
- Martínez-Burgo Y, Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A y Liras P. (2015). The pathway-specific regulator ClaR of *Streptomyces clavuligerus* has a global effect on the expression of genes for secondary metabolism and differentiation. *Appl Environ Microbiol* 81: 6637-48.
- Martín JF, Rodríguez-García A y Liras P. (2017). The master regulator PhoP coordinates phosphate and nitrogen metabolism respiration cell differentiation and antibiotic biosynthesis: comparison in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot*. 70(5): 534-541.
- Pérez-García F, Vasco-Cárdenas MF, Barreiro C. (2016) Biotypes analysis of *Corynebacterium glutamicum* growing in dicarboxylic acids demonstrates the existence of industrially-relevant intra-species variations. *J Proteomics* 146: 172-183.
- Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Botas A, Santamarta I, Martín JF y Liras P. (2012). ArgR of *Streptomyces coelicolor* is a versatile regulator. *PLoS One* 7: e32697.
- Rodríguez-García A, Fernández-Alegre E, Morales A, Sola-Landa A, Lorraine J, Macdonald S, Dobvnya D, Smith MCM, Donova M y Barreiro C. (2016). Complete genome sequence of '*Mycobacterium neoaurum*' NRRL B-3805 an androstenedione (AD) producer for industrial biotransformation of sterols. *J Biotechnol* 224: 64-5.
- Salehi-Najafabadi Z, Barreiro C, Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF. (2011). Characterization of a gamma-Butyrolactone Receptor of *Streptomyces tacrolimus*: Effect on sporulation and tacrolimus biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 92(5): 971-984.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Amin R, Wohlleben W y Martín JF. (2013). Competition between the GlnR and PhoP regulators for the *glnA* and *amtB* promoters in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* 41: 1767-82.
- Thomas L, Hodgson DA, Wentzel A, Nieselt K, Ellingsen TE, Moore J, Morrissey ER, Legaie R, STREAM Consortium, Wohlleben W, Rodríguez-García A, Martín JF, Burroughs NJ, Wellington EMH y Smith MCM. (2012). Metabolic switches and adaptations deduced from the proteomes of *Streptomyces coelicolor* wild type and *phoP* mutant grown in batch culture. *Mol Cell Proteomics* 11: M111013797.
- Vasco-Cárdenas MF, Baños S, Ramos, Martín JF, Barreiro C. (2013). Proteome response of *Corynebacterium glutamicum* to high concentration of industrially relevant C4 and C5 dicarboxylic acids. *J Proteomics* 85: 65-88.