

Tema 10: Producción de metabolitos secundarios por cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales



- **Metabolitos secundarios (MS)**
 - Definición
 - Tipos
 - Biosíntesis/Compartimentalización
 - Función
- **Importancia económica de los MS**
- **Obtención de metabolitos secundarios en cultivos celulares**
 - Ventajas/Desventajas
- **Cómo mejorar la producción**
 - Metodologías más empleadas

Introducción. Definición, tipos

Metabolitos secundarios (MS):

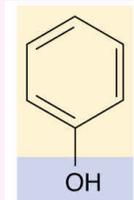
- **No participan de forma directa en el crecimiento y en el desarrollo vegetales**
- **Distribución restringida**
- **Función: ecoquímica**
 - Atrayentes o repelentes insectos
 - Inhibidores de la germinación (alelopatía)
 - Antifúngicos, antibacterianos
 - Disuasorios de herbívoros

Tipos de metabolitos:



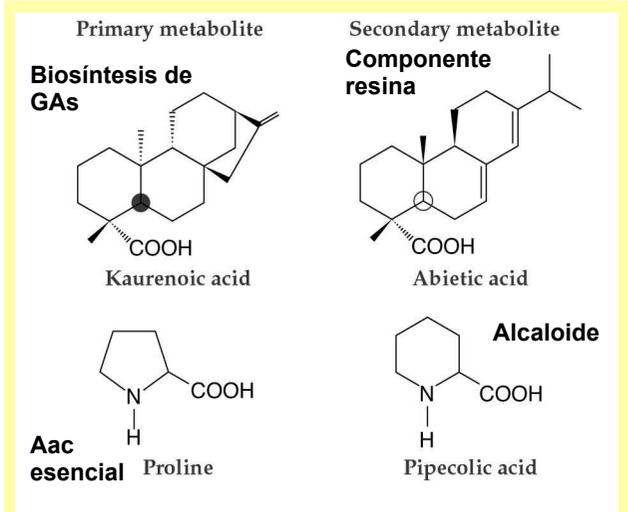
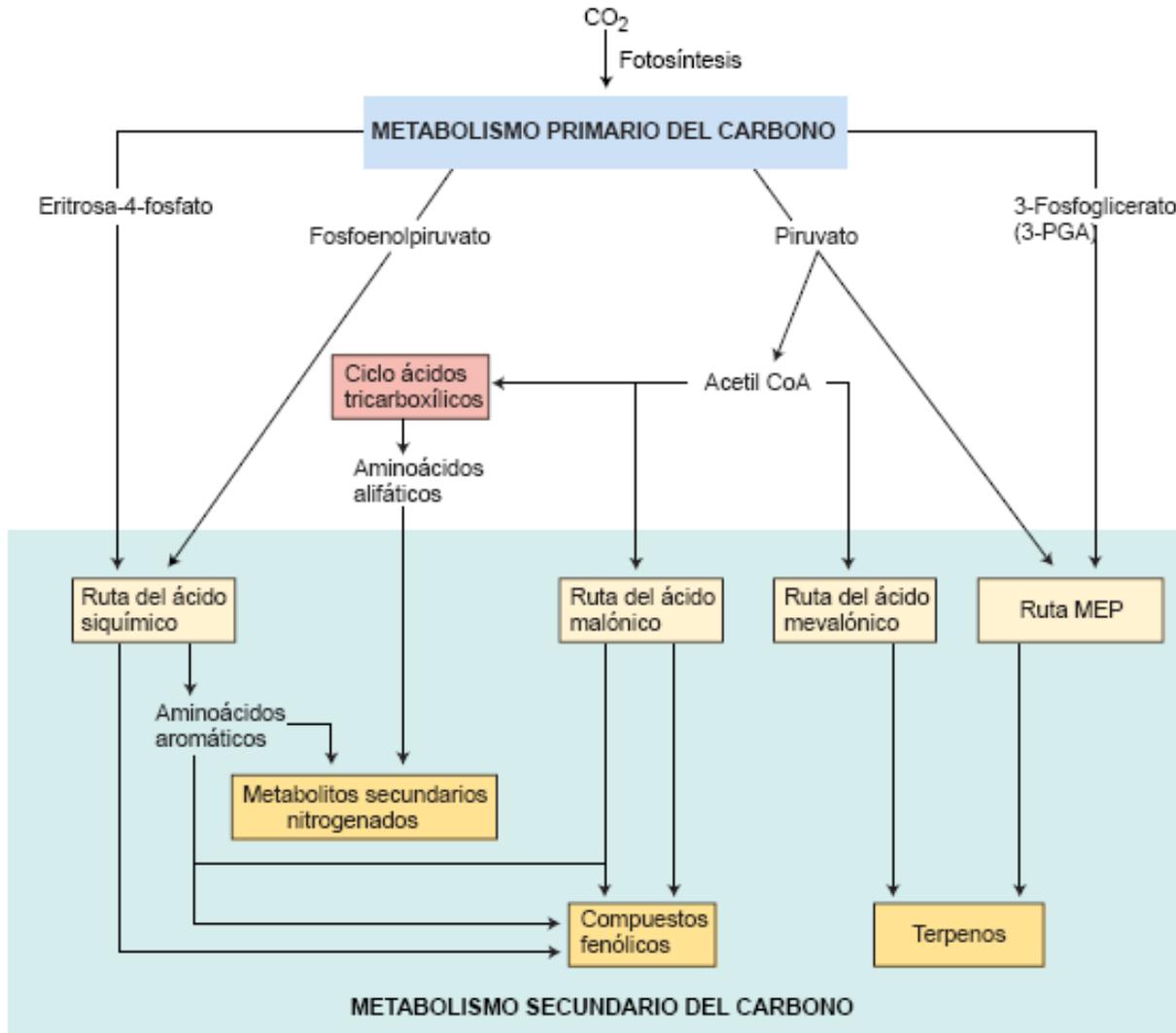
- **Terpenos.** 29000 terpenos derivan del isopreno

- **Fenoles.** 10000 fenoles:
 - ruta siquimato
 - malonato/acetato



- **Compuestos nitrogenados:**
 - 12000 alcaloides derivan de aminoácidos
 - Glicósidos cianogénicos
 - Glucosinolatos
 - Aminoácidos no proteicos

Biosíntesis de los metabolitos secundarios: relación entre el metabolismo primario y el secundario



MP y MS ¿límites?

No distinción:

- Moléculas precursoras
- Estructura química
- Origen biosintético

Distinción: función

Tomado de: Taiz & Zeiger 2006. Fisiología Vegetal. Colección Ciències experimentals. Universitat Jaume I. Buchanan et al. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. ASPP.

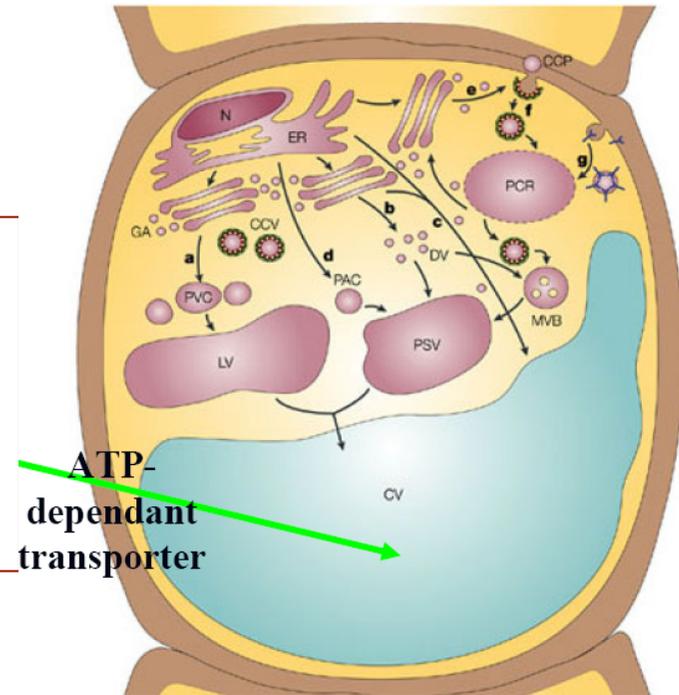
¿qué ocurre si estimulamos
la producción de MS?

Metabolismo secundario: coste (consumo de ATP/NADPH+H⁺)

- Biosíntesis de los precursores de los MS
- Transporte y almacenamiento
- Formación de compartimentos especializados para su almacenamiento (tricomas)
- Síntesis de mRNA y proteínas

Compartimentalización de los metabolitos secundarios (MS)

- **Compuestos solubles:** almacenamiento en la vacuola.
 - Ejemplo: alcaloides solubles, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, saponinas, antocianinas, flavonoides, cardenólidos



- **Compuestos lipofílicos:** conductos resiníferos, laticíferos, pelos glandulares, tricomas, en la cutícula



Morfina. Alcaloide que se produce en los conductos laticíferos de *Papaver somniferum*.

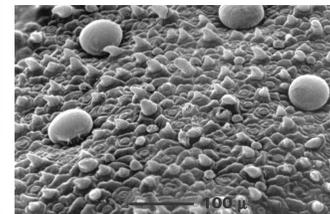
PNAS 101(2004): 13957-13962



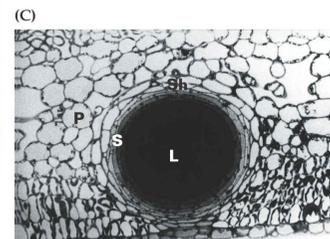
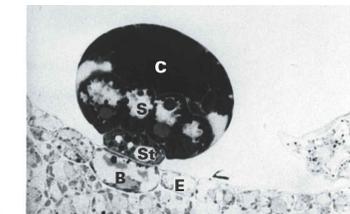
Producción de caucho.

Hevea brasiliensis.

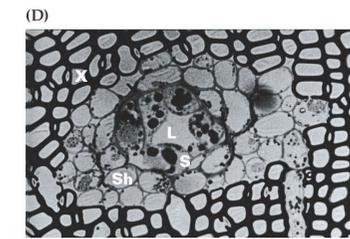
Tricomas glandulares. Tomillo



Tricomas glandulares. Menta

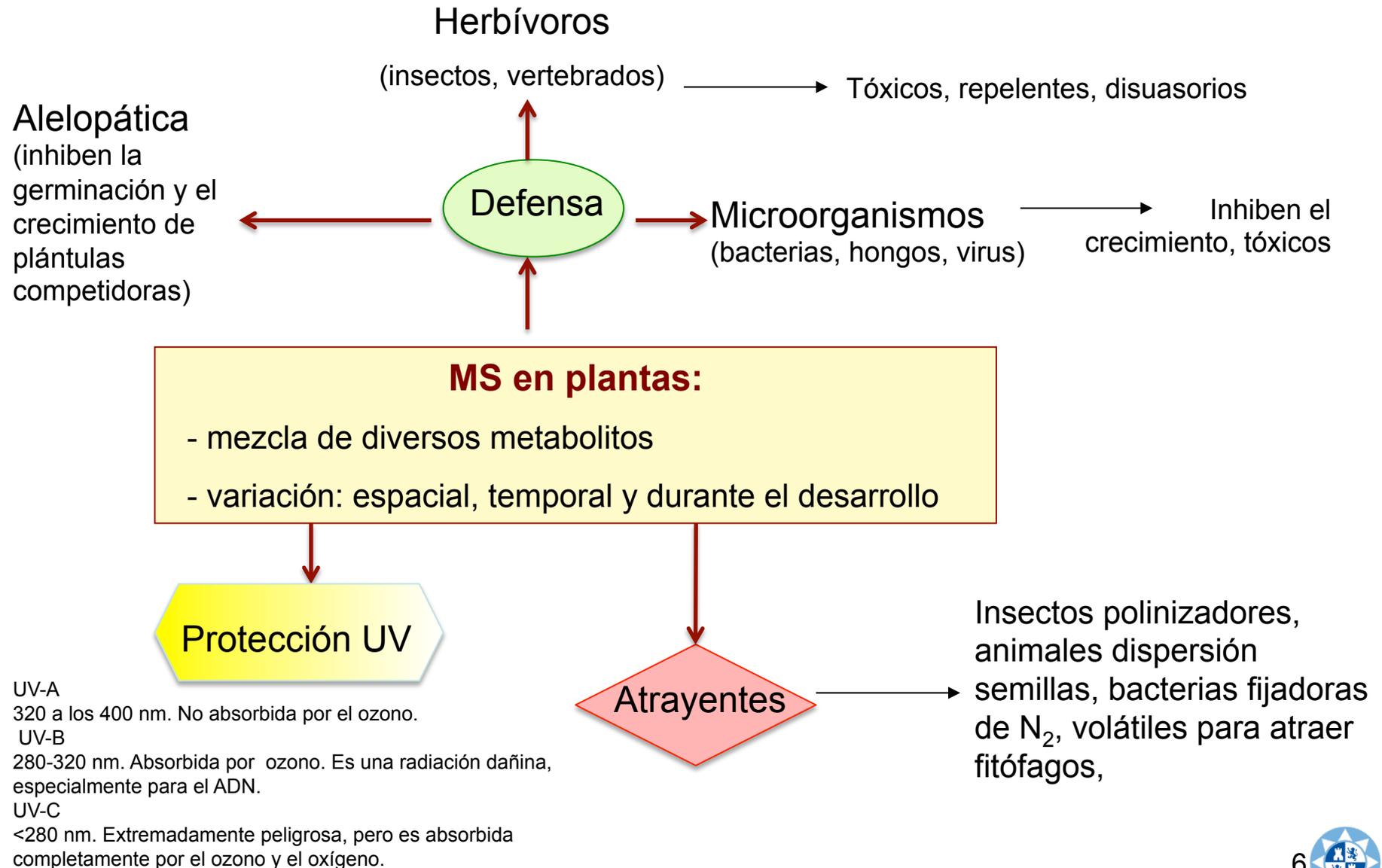


Cavidad secretora foliar. Limón



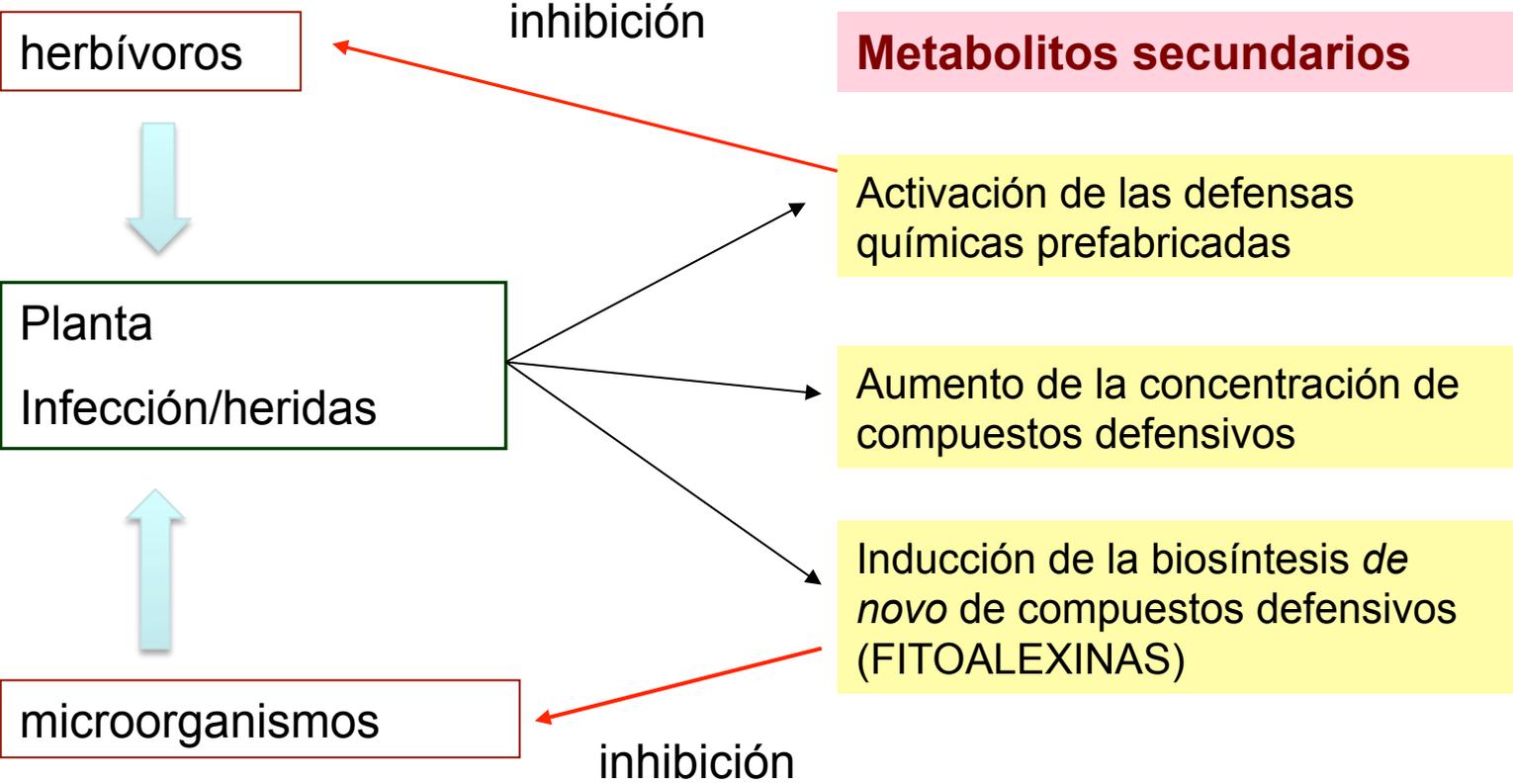
Conducto resinífero. Pino

Metabolitos secundarios (MS). Función ecoquímica



Producción de metabolitos secundarios para la defensa frente a herbívoros y patógenos no es “constitutiva”

Heridas y la infección inducen la acumulación de metabolitos secundarios



El metabolismo secundario regula muchas de las relaciones de la planta con el medio

- **La producción de MS está relacionada con el desarrollo**
 - En general no está relacionada con el crecimiento
 - Depende de condiciones determinadas de control hormonal
 - Es paralela al desarrollo de tejidos especializados y órganos
 - Biosíntesis y acumulación compartimentalizada a nivel intracelular, celular y tisular
 - Ciertos MS se encuentran en determinadas especies/familias
- **Los MS se producen en situaciones de estrés tanto abiótico como biótico**

Importancia económica de los MS

- **Precio de metabolitos primarios:** \$2-4 kg
- **Precio de MS:** \$100-1000 kg
 - 1 g de resveratrol: 700 €
 - 1 g paclitaxel: 5.000 €

Compuesto	Precio \$/kg
Taxol:	5.000.000
Vinbastina, vincristina:	5.000.000
Es. jazmín:	5.000
Shikonina	4.500
Es. rosa:	3.300
Digoxina:	3.000
Diosgenina:	674
Codeína:	650

Estructuras químicas nuevas:

75% provienen de las plantas

Procedencia de fármacos:

- 25% origen vegetal bien directa o semisíntesis
- 75% población utiliza medicina tradicional (extractos vegetales)

World Health Organization (WHO):

- 11% de los 252 medicamentos básicos proceden de angiospermas.
- Prescripción fármacos origen vegetal: 30.000 millones \$ sólo EEUU

Colorantes
Saborizantes
Proteasas

Herbicidas
Fungicidas
Antimicrobianos

Fragancias
Cosméticos

Fármacos



Compuestos naturales usados directamente como fármacos

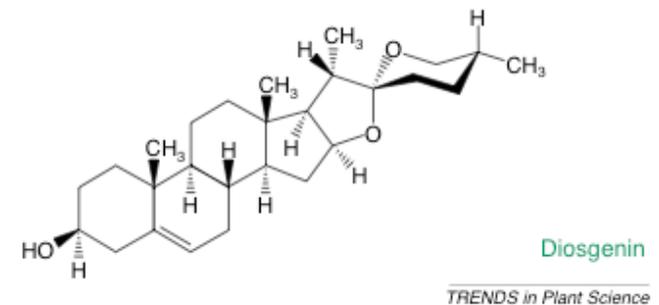
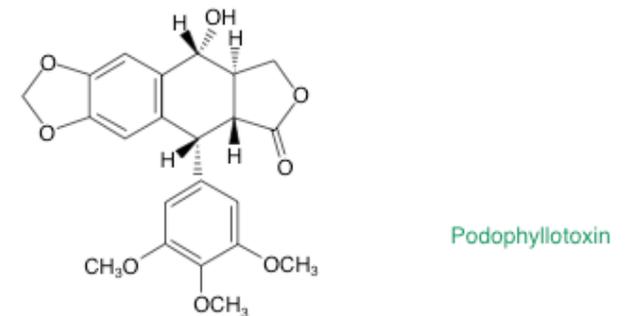
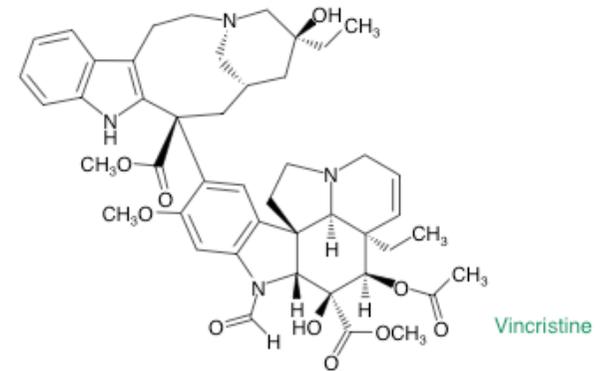
Alcaloides indólicos-terpenos, vincristina y vinblastina obtienen *Catharanthus roseus*. Enfermedad de Hodgkin (70% curación), leucemia infantil (99% curación)

Derivados semisintéticos basados en compuestos naturales

Lignanos > 200 estructuras conocidas. Algunas con actividad antineoplásica. Podofilotoxina se extrae de las raíces de *Phodophyllum* sp. y se usa como agente antiviral (virus del papiloma) aunque derivados semisintéticos de éste (etopósido, etoppphos, tenipósido) son anticancerígenos. Inhiben topisomerasa II (inhibe síntesis y replicación ADN)

El esqueleto básico del fármaco procede de las plantas

Esqueleto de esteroides. Muy utilizado para la síntesis de: corticoesteroides, anticonceptivos, hormonas sexuales y espirinolactona (diurético). Fuente de esteroides: diosgenina (saponina aglicona) que se obtiene raíces de *Dioscorea* sp.



Trends Plant Sci 9 (2004): 443-440

Medicamentos derivados de plantas

Nombre	Tipo	Origen	Uso terapéutico
Alcaloides: ventas proyectadas para el 2002: 4045 millones US\$			
Hiosciamina, escopolamina	Alcaloides del tropano	<i>Solanaceas</i>	Anticolinérgicos
Camptotecina	Alcaloide indólico	<i>Camptotheca acuminata</i>	Antineoplásico
Capsaicina	Alcaloide fenilalquilamino	<i>Capsicum spp.</i>	Analgésico local
Codeína, morfina	Alcaloide opiáceo	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
Colchicina	Alcaloide isoquinolinico	<i>Colchicum autumnale</i>	Antigota
Galantamina	Alcaloide isoquinolinico	<i>Leucojum aestivum</i>	Inhibidor coliesterasa
Pilocarpina	Alcaloide imidazólico	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Colinérgico
Nicotina	Alcaloide pirrolidínico	<i>Nicotiana spp.</i>	Terapia antitabaco
Quinina	Alcaloide quinolínic	<i>Cinchona spp.</i>	Antimalárico
Quinidina	Alcaloide quinolínic	<i>Cinchona spp.</i>	Cardiotónico
Reserpina	Alcaloide indólico	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antihipertensivo, psicotrópico
Vinblastina, vincristina	Alcaloide indólico	<i>Catharanthus roseus</i>	Antineoplásico
Yohimbina	Alcaloide indólico	<i>Apocynaceae, Rubiaceae</i>	Afrodisíaco
Terpenos y esteroides: ventas proyectadas para el 2002: 12400 millones US\$			
Artemisinina	Lactona sesquiterpénica	<i>Artemisia annua</i>	Antimalárico
Diosgenina,	Esteroides	<i>Dioscorea spp.</i>	Hormonas esteroidales
Taxol	Diterpenos	<i>Taxus brevifolia</i>	
Glicósidos: ventas proyectadas para el 2002: 9230 millones US\$			
Digoxina, digitoxina	Glicósidos esteroidales	<i>Digitalis spp.</i>	Cardiotónico
Sennósidos A y B	Antracenos	<i>Cassia angustifolia</i>	Laxante
Otros: ventas proyectadas para el 2002: 5014 millones US\$			
Ipecac	Mezcla de alcaloides de ipecacuana	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Emético
Podophyllotoxina	Lignan	<i>Podophyllum peltatum</i>	Antineoplásico



Ventajas de la obtención de MS mediante cultivos celulares

- Evitar la **sobre-explotación** de especies vegetales
- **Producción independiente** de factores endógenos y exógenos
- Disponer de **condiciones controladas** en los procesos de producción y de extracción
- Mejor control sobre la producción de MS y sobre el crecimiento de los cultivos (automatización)
- **Nuevas rutas de síntesis** a partir de líneas mutantes → origen de nuevos productos no presentes en planta
- Algunos cultivos tiene la capacidad de **biotransformar sustratos** específicos en productos de mayor valor mediante una o varias etapas enzimáticas
- **Mejorar el rendimiento** mediante ingeniería genética



Obtención de metabolitos secundarios en cultivos celulares (CC). Desventajas

- **No todos las células producen el metabolito de interés**
 - Algunos MS se acumulan en estructuras específicas → diferenciación celular. ej callos diferenciados de *Atropa belladonna* producen atropina, callos desdiferenciados no
 - CC formar a partir de callos fiables (rápido crecimiento) → válidos para crecimiento pero pueden no serlo para la producción de MS
- **Coste del proceso**
 - Condiciones asépticas
 - Agitación
 - Condiciones de cultivo
- **Se comercializan pocos MS mediante CC**
 - Ej. Berberina (combatir el cólera y la disentería). Mitsui Petrochemical Ind.
 - Saponinas de *Panax ginseng* (uso médico). Phytion USA (www.phytion-inc.com)
 - Shikonina (antibacteriano, agente antiúlceras). Mitsui Petrochemical Ind.
 - Ácido rosmarínico (antimutagénico, anti-inflamatorio, antibacteriano, antiviral y antioxidante; alimentación: conservación). *Coleus blumeii*
- **Principales problemas**
 - Bajo rendimiento
 - Inhibición feedback de MS almacenados intracelularmente

Cultivo celular, MS en el interior de las células o secreción medio

- **Acumulación del MS en las células (biomasa)**

- Rápido crecimiento de la suspensión celular en grandes volúmenes
- Manipulación posterior del CC para producir el MS
- Liberación del MS: DMSO. Procesos separación-purificación similares a los de las plantas

- **Liberación del MS al medio**

- Crecimiento e inmovilización de las células, que se usan para la obtención del MS (tiempo prolongado)
- Procesos separación-purificación del MS: más baratos



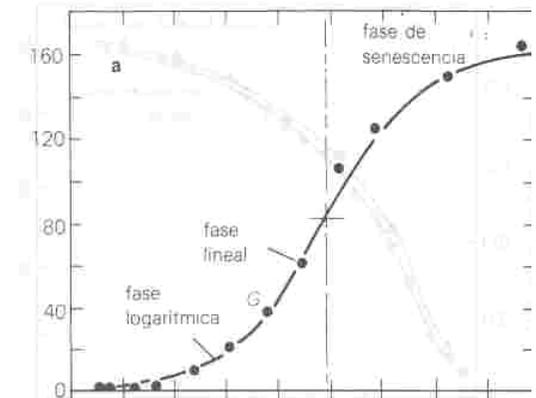
Patrones de crecimiento

• Erlenmeyer (batch)

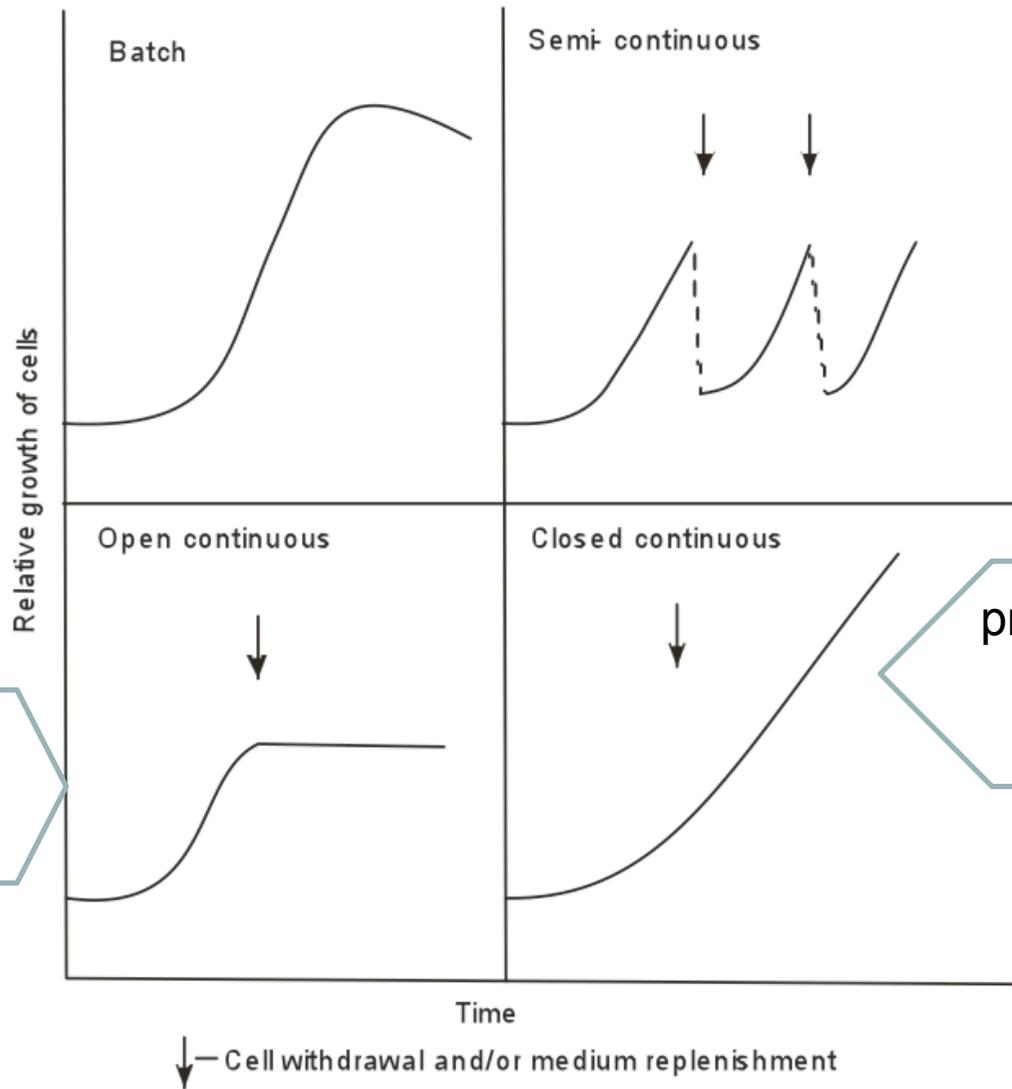
- Mezcla heterogénea de células: diferente morfología, desarrollo
- Fase inicial y media del cultivo: proporción variable de células en división
- Sustrato en el medio baja, baja la proporción de células en división (fase estacionaria).
- Acumulación de MS: Comienza al final de la fase exponencial (MP → MS). Pico máximo de acumulación de MS: fase estacionaria; balance síntesis y degradación
- Producir gran cantidad de biomasa y luego transferirla a un segundo cultivo para incrementar la síntesis de MS

• Procesos continuos (poco usados)

- Sistemas cerrados: progresivo aumento de la densidad celular. Aporte continuo de nutrientes “balanceado” continua recogida de medio (no células). Sistema permite un estado estacionario de crecimiento y metabolismo
- Sistemas abiertos: Entrada de medio fresco y una retirada balanceada de cultivo y células. Control de la densidad celular, midiendo la absorbancia



Patrones de crecimiento

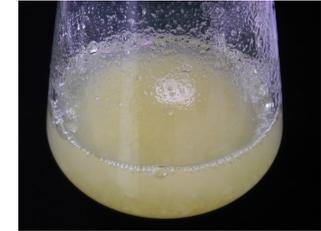


Incorporación de medio fresco (no regular), se retira el mismo volumen de medio y células.

control de la densidad celular

progresivo aumento de la densidad celular

Sincronización del cultivo celular



Cultivo de las células vegetales

Muy variable: tamaño, forma, volumen nuclear, contenido en ADN, ciclo celular



Cultivo asincrónico



Suspensión celular:

- Bajo porcentaje células división
- Formación agregados

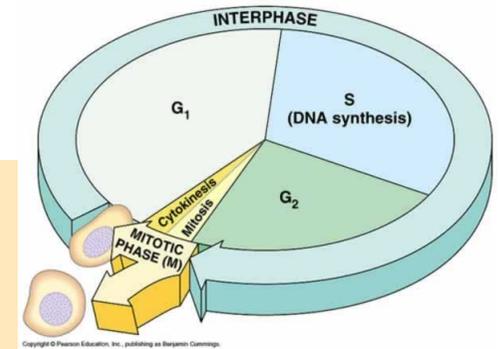
Métodos empleados para la sincronización

Frío: 4°C, pocos días

Privación de nutrientes esenciales: entrada en fase estacionaria. Adición del nutriente: sincronización del cultivo

Uso de inhibidores: Adición de inhibidores de síntesis de ADN → acumulación de células en la misma fase del ciclo. Eliminación del inhibidor: entrada a la vez en la siguiente fase. Ej. 5-fluorodeoxiuridina, timidina; hidroxiurea células en G1/S

Colchicina: inhibidor huso mitótico (células en metafase). suspensión celular en fase exponencial se suplementa con 0,02% (w/v) colchicina.

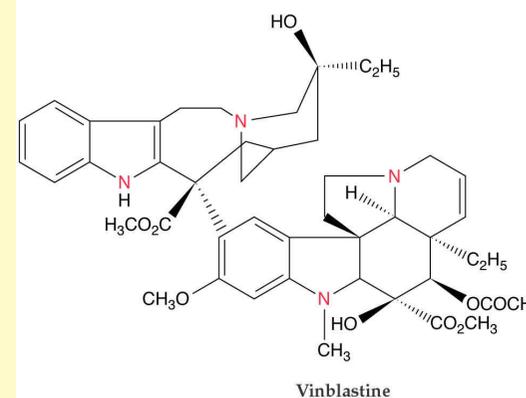


Establecer un cultivo celular para la obtención de un metabolito secundario es compleja

- **Grado de diferenciación**
 - Cultivos iniciados a partir de **tejidos diferenciados** de apio → formación de compuestos MS y no en cultivos procedentes de tejidos no diferenciados
- **No todos las células producen el metabolitos de interés**
 - **Dentro de un cultivar específico** de *Catharantus roseus*, > 60 % de los clones producen el metabolito de interés
 - Otro cultivar, sólo 0.3% de los clones producen dicho metabolito



Catharantus roseus



Selección de líneas celulares productivas

- **Clonación de una única célula**
 - Tomar células de la suspensión. Cultivarlas de forma individual. Analizar la población.
 - Búsqueda de diferencias dentro de la suspensión. Tamizar las células o centrifugar en gradiente de densidad
 - Requiere mucho tiempo
- **Clonación de agregados celulares**
 - Explora la variación genética de la producción de MS en una población celular.
 - Variación espontánea o inducida durante el proceso
 - Ej. *Daucus carota* (antocianinas), *Lithospermum erythrorhizon* (nicotina), *Catharanthus roseus* (serpentina, ajmalicina), *Coptis japonica* (berberina)

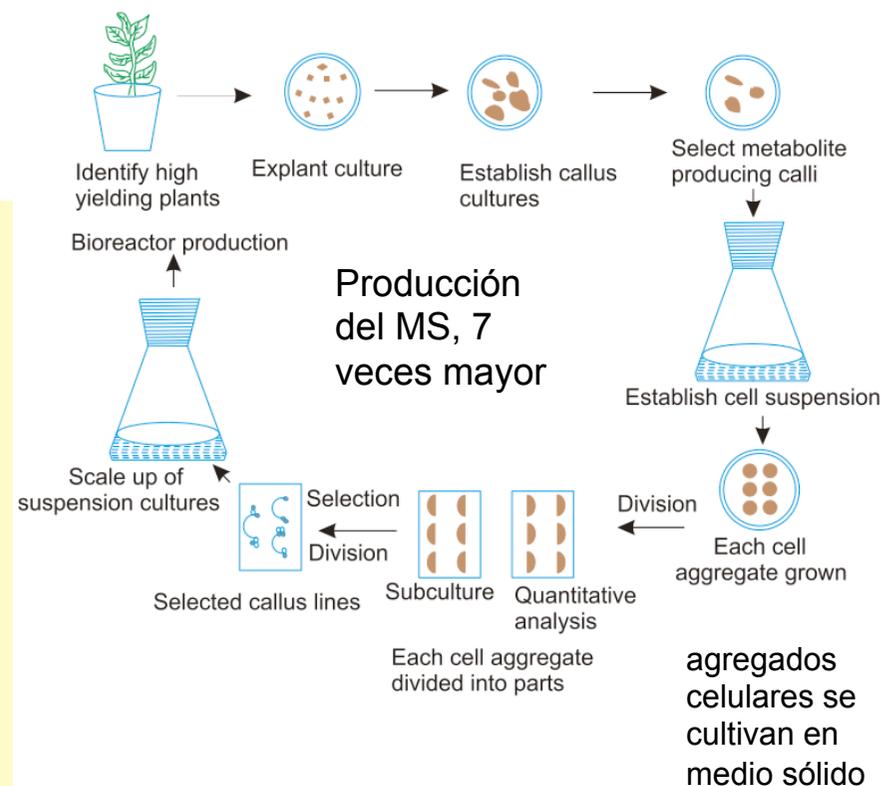


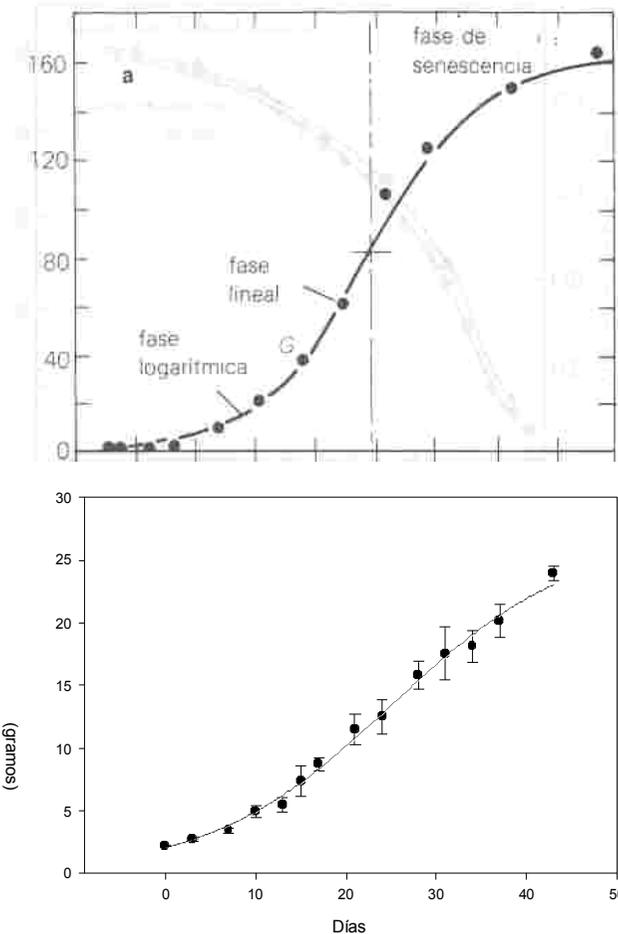
Table 7 Influence of cell cloning on productivity of plant cell cultures

Products	Plants	Factors (increase of production)	Refs.
Anthocyanins	<i>Vitis vinifera</i>	2.3–4	Curtin et al. 2003
	<i>Euphorbia milli</i>	7	Mulabagal and Tsay 2004
Berberine	<i>Coptis japonica</i>	2–6	Matsubara et al. 1989
Biotin	<i>Lavendula vera</i>	9–10	Misawa 1985
Shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	7–20	Kim and Chang 1990
Ubiquinone-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	15–180	Dicosmo and Misawa 1995



Viabilidad de un proceso para su escalado a nivel industrial

- **Requisitos económicos:**
 - Alto rendimiento y productividad del cultivo comparado con la planta
 - Compuesto de alto precio ($> \$400/\text{kg}$)
 - Buen crecimiento en biorreactores
- **Parámetros principales:**
 - Productividad: g producto/L/día
 - Concentración máxima producto: g producto/L
 - Rendimiento: $\text{g producto/ g sustrato}$



Cómo mejorar la producción ...

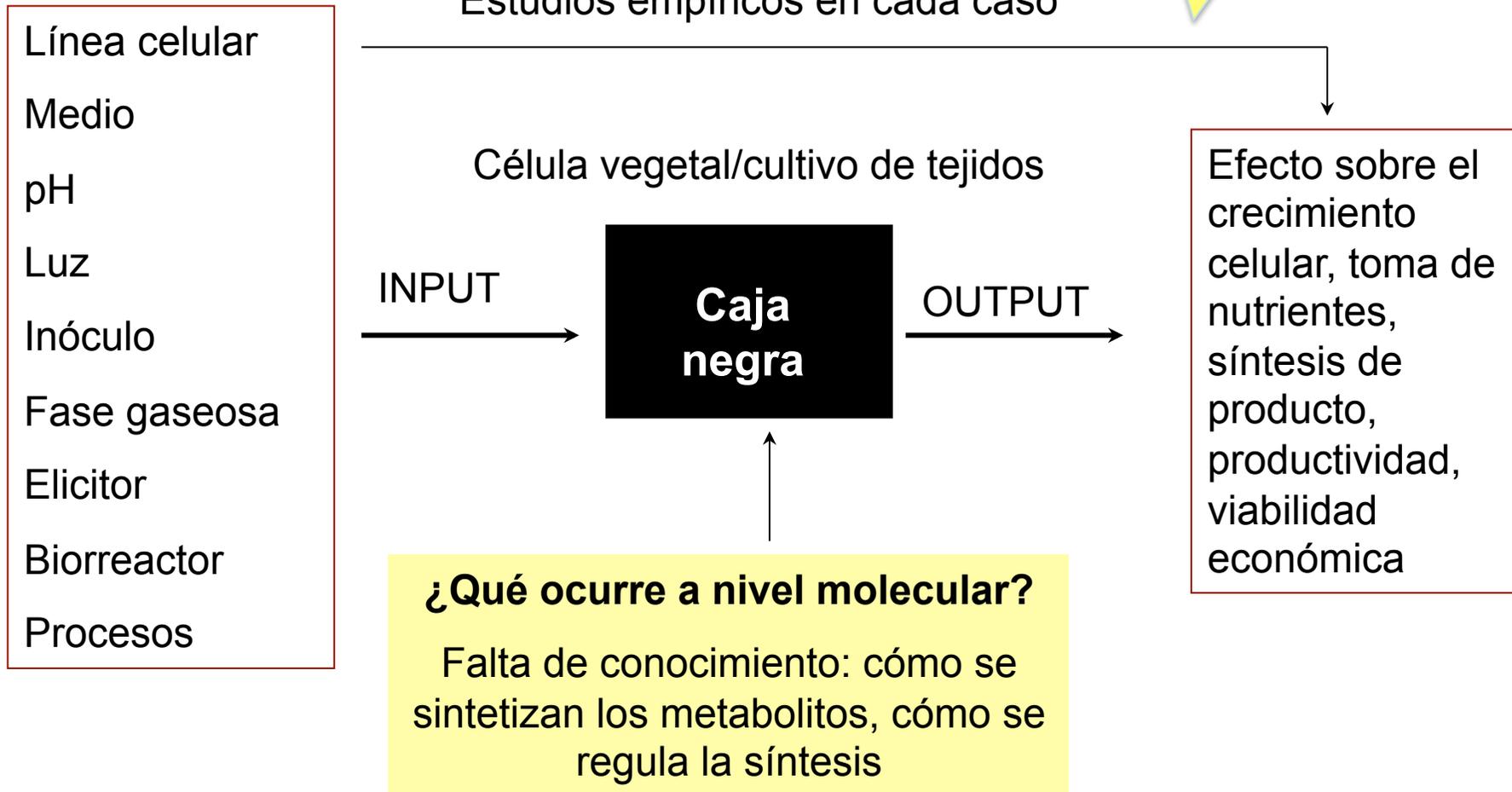
- **Selección de especies vegetales/líneas celulares apropiadas.**
 - Ampliamente utilizada en bacterias. También en cultivos vegetales. Berberina en CC de *Coptis japonica* (7g/L) y shikonina. Mejorar la productividad en 20-30 veces.
- **Optimización de condiciones de cultivo**
- **Uso de elicitores**
 - Aislada o en combinación (efecto sinérgico: elicitor endógeno (derivado de planta) con un exógeno (derivado de un microorganismo))
- **Adición de precursores**
- **Tipo de cultivo: suspensiones celulares, órganos, células inmovilizadas.**
 - Por definición un MS es “un producto de la diferenciación” y, en suspensiones celulares esta clase de diferenciación no siempre ocurre. Solución: Cultivo de órganos: raíces, vástagos, embriones. Hiosciamina y escopolamina: cultivo de raíces.
- **Estudio de transducción de señal/factores de transcripción / flujos metabólicos**
- **Permeabilización y remoción *in situ***



La caja negra ...

Éxito comercial del CC:
pocos ejemplos

Estudios empíricos en cada caso



Metodologías más empleadas

- **Selección de líneas superproductivas**
 - Depende del metabolito
- **Optimización del medio de cultivo**
 - Fuente de carbono
 - Nitrógeno, fósforo
 - Hormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas)
 - Relación C/N
- **Adición de precursores**
 - Coste (bajo)
 - Toxicidad
 - No muy alejado del producto final de la ruta metabólica
- **Uso de elicitores**



Mejora de la producción mediante elicitación

Elicitor. Compuesto químico, de distinto origen, capaz de inducir las respuestas defensivas de la plantas

- **Agentes bióticos**

- Extractos de paredes de hongos, bacterias, vegetales; virus; constituyentes herbívoros (saliva)
- Adición de hormonas
- Adición de oligosacáridos cíclicos (ciclodextrinas)

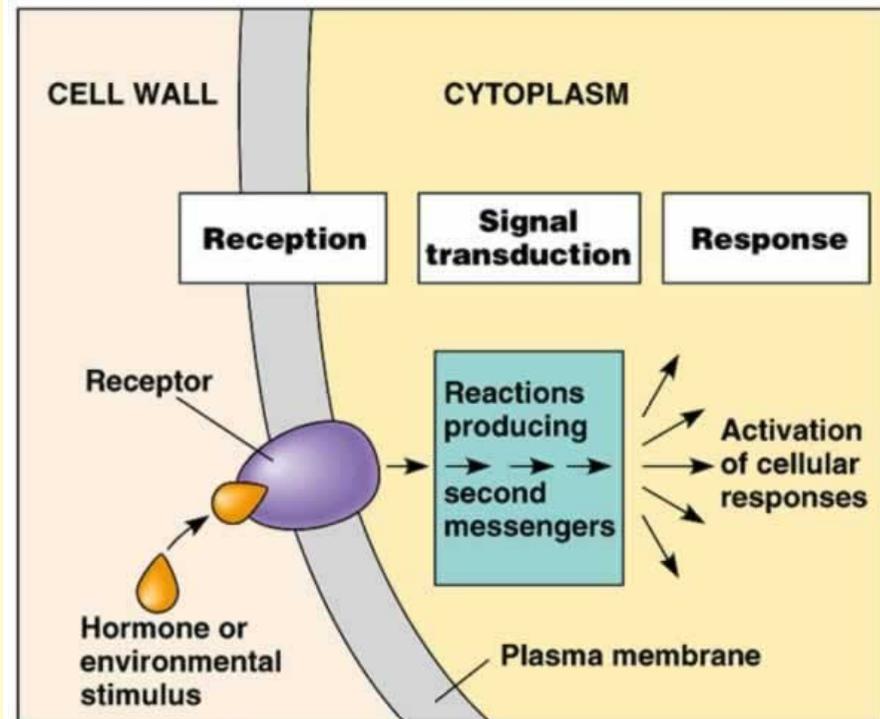
- **Agentes abióticos**

- Metales: Co^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , V
- Radiación UV
- Presión osmótica
- Estrés salino

Mecanismo de elicitación

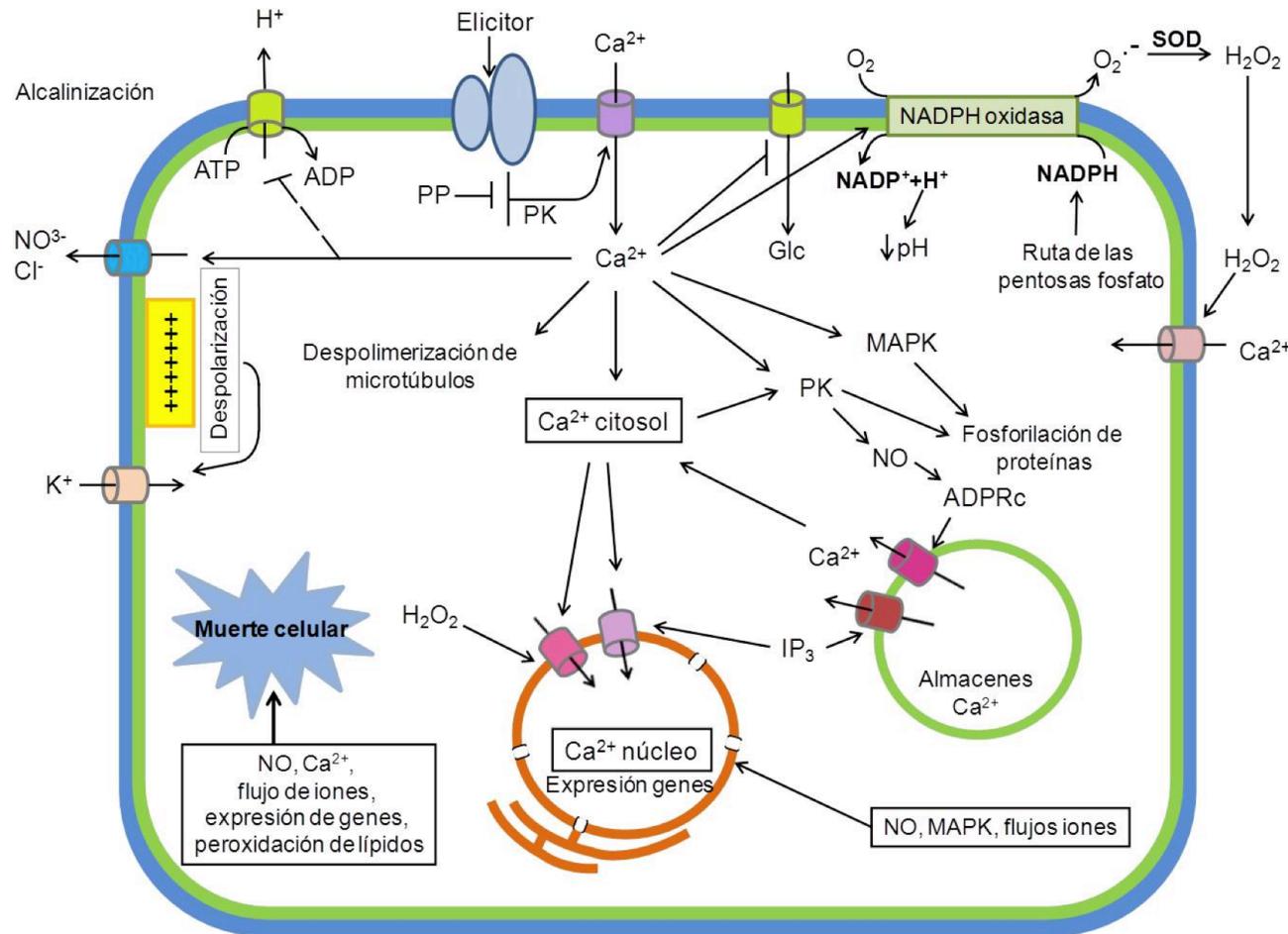
El primer paso en el mecanismo de elicitación:

- Percepción del estímulo por proteínas receptoras: (plasmalema, citosol)
- Iniciar ruta de transducción señal: activando distintos efectores como canales iónicos, proteínas G, lipasas, quinasas que se integran en las denominadas **redes de señalización**
- Activación de la respuesta: **aumento** de los niveles de **MS**



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Elicitor. Red de señalización



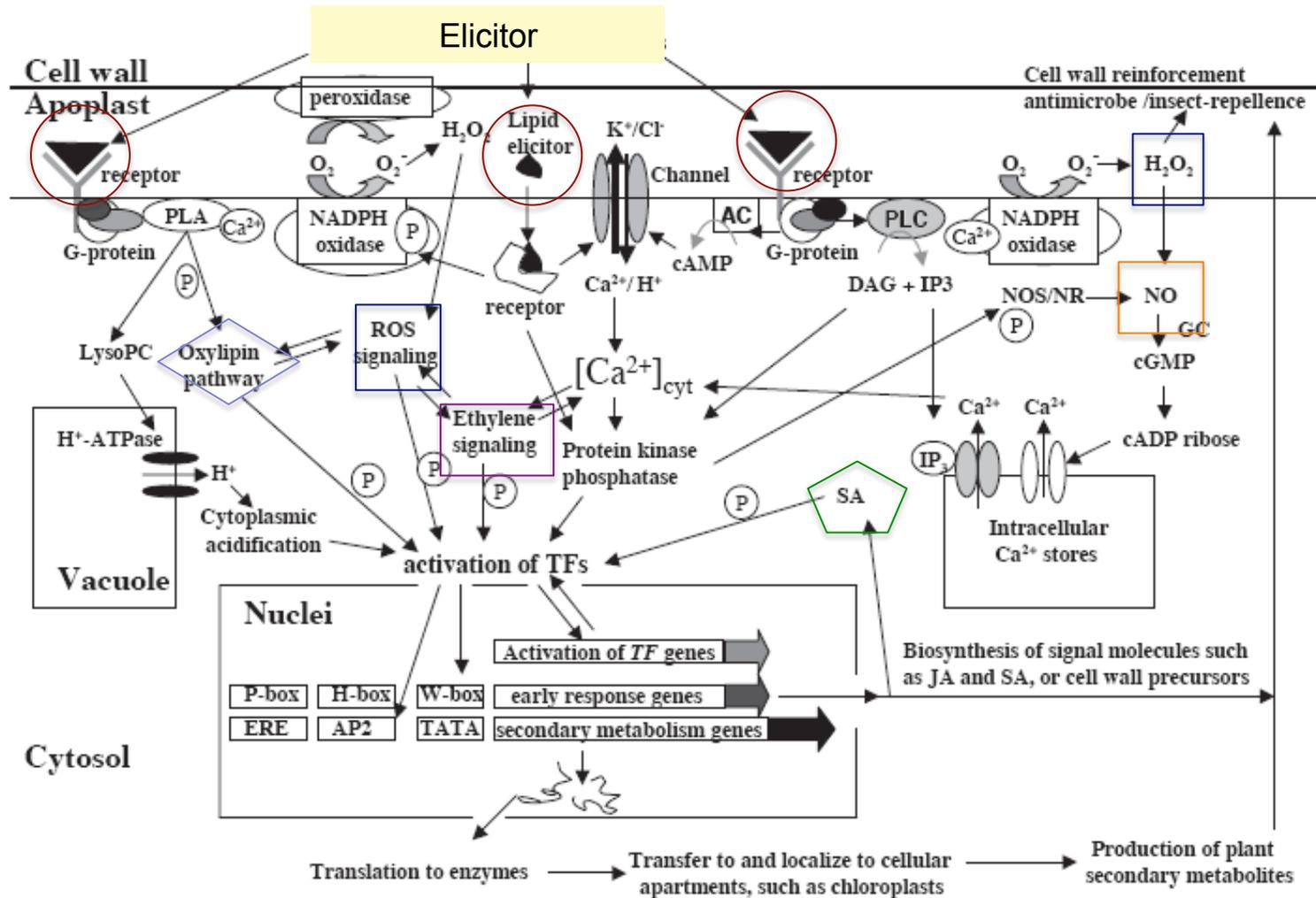
Modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática a determinados iones, en particular, Ca^{2+} , H^+ , K^+ , así como flujos de algunos aniones

Fosforilación/ desfosforilación de proteínas

Biosíntesis de ROS

Producción de NO

Elicitor. Red de señalización



Inducir la acumulación de MS

ROS:

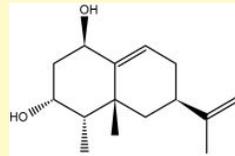
Cierto en algunos cultivos celulares. Ej.:

•H₂O₂:

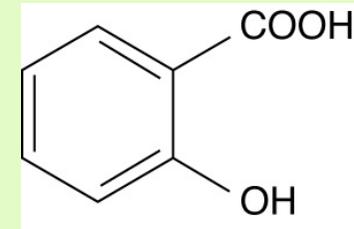
- Alcaloides, *C. roseus*,
- Isoflavonas, soja

•O₂⁻:

- Risitina, patata,
- Furanocumarinas, perejil,
- Capsidiol (sesquiterpeno), tabaco



Ácido salicílico (SA)



SA: puede estimular la síntesis de: alcaloides, rosmarínico

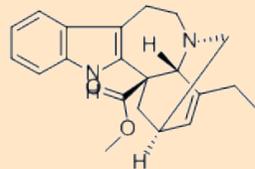
Interacción SA/JA

NO: inducción de:

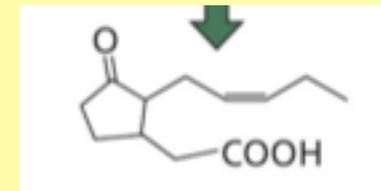
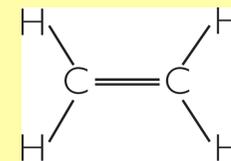
Saponinas, **CC de ginseng:**

Fitoalexinas, **soja**

Catarantina, ***C. roseus***



Etileno. Jasmónico:



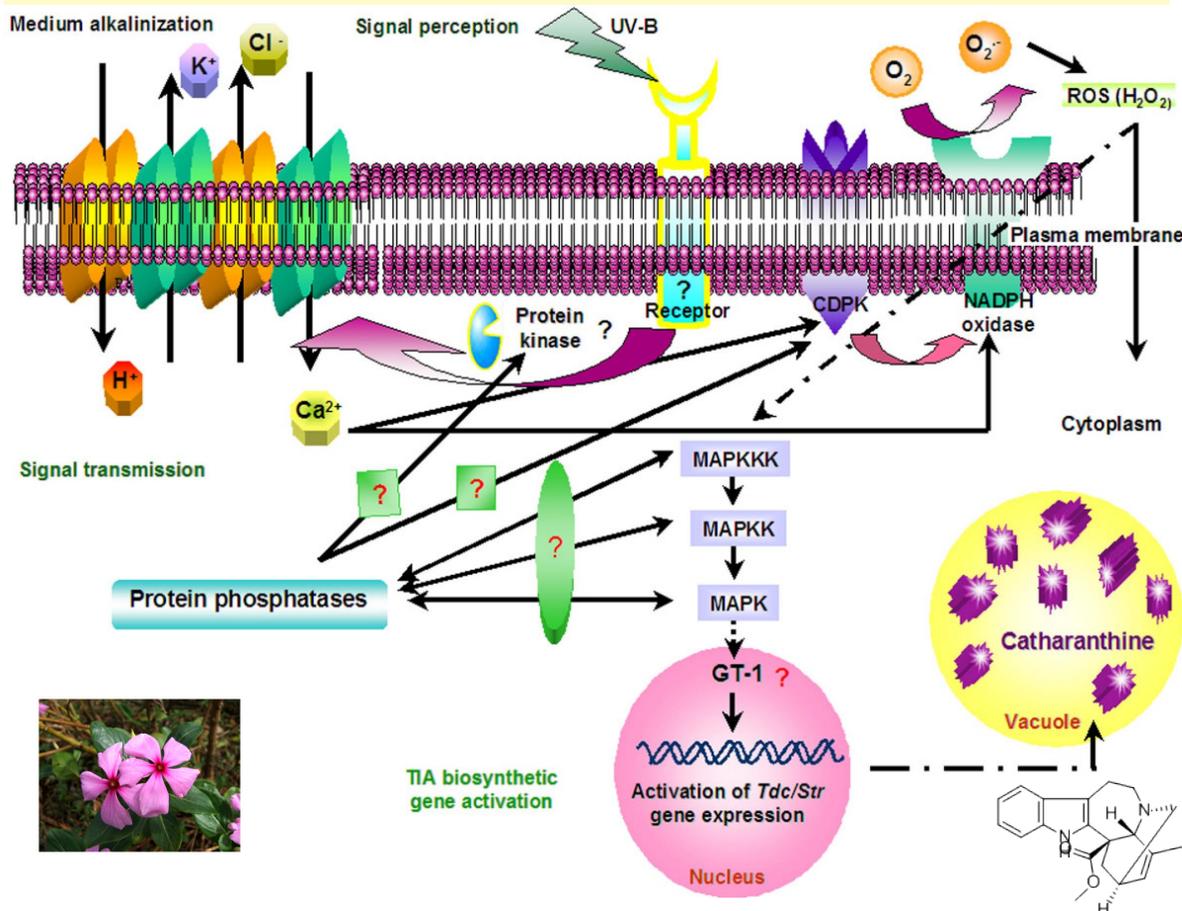
Bajas concentraciones.

Interacción JA/etileno



Elicitor abiótico: radiación UV

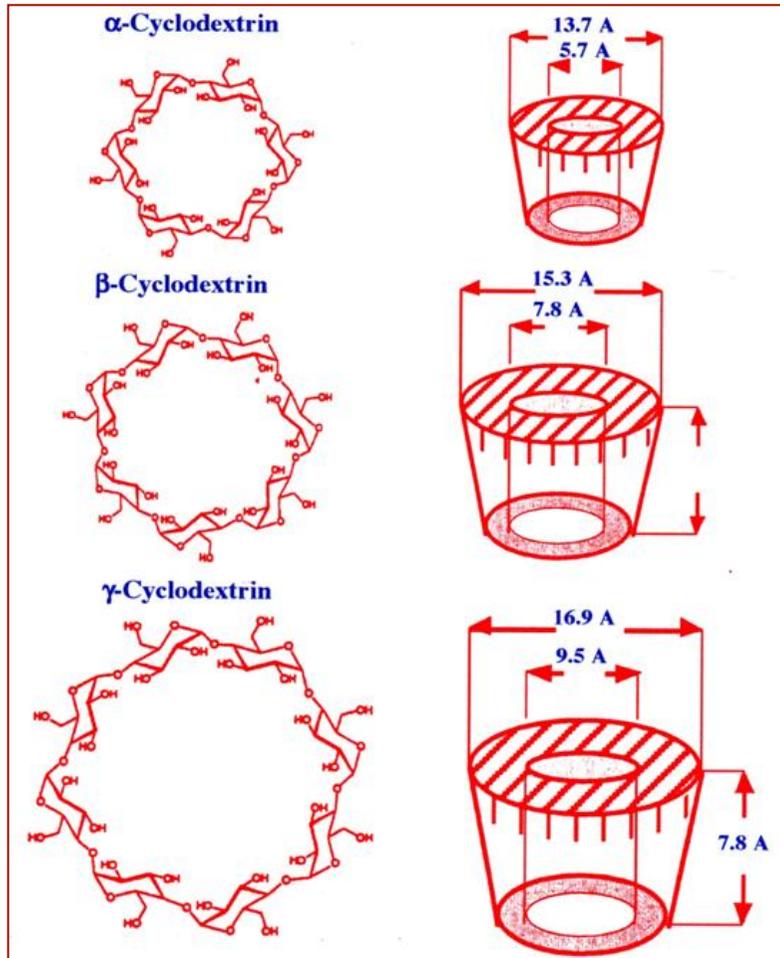
Exposición de SC de *Catharanthus roseus* a bajas dosis de luz UV-B: aumentar los niveles de catarantina y la transcripción de los genes que codifican Trp descarboxilasa (Tdc) y estrictosidina sintasa (Str)



Upon perception of the UV-B light via a putative receptor, protein phosphorylation is required to induce influx of calcium via plasma membrane channels. This leads to a transient increase in cytosolic calcium levels, which is required for the subsequent activation of calcium dependent protein kinases CDPK. Then, the activated CDPK would regulate the activation of NADPH oxidase in the plasma membrane and release ROS. Finally, downstream of ROS production, the UV-B-induced and activated MAP kinases possibly participate in the activation of regulatory proteins such as GT-1 nuclear factor leading to transcriptional activation of TIA (Terpenoid indole alkaloid pathway) biosynthetic genes and enhanced production of catharanthine.

UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. BMC Plant Biology 2007, 7:61

Ciclodextrinas



Ciclodextrinas: Oligosacáridos cíclicos formados por 6, 7, 8 unidades de glucopiranosas unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$.

Se producen a partir de la **degradación enzimática del almidón** por la enzima **ciclodextrín-glicocil-transferasa** segregada por microorganismos del género ***Bacillus***.

Forma: anillo tronco cónico.

C_2 y C_3 de glucosa hacia el interior del anillo y C_6 hacia el exterior.

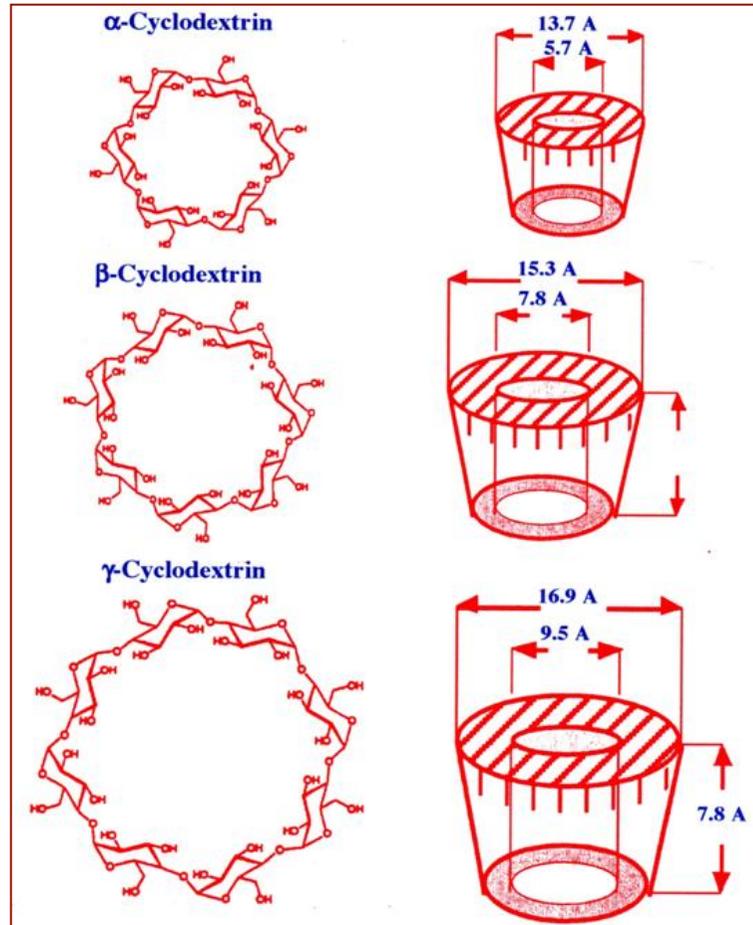
–OH del C_6 situados en la cara ancha del tronco

–OH de C_2 y C_3 : cara estrecha del cono.

Interior altamente apolar (grupos –CH) y una superficie exterior hidrofílica (–OH).

Principal característica de las CD es la **formación de complejos de inclusión**, nombre que reciben las estructuras formadas por la unión de la CD con una molécula (orgánica, inorgánica o ión) en su cavidad hidrofóbica.

Ciclodextrinas



Uso ciclodextrinas en cultivo *in vitro*:

- A bajas concentraciones (50 mM): **inocuas**.
- **Aumentan la producción de MS:**
 - **Secuestrar el producto del medio.**
 - No inhibición feed-back (retroalimentación).
 - Protección de los metabolitos frente a la degradación.
 - **Inducir genes implicados en defensa**
 - Inducción de fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)
 - Reforzar la pared celular

Elicitación. Ejemplos e incremento de la producción

Table 11 Biotic elicitors and production of secondary metabolites

Biotic elicitor	Product	Cell culture	Refs.
Agarpectin	Shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Namdeo 2007
Chitosan	Anthraquinones	<i>Rubia tinctorum</i>	Vasconsuelo et al. 2004
	Antraquinones	<i>Morinda citrifolia</i>	Dornenburg and Knorr 1997
Fungal elicitor	Acridone epoxide	<i>Ruta graveolones</i>	Namdeo 2007
	Antraquinones	<i>Morinda citrifolia</i>	Dornenburg and Knorr 1997
	Codeine, morphine	<i>Papaver somniferum</i>	Dicosmo and Misawa 1995
	Taxol	<i>Taxus sp.</i>	Wang et al. 2003
	Rosmarinic acid	<i>Coleus blumei</i>	Szabo et al. 1999
Jasmonic acid	Sanquinarine	<i>Papaver somniferum</i>	Dicosmo and Misawa 1995
	Anthocyanins	<i>Viti vinifera</i>	Curtin et al. 2003
	Methyl jasmonate	<i>Nicotiana tabacum</i>	Namdeo 2007
Salicylic acid	Capsidiol, nicotine	<i>Coleus blumei</i>	Szabo et al. 1999
	Rosmarinic acid	<i>Taxus sp.</i>	Tabata 2006
Yeast elicitor	Taxol	<i>Azadirachta indica</i>	Namdeo 2007
	Azadirachtin	<i>Morinda citrifolia</i>	Dornenburg and Knorr 1997
Yeast elicitor	Antraquinones	<i>Morinda citrifolia</i>	Dornenburg and Knorr 1997
	Rosmarinic acid	<i>Coleus blumei</i>	Petersen and Simmond 2003

Table 12 Comparison of production of secondary metabolite after elicitation

Cells culture	Elicitor	Products	Product concentration		Refs.
			Control	Elicitation	
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Pythium sp.</i>	Ajmalicine	0	400	$\mu\text{g l}^{-1}$ Asada and Shuler 1989
<i>Morinda citrifolia</i>	Chitin	Anthraquinones	3	7	$\mu\text{g g}^{-1}$ FW Dornenburg and Knorr 1997
<i>Rubia tinctorum</i>	Chitosan	Anthraquinone	58	128	$\mu\text{mol g}^{-1}$ FW Vasconsuelo et al. 2004
<i>Papaver bracteatum</i>	Sp-cAMPS	Forskolin	56.9	69.3	
	Dendryphion	Sanguinarine	50	450	$\mu\text{g g}^{-1}$ FW Dicosmo and Misawa 1995
<i>Vitis vinifera</i>	Jasmonic acid	Anthocyanins	9.2	20.7	mg g^{-1} DW Curtin et al. 2003

Smetanska, 2008. Adv Biochem Engin/Biotechnol 111: 187–228

Diferencia entre células vegetales y bacterianas

Caracterización	Células microbianas	Células vegetales	Consecuencias para cultivos a gran escala
Tamaño y morfología	Células Individuales 2-10 μm	Agregados de 10-200 μm y de hasta 2 mm de diámetro	Sedimentación rápida; sensibilidad a fuerzas de corte; formación de gradientes; dificultad para tomar muestras
Velocidad de crecimiento	Rápida; td ~ 1-2 h	Lenta; td ~ 2-5 días	Largos tiempos de proceso; baja productividad
Densidad de inoculación	Pequeña	5-20%	Necesidad de grandes cantidades de inóculo; escalado más largo
Sensibilidad a fuerzas de corte	Insensible	Sensible / Tolerante	Bajas velocidades de agitación
Aireación	Alta	Baja	Baja demanda de oxígeno: fermentadores con baja transferencia de oxígeno
Acumulación del producto	Extracelular	Intracelular / a veces extracelular	Permeabilización; remoción <i>in situ</i>



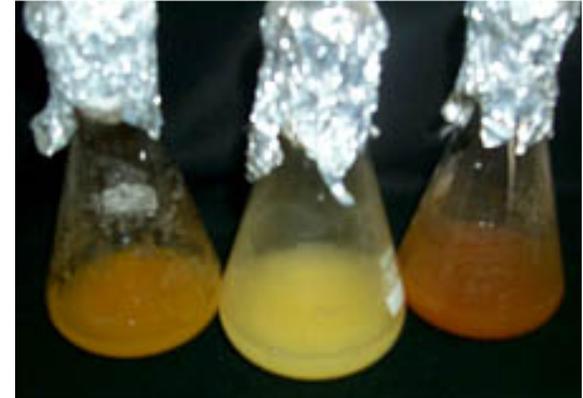
Suspensiones celulares

- **Factores a tener en cuenta:**

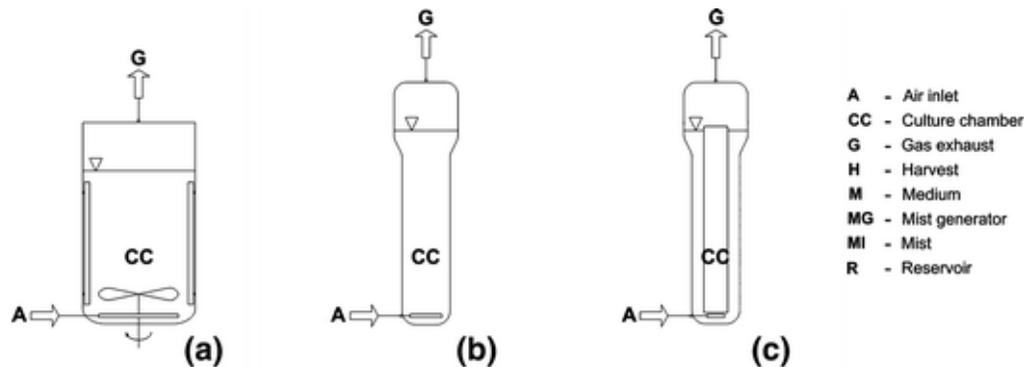
- Tasa de crecimiento
- Volumen del inóculo
- Tamaño y agregación de las células
- Oxigenación
- Agitación

- **Puntos críticos en el escalado:**

- Muy importante determinar las fuerzas de cizalla o de corte y cómo el tipo de biorreactor (difusores, impulsores) afecta a dichas fuerzas.
 - Lisis celular: aumenta con el tamaño de las células y con la edad del cultivo
- La morfología, reología, tolerancia a las fuerzas de cizalla, crecimiento, producción (si el MS se obtiene al final de la fase de crecimiento, o si está asociado con el crecimiento; o si se excreta o no al medio) **debe tenerse en cuenta a la hora de elegir el biorreactor.**



Tipos de biorreactores



Biorreactores derivados de bacterias (mínimas modificaciones)

Constan de:

- Contenedor rígido (vidrio, acero inoxidable) y
- Sistema de aireación y mezcla del cultivo (impulsor, difusores)

Tipos:

a) Stainless steel stirred bioreactors,

a) agitación: aletas o turbinas.

b) aire se inyecta en la parte inferior y difunde a través de una boquilla de difusión

b) Bubble column reactors,

c) Airlift reactors.

Inconvenientes: Alto coste

a) Precio biorreactor. Acero inoxidable, vidrio; esterilizar cada cultivo.

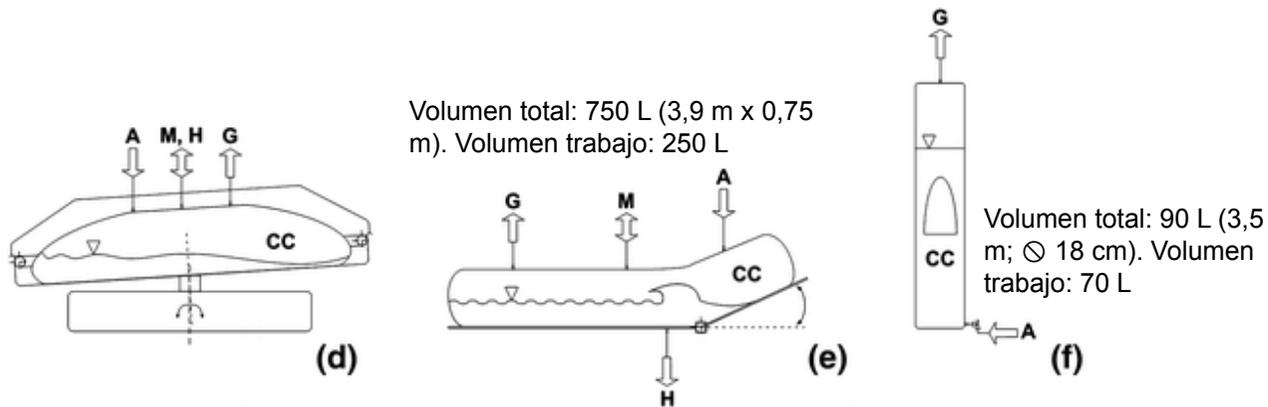
b) Aireación-Burbujeo:

a) puede dañar a las células

b) generar espuma (polisacáridos extracelulares, ácidos grasos y azúcares del medio).

Obturar filtros

Tipos de biorreactores



Búsqueda de biorreactores más baratos (plástico, polietileno grado biofarmacéutico, *Flexible plastic disposable bioreactor*):

- Contenedor de plástico flexible, que contiene medio y que está inflado.
- Agitación y oxigenación.
 - Balanceo (agitador) (d)
 - Wave/undertow (ola/resaca) induction (e)
 - Generación gran burbuja de aire

Tipos:

(d) BioWave reactor,

(e) Wave & Undertow Bioreactor,

Mesa horizontal, equipada en un extremo con una plataforma que asciende periódicamente. Aireación, no burbujas

(f) Slug Bubble Bioreactor,

Plástico cilíndrico, relleno de medio 80% de su altura. Agitación y aireación: generación de una única burbuja (abajo) que asciende por el sistema

Cultivo de órganos

- **Ventajas**

- Menor sensibilidad a las fuerzas de cizalla.
 - Excepciones. Raíces de *Catharanthus roseus*
- Mayor estabilidad genética
 - Producción del metabolito: no errática

- **Inconvenientes**

- Crecimiento no homogéneo
 - Tipo de biorreactor
- En el órgano: células jóvenes y adultas
 - Distintas posibilidades de síntesis
- Producción MS:
 - Intracelular (single-stage bioreactor)
 - Producción MS y crecimiento

Cultivo de órganos: raíces

Propiedad	Suspensiones	Raíces transformadas
Forma de crecimiento	Células simples-agregados	Red de ramificaciones
Patrón de crecimiento	Desorganizado; cada célula puede dividirse y expandirse	División celular localizada; crecimiento linear con ramificaciones laterales
Tiempo de duplicación	15 h-días	36 h-días
Biomasa final (peso seco/L)	30-60 g	30-60 g
Background genético	Heterogéneo	Euploide
Formación inicial de producto	Usualmente bajo	Similares a la planta madre
Medio de crecimiento	Complejo; hormonas y vitaminas	Simple, sales y azúcar
Localización del producto	Intracelular- extracelular	Intracelular- extracelular
Tipo de proceso	<i>Batch</i> ; continuo, deben ser inmovilizadas	<i>Batch</i> o continuo, no hay necesidad de inmovilizar



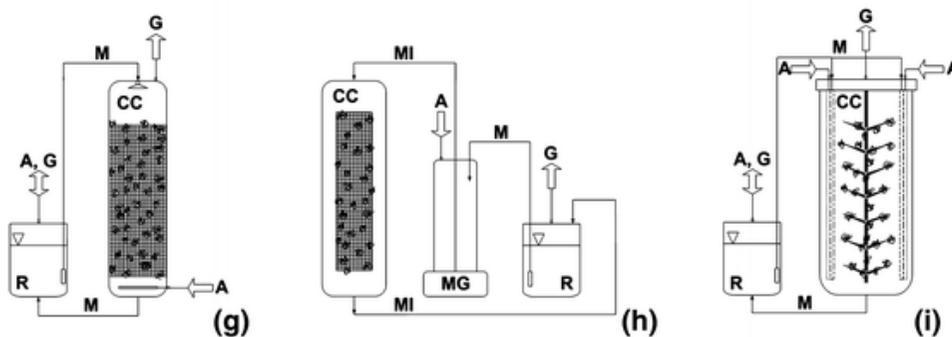
Metabolitos obtenidos mediante cultivo de raíces transformadas

Metabolito	Género
Alcaloide	
Alcaloides piridínicos	<i>Nicotiana</i>
Indoles	<i>Catharanthus</i>
	<i>Cinchona</i>
Tropano	<i>Duboisia</i>
	<i>Datura</i>
Otros	
Betalaina	<i>Beta</i>
Sesquiterpenos	<i>Lippia</i>
	<i>Artemisia</i>
Poliacetilenos	<i>Coreopsis, Bidens</i>
Tiofenos	<i>Tagetes</i>
Glicósidos cardioactivos	<i>Digitalis</i>
Antraquinonas	<i>Cassia</i>
Saponinas	<i>Panax</i>
Polyines	<i>Chaenactis</i>
Lignanós	<i>Podophyllum</i>
	<i>Linum</i>
Naftoquinonas	<i>Lithospermum</i>
Esteroides	<i>Solanum</i>

Biorreactores: cultivo raíces

- Morfología y fisiología radicular
- Fuerza de cizalla. Menor sensibilidad
- Buen suministro de oxígeno y nutrientes: cultivo de raíces denso
- Otros aspectos.
 - En general: crecimiento raíces: no es homogéneo
 - Tendencia a formar agregados (*clumps*) de raíces primarias y secundarias
- Inmovilización de raíces.
 - Mallas verticales y horizontales
 - Espuma de poliuretano
- Alejar raíces de propulsores (impellers)
- Reducir limitación de oxígeno
 - Biorreactores: fase gaseosa: raíces expuestas a aire húmedo o una mezcla de gases y nutrientes que se suministran en forma de gota (varía el tamaño de gota)

Aspectos a tener en cuenta a la hora de seleccionar un biorreactor



(g) Spray bioreactor, (h) Mist bioreactor, (i) Low Cost Mist Bioreactor (LCMB).
Phytochem Rev (2008) 7:593

Cultivo de órganos: vástagos

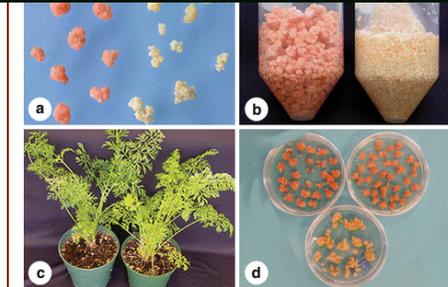
- **Ventajas**
 - Cultivos genética y bioquímicamente estables (al igual que las raíces)
 - Buena capacidad para la producción de MS: MS sintetizados y/o acumulados en tejidos presentes en tallos y hojas
- **Desventajas**
 - Vitrificación
 - Tasa de crecimiento
 - Requieren luz (problema biorreactores grandes de acero)

Compuesto	Planta
Piretrinas	<i>Chrysanthemum</i> spp.
Cardenólidos	<i>Digitalis</i> spp.
Artemisinina	<i>Artemisia annua</i>
Aceites esenciales	<i>Mentha</i> spp.
Aceites esenciales	<i>Pelargonium</i> spp.

Regulación producción-Ingeniería metabólica

Ingeniería metabólica: mejora de la actividad celular mediante la manipulación de genes mediante la tecnología del ADN recombinante

- Introducción de genes bajo el control de promotores que incrementen la expresión del gen de interés
 - Modificación del color (flor)
 - Chalcona sintasa
 - Modificación de carotenoides
 - “Golden rice”
 - Obtención de cetocarotenoides (astaxantina)
 - carotenoides oxigenados, color rosáceo-rojizo. Alto poder antioxidante (> licopeno, carotenos)
- Eliminación de lignina (papel)
 - Uso de genes antisentido o co-supresión
- Obtención de fármacos
 - Alcaloides
 - Yun et al (1992). Introducción del gen hyoscyamine 6 β -hydrolasa (H6H) de *Hyoscyamus niger* en *Atropa belladonna*: escopolamina



<http://www.bibc.psn.ru/En/div/biotron-en.html>
Transgenic Research 17
(2007):489

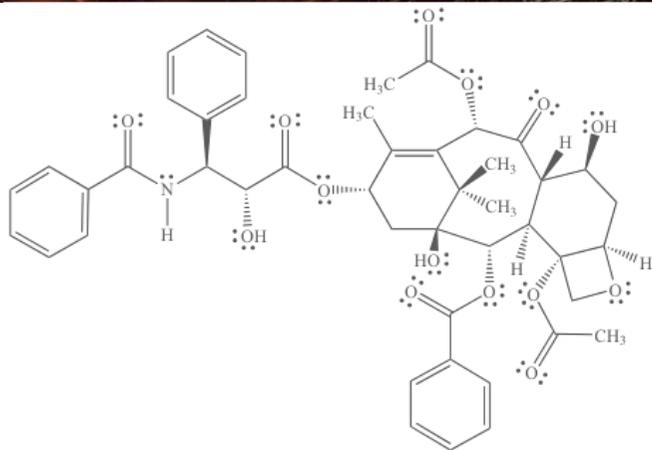
Algunos ejemplos

Paclitaxel (Taxol). Diterpeno cíclico. Potente anticancerígeno

Artemisina. *Sesquiterpene lactone endoperoxide*



Taxus brevifolia



Paclitaxel (Taxol)

Taxol es un compuesto anticancerígeno que se obtiene de la corteza del tejo.

- 1960: National Cancer Institute (NCI) y Departamento de Agricultura EEUU:

 - búsqueda compuestos anticancerígenos

- 1987: identificación del taxol en árboles de tejo del NE del Pacífico: *Taxus brevifolia*.

- **Muy efectivo contra el cáncer** de ovario, pulmón, melanoma y colon:

 - Interrumpe el ciclo celular. Unión a microtúbulos e impide su despolimerización (cese del ciclo celular)

- Suministro de taxol: muy limitado.

 - Árbol joven (leño fino): 0.001% taxol DW

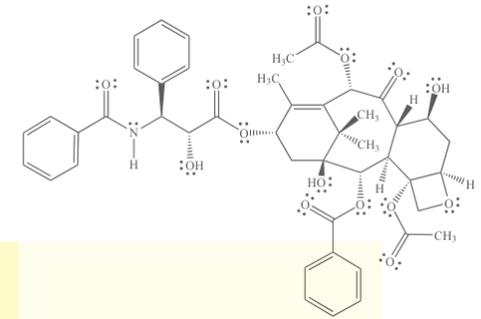
 - Árbol centenario: se obtienen 3 kg de madera para obtener 300 mg de taxol:

 - una dosis en un tratamiento de cáncer.

Taxol
Docetaxel
Baccatin III

<http://www.chem.ucla.edu/>, <http://dailyqi.com/?>

Taxol. Biotecnología



a) Cultivo de tejidos de *Taxus brevifolia*

- Distintos tipos de células de diferentes tejidos de tejo:
 - Diferencia del 25% en la producción.
 - Taxol se secreta al medio: facilita la recolección.
 - Producción: 1-4 mg de taxol/L de cultivo celular (25 g de madera)

b) Búsqueda de especies alternativas

- Algunos árboles de tejo europeo (*Taxus baccata*) producen un precursor del taxol.
- El precursor se usa para la síntesis química del taxol.

c) Ingeniería genética

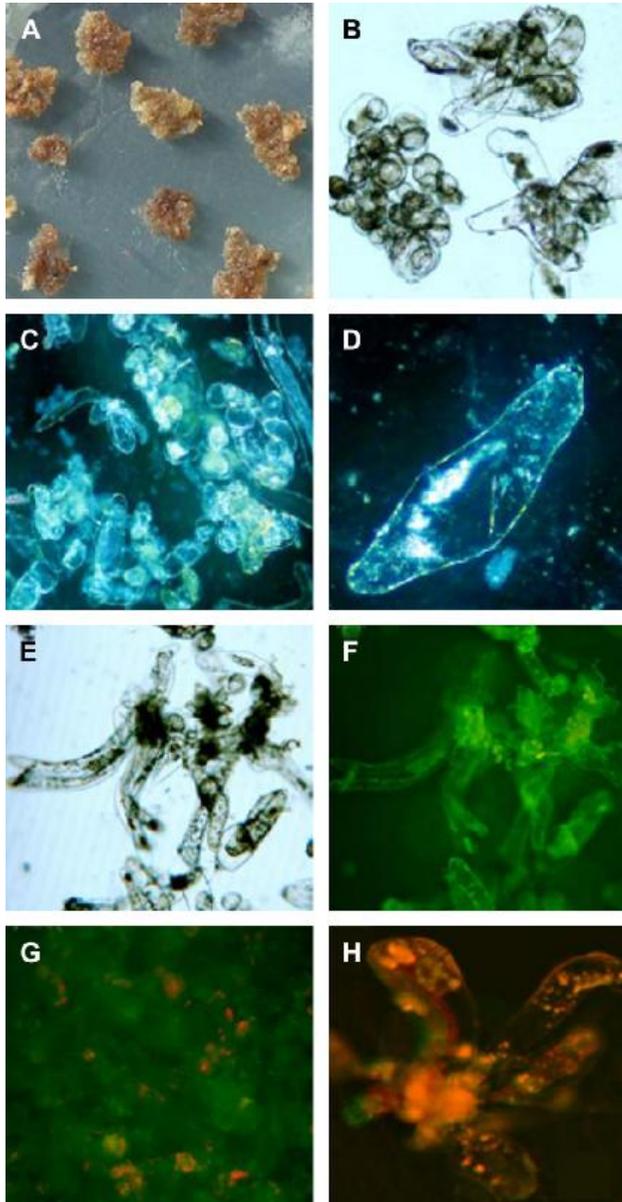
- Búsqueda de los genes implicados en la biosíntesis del taxol.
- Mejorar la producción en cultivos celulares mediante ingeniería genética

d) Síntesis química

e) Hongos que producen taxol

- Hongos que colonizan al tejo: también producen taxol.
 - Fuente alternativa para la producción de taxol.

Cell Biology International (2006) 30, 262–269. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*

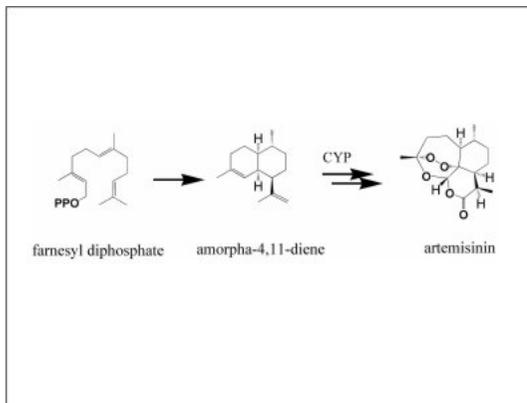


Gran esfuerzo para mejorar la producción de Taxol

- **Cultivo celular de *Taxus baccata*:** en dos etapas.
- **Para mejorar la producción y la productividad:**
 - **Inicio etapa I de crecimiento:** adición vanadil sulfato (0.1mg/l), AgNO_3 (0.3mg/l) and CoCl (0.25mg/l)
 - **Mitad etapa I** (día 10): se añade sacarosa (1%) y citrato amónico (50mg/l)
 - **Final etapa I** (día 20): adición de sacarosa (1%) y fenilalanina (0.1mM).
- **Etapa II** (día 25). **Adición de elicitores** a diferentes concentraciones: MeJA (10 o 20 mg/l), SA (50 o 100 mg/l) y elicitores fúngicos (25 o 50 mg/l)
- **Análisis morfológico.** Taxol asociado a la célula y al espacio extracelular.
 - Cantidad de taxol:
 - Células control: 2.45 mg/L
 - Etapa I: 13.75 mg/L
 - Etapa II: 39.5 mg/L
 - Análisis microscópicos. Correlación directa entre la auto-fluorescencia y la producción de taxol

The light and fluorescent microscopic images of the callus and *Taxus* cells in different stage and conditions. Panels A and B display the light microscopy of fresh callus of *Taxus* and the grown *Taxus* cells in the growth medium at stage I, respectively. Panels C and D show the dark-field microscopic images of cultured *taxus* cells as clumped and elongated single cell, respectively. Panels E and F demonstrate the light and fluorescent microscopic images of *Taxus* cells, respectively. Panels G and H show fluorescent images of the *Taxus* cells in stage II of suspension culture for untreated control and inducer-treated *Taxus* cells, respectively.

Artemisina: un compuesto muy eficaz contra la malaria



<http://cbr.pbi.nrc.ca/>

Malaria: Enfermedad infecciosa provocada por un protozoo (*Plasmodium falciparum*) y transmitida por mosquito *Anopheles*.

- Problema: Malaria resistente a los tratamientos tradicionales. Compuestos derivados de *Artemisia annua* L. son muy eficaces.
 - Precio: \$2.40/dosis. Recomendación de WHO: uso de artemisina para combatir malaria (regiones endémica).
- 350-500 millones afectados/año. Muertes: 1-3 millones (África Sub-Sahariana). Regiones tropicales y subtropicales América, Asia y África

Artemisia annua L.

- **Aceite esencial de *A. annua*** contiene al menos 40 compuestos volátiles y varios sesquiterpenos no volátiles presentes en tricomas glandulares de tallos, hojas y flores.
- **Niveles de artemisina:** mayores en los tricomas de flores
- **Actividad artemisinina y sus derivados.** Además de combatir cepas resistentes de *Plasmodium* sp, presentan propiedades anticancerígenas y antivirales.
- **Cultivo de *Artemisia annua*:** 6 meses mínimo.
- **Proceso de extracción y obtención del producto final:** 2-5 meses. **Altas temperaturas durante la poscosecha:** afectan a la calidad. **Tras la recolección, disminuye** el contenido de artemisina (6-12 meses de almacenamiento: no sirve).

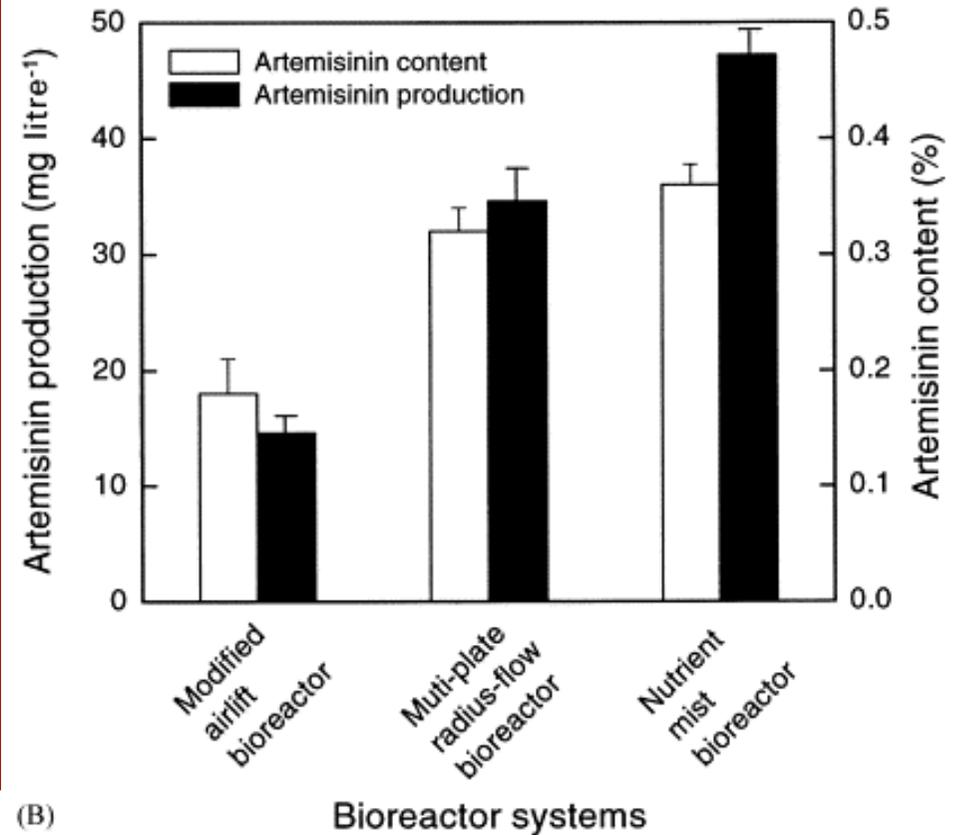
Solución: Bajar el precio del tratamiento



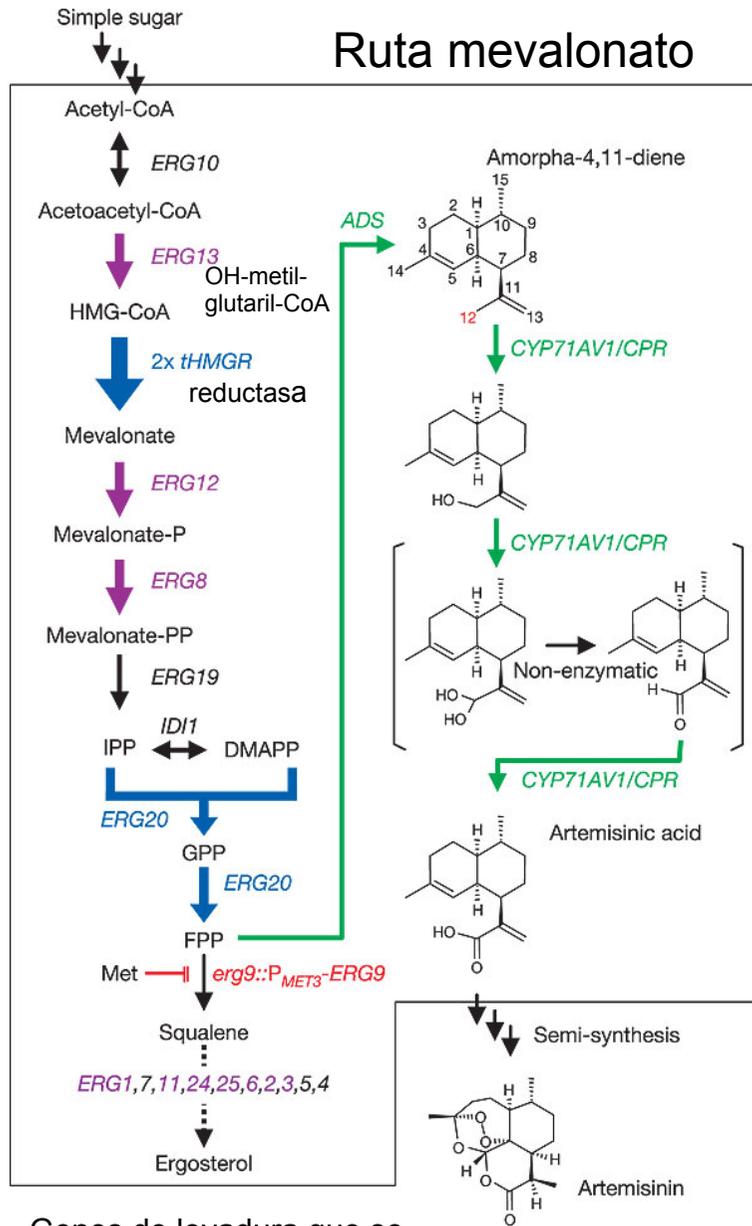
Artemisina: continuación

- **Primeros trabajos:**

- Aumentar la producción mediante mejora clásica.
- Búsqueda de especies con alto contenido en artemisina. *Malaria Journal* 2010, **9**:310
- Producción de artemisina en biorreactores mediante cultivo *in vitro* de vástagos
 - [Process Biochemistry](#) 39 (2003):45-49



Artemisina: continuación



Genes de levadura que se han inducido directamente (azul) e indirectamente (púrpura)

Nature 440
(2006):940

Sistemas de expresión heteróloga

Identificación genes implicados ruta de biosíntesis en *A. annua*: citocromo P450 (*CYP71AV1*) que lleva a cabo 3 etapas de oxidación de amorpha-4,11 dieno a ácido artemisínico.

-Permite una aproximación barata a la síntesis de artemisina.
-Producción del precursor de artemisina en *Saccharomyces cerevisiae* es 2 órdenes de magnitud superior a los niveles encontrados en plantas.

-Artemisinic-acid producing yeast. 3 etapas:

- **Incremento de los niveles de FPP** (sobre-expresión de genes implicados en la biosíntesis de FPP)
- **Disminuir su uso en la síntesis de esteroides**. Uso de un promotor que se inhibe por Met
- **Introducción gen amorphadiene synthase (ADS)**: convierte FPP en amorphadiene
- **Introducción del citocromo P450 (*CYP71AV1*)**

2004. Bill and Melinda Gates Foundation.

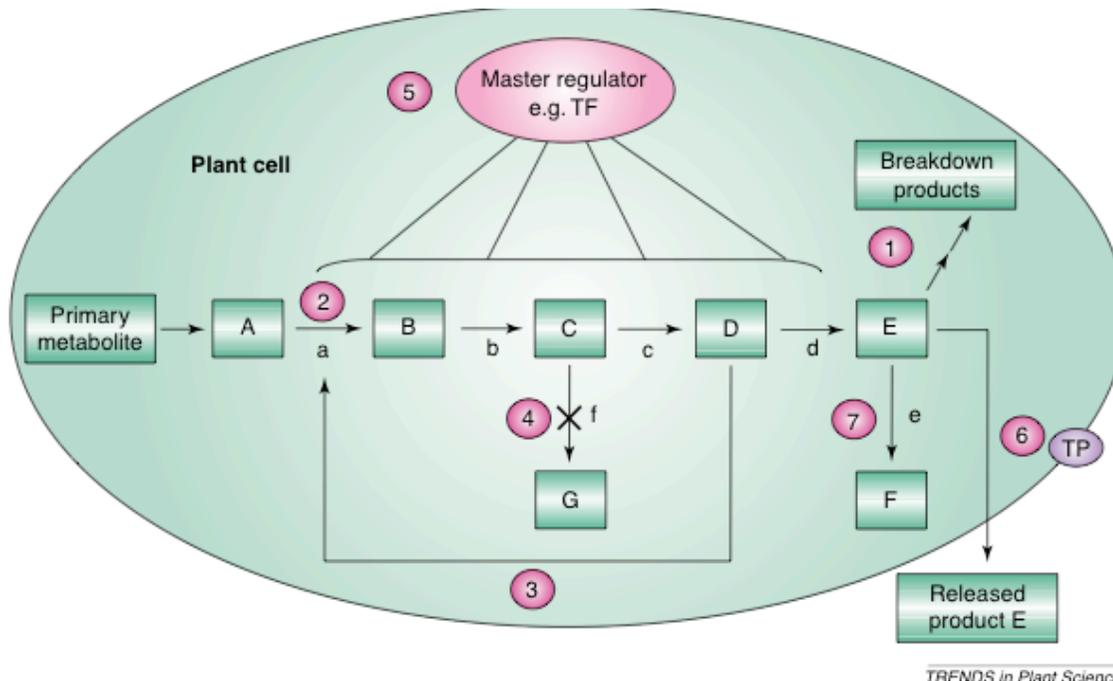
- \$42.5 millones (5 años)
- Institute for OneWorld Health, a una compañía farmacéutica (non-profit) Amyris Biotechnologies y a la Universidad de California (Berkeley)
- Reducir precio tratamiento con artemisina mediante **synthetic biology** en *E. coli*.

Producción: 150 mg/L. Objetivo del grupo Keasling bajar el precio de la dosis de \$2,40 a 0,25



Ingeniería metabólica

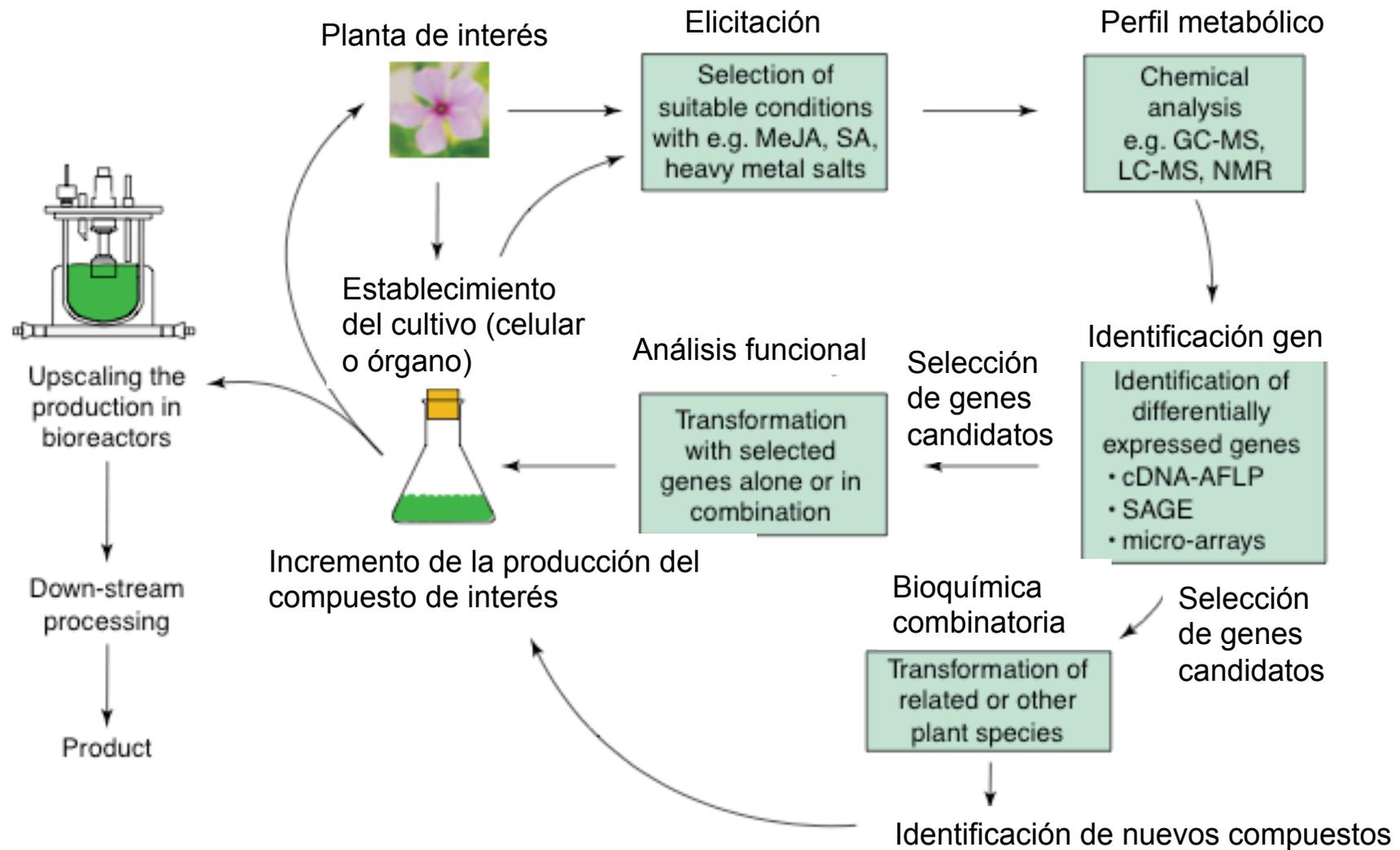
Conocimiento completo de la ruta biosintética y su regulación



Trends Plant Sci 9 (2004): 443-440

Hypothetical biosynthetic pathway of the secondary metabolite E. Genes a–d are involved in the biosynthesis of the desired metabolite E. Gene e is involved in further metabolism of the compound E to F. The function of gene f can be blocked using RNAi or antisense techniques. TF is a transcription factor with a role as a master regulator. TP is a transporter protein that is involved in transporting compound E from inside the plant cell to vacuoles and extracellular spaces.

1. Disminuir el catabolismo del MS
2. Potenciar la expresión o actividad de las enzimas limitantes de la ruta
3. Disminuir el flujo a rutas competitivas
4. Aumentar la expresión o actividad de todos los genes implicados
5. Compartimentalización del MS
6. Conversión de un producto existente en un nuevo producto



Outline of how functional genomics could contribute to enhancing the production of known and novel secondary metabolites in plant cells. Abbreviations: AFLP, amplified fragment length polymorphism; GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; LC-MS, liquid chromatography–mass spectrometry; MeJA, methyl jasmonate; NMR, nuclear magnetic resonance; SA, salicylic acid; SAGE, serial analysis of gene expression.

Trends Plant Sci 9 (2004): 443-440