

Cultiu de cèl·lules i òrgans vegetals per a la producció de compostos bioactius

Group of Plant
Biotechnology



Phytochemical
Production

Les habilitats:



Group of Plant
Biotechnology

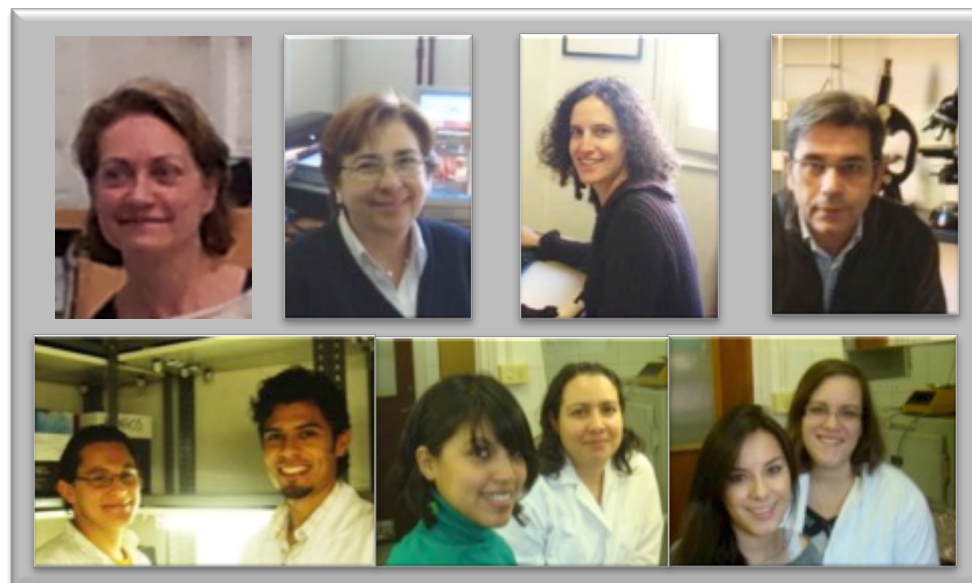


Phytochemical
Production

El grup:

- Javier Palazon PhD.
- Rosa M. Cusido PhD.
- Mercedes Bonfill** PhD.
- Elisabeth Moyano. PhD

- Ana Gallego, Karla Ramírez, H. Rafael Vidal, Liliana Lalaleo, Diego Hidalgo.

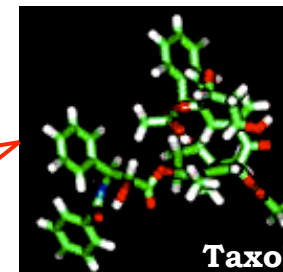


El nostre principal objectiu:

Cultius
tradicionals



Cultius de *Taxus* a Yunnan (Xina)



Alcaloide diterpènic
(anticancerígen)

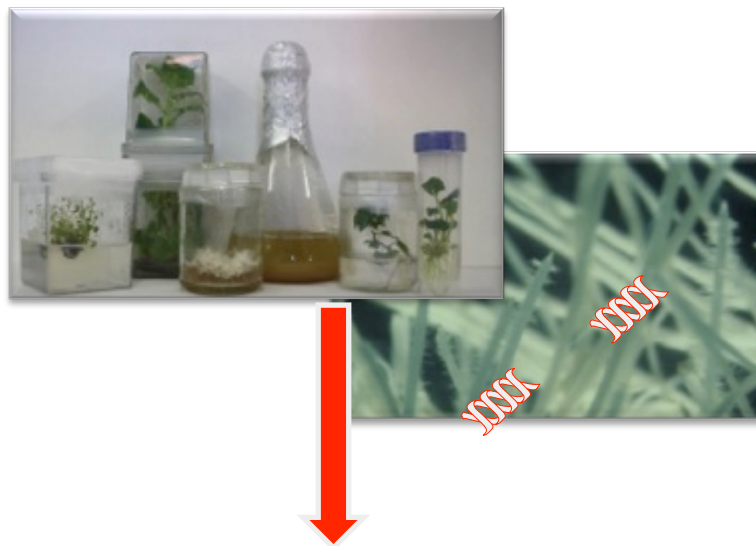
Producció
Biotecnològica
de Fitofàrmacs
en
**Factories de
Cèl·lules
Vegetals**



Phyton Biotech. fàbrica per la producció de taxol

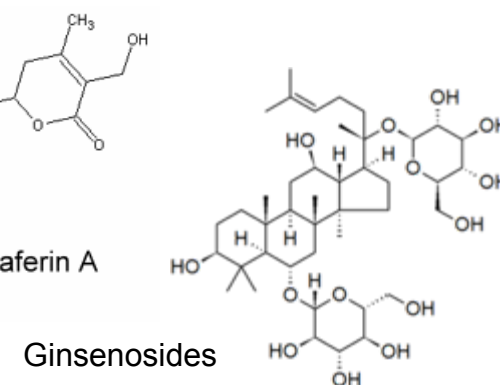
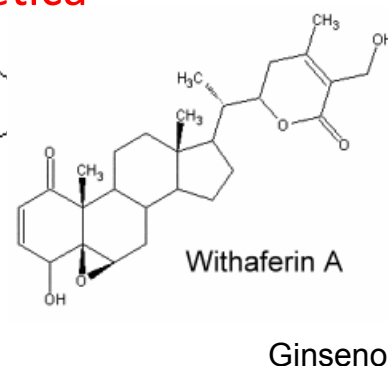
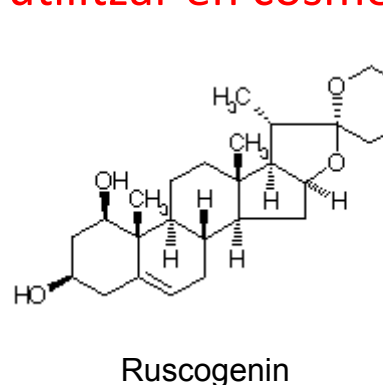
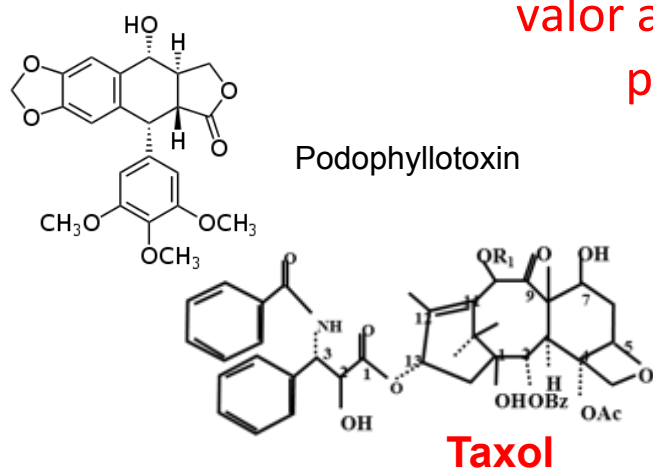
- Capacitat de recollir el producte d'interès en qualsevol part del món amb un control estricte de producció i qualitat.
- No es necessiten herbicides ni pesticides.
- No hi ha problemes climàtics ni ecològics.
- Cicles de creixement de setmanes en lloc d'anys com a la planta intacta.

- Selecció de genotips altament productius
- Micropropagació de plantes aromàtiques i medicinals
- Producció de compostos bioactius en cultius de cèl·lules vegetals i arrels transformades



- Estudis genòmics i metabòlics del metabolisme secundari
- Enginyeria metabòlica per millorar la producció de les plantes transgèniques o dels cultius cel·lulars vegetals.

Producció de compostos bioactius d'alt valor afegit. Cèl·lules mare vegetals per utilitzar en cosmètica



La nostra experiència:

MICROPROPAGACIÓ

Micropropagació
de plantes
aromàtiques i
medicinals:

Centella asiatica:



Micropropagació de *C. asiatica* mitjançant llavors artificials

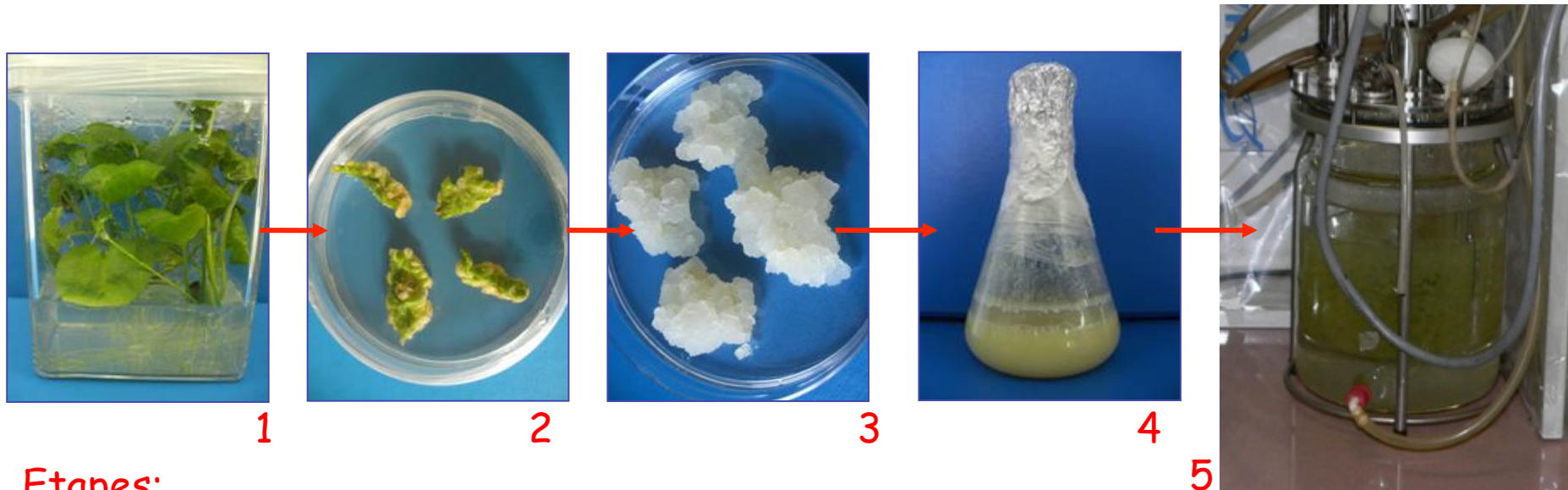
Vitis vinifera:



Varietats
lliures de
virus per
exportar Xile
(ALTALENA
SA.)

Altres espècies vegetals: *Digitalis purpurea*, *Lavandula dentata*, *Ruscus aculeatus*, *Taxus baccata*, *Linum album*, *Corylus avellana*.

Factories de cèl·lules vegetals: Metodologia



Etapes:

- 1: Selecció del genotip més productiu i micropropagació
- 2: Desenvolupament del call
- 3: Cultiu de call
- 4: Cultius cel·lulars i optimització de la producció
- 5: Escalat a bioreactor

Cultius cel·lulars de *Centella asiatica*



FACTORIES DE CÈL·LULES VEGETALS I CÈL·LULES MARE

Producció de
fitofàrmacs en
cultius cel·lulars:

Centellosides



Ruscogenins



Podophyllotoxin



Taxol



Cèl·lules en suspensió de *Taxus* immobilitzades en perles d'alginat

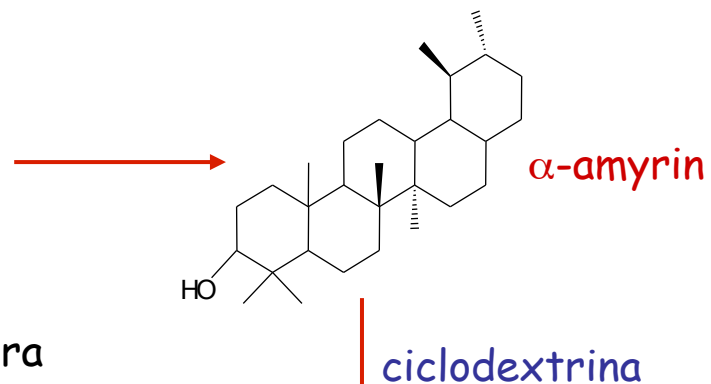
Altres compostos: Digoxina, alcaloïdes de tabac, galphimines

Cèl·lules mare vegetals: *Vitis vinifera* i *Centella asiatica* per utilització en cosmètica

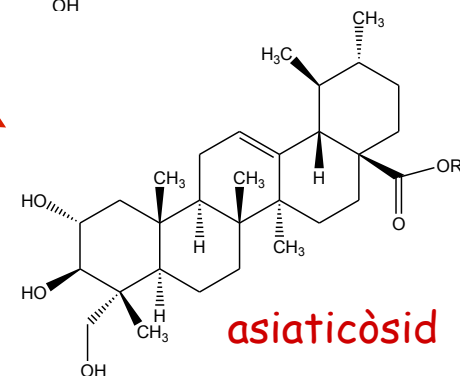
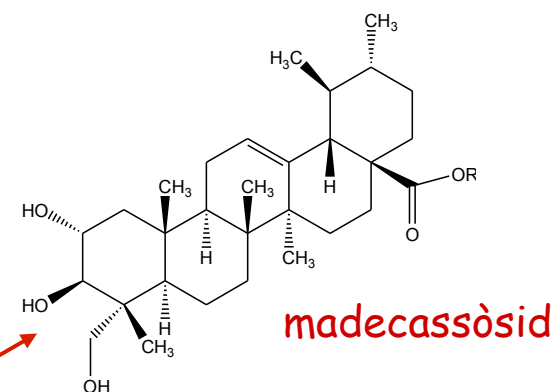
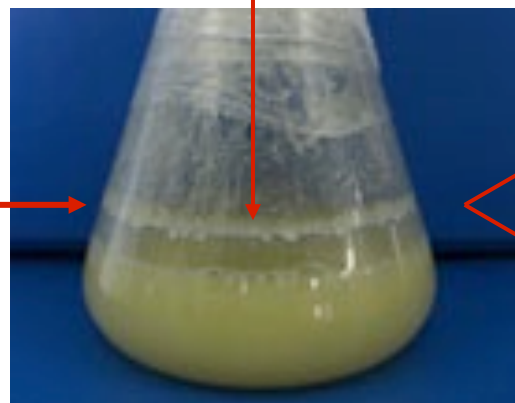
Biotransformacions vegetals:



Copal blanc de Sonora



Centella asiatica cell cultures



Biotransformació del substrat α -amyrin en centellòsids

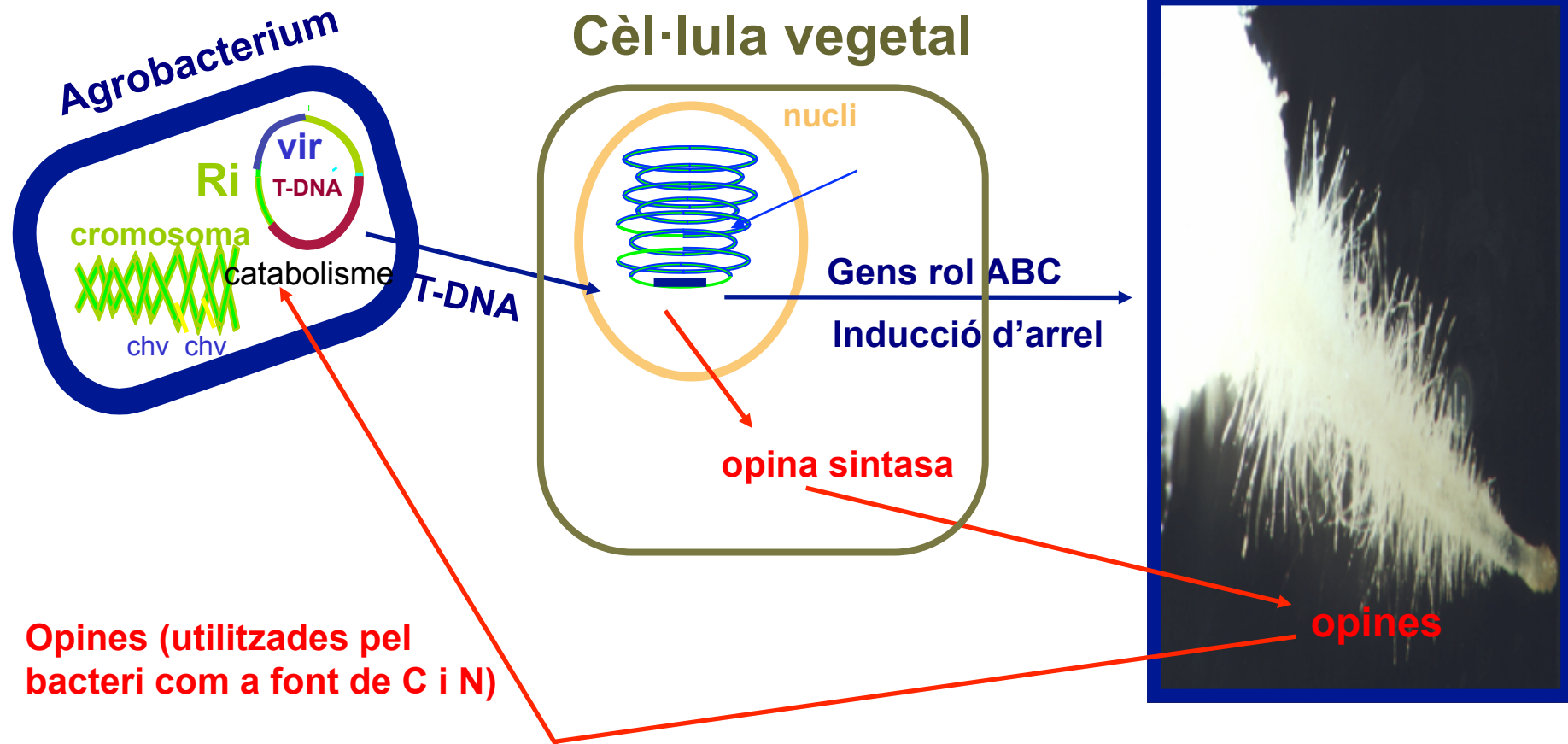
Arrels transformades a la natura



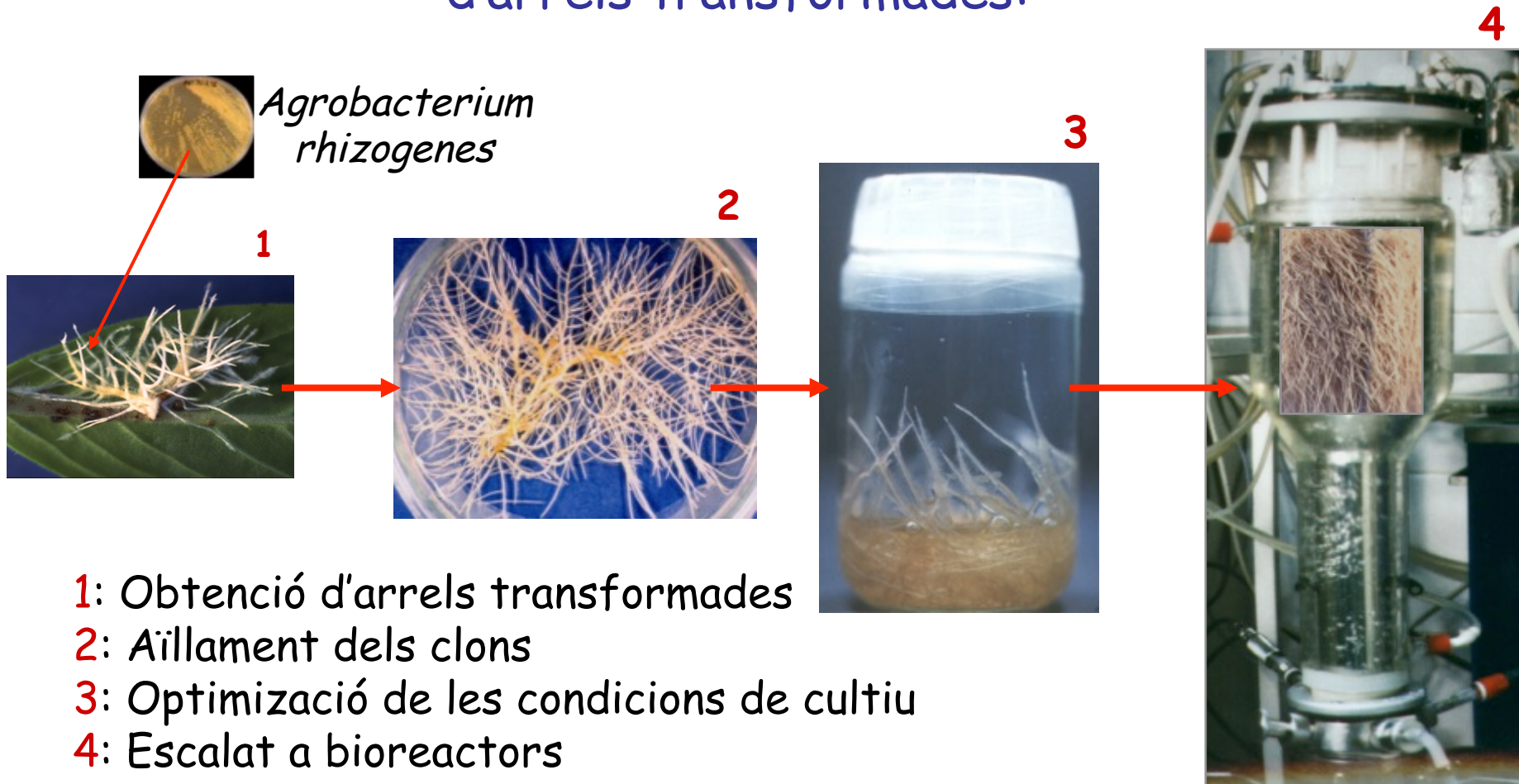
Agrobacterium rhizogenes

Arrels transformades

Mecanisme de la transformació genètica



Metodologia per a la obtenció d'arrels transformades:



Cultiu d'arrels transformades de *Catharanthus roseus* escalades a bioreactor



Cultiu d'arrels transformades de
Panax ginseng en un bioreactor spray

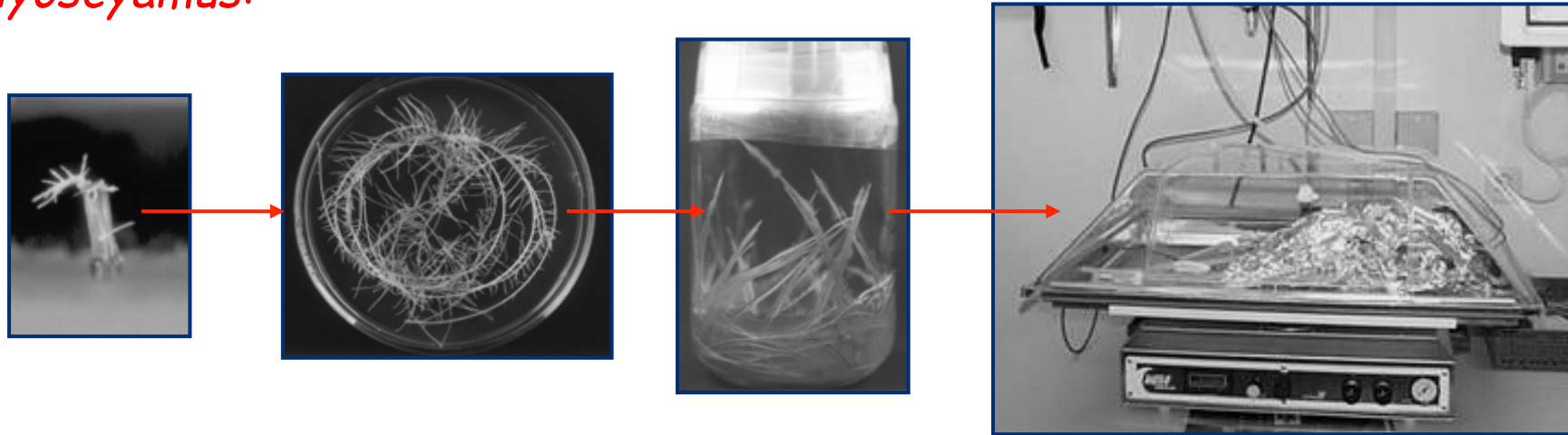
CULTIUS D'ARRELS TRANSFORMADES

Producció de
fitofàrmacs en
cultius d'arrels
transformades

Ajmalicina →
Ginsenosids →
Escopolamina →
Withanòlids →
PTOX, MPTOX →

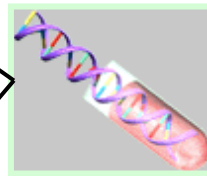
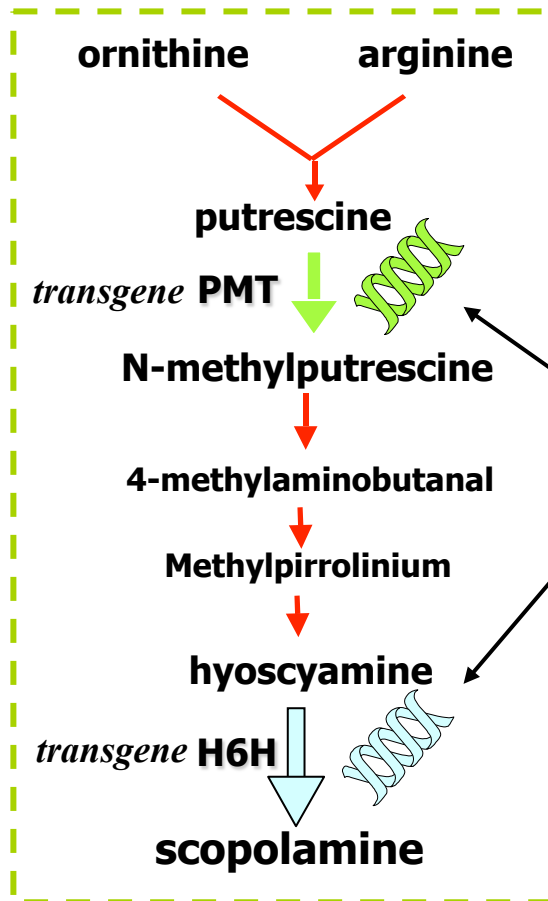
Enginyeria metabòlica per millorar la producció d'escopolamina en cultius d'arrels transformades:

1er pas: Obtenció d'arrels transformades de *Datura*, *Duboisia* & *Hyoscyamus*:

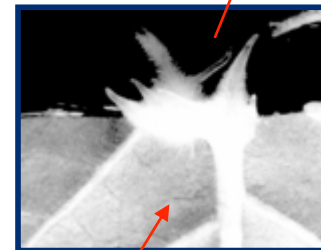


Arrels transformades de *Duboisia* hybrid escalades en un bioreactor wave

2on pas: Enginyeria metabòlica per millorar la producció d'escopolamina.
Sobreexpressió dels gens *pmt* & *h6h*.

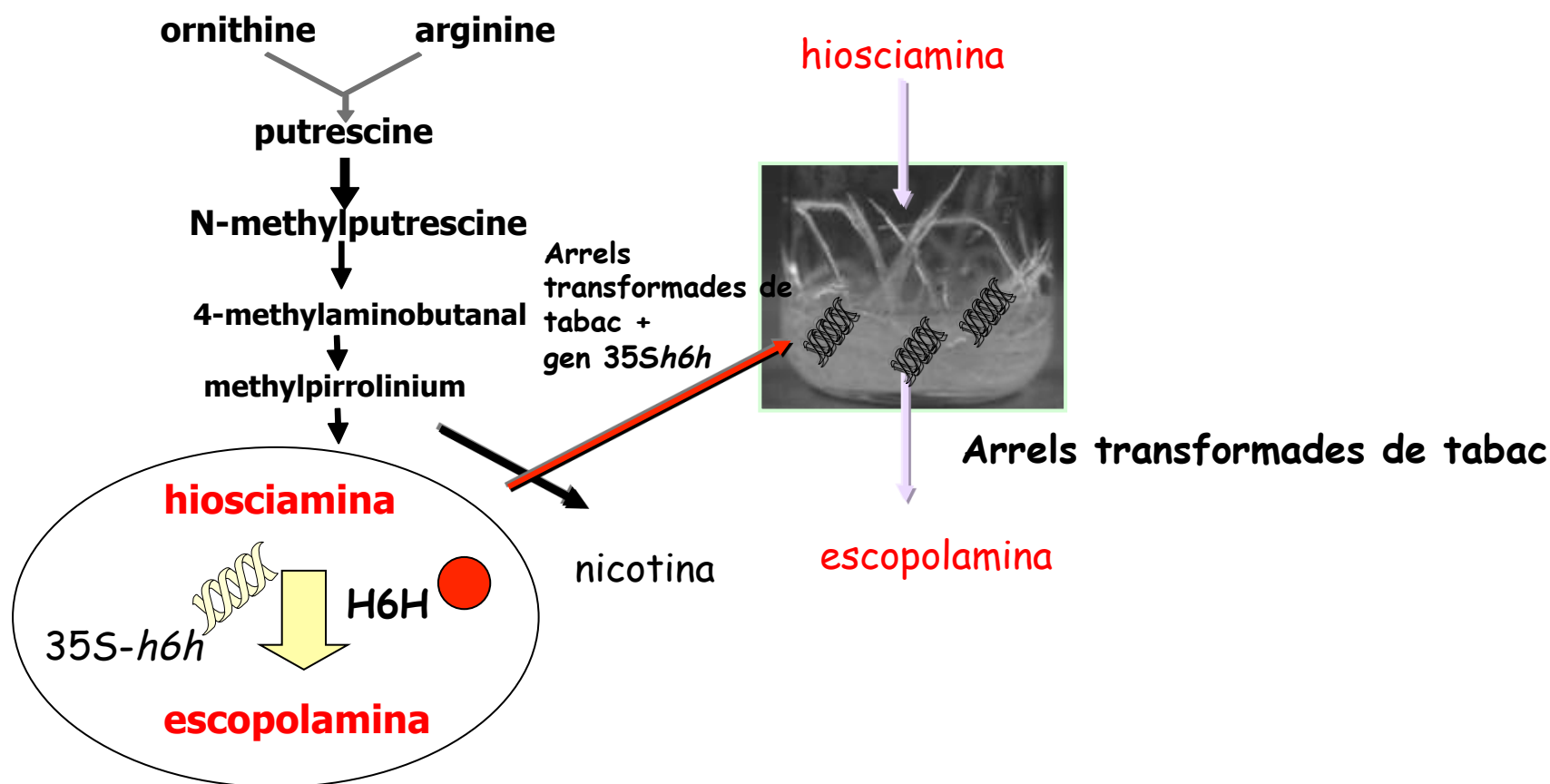


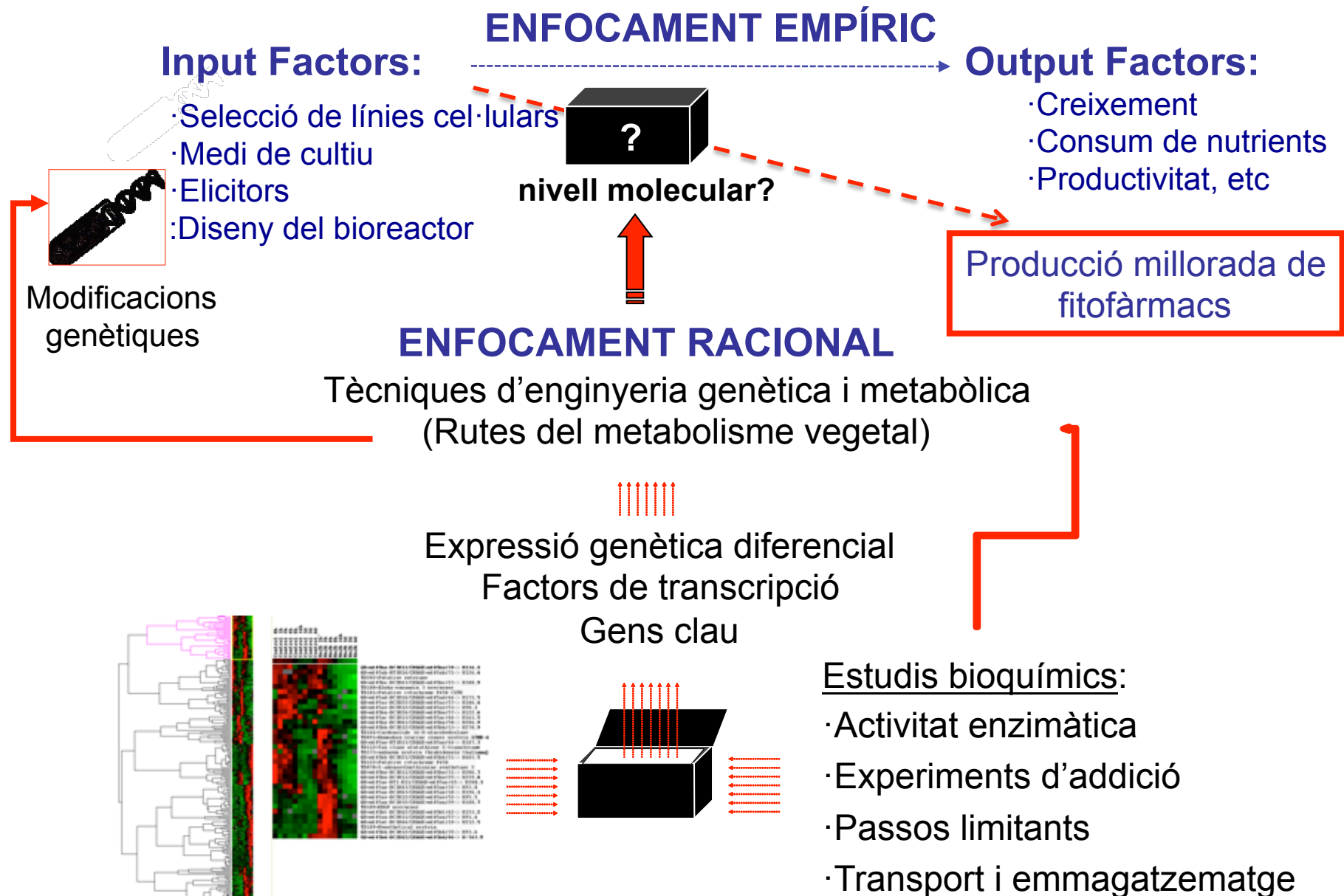
35S-*pmt*
35S-*h6h*



Arrels transformades de
Hyoscyamus muticus

3er pas: Biotransformació de hiosciamina en escopolamina en cultius d'arrels transformades de tabac.





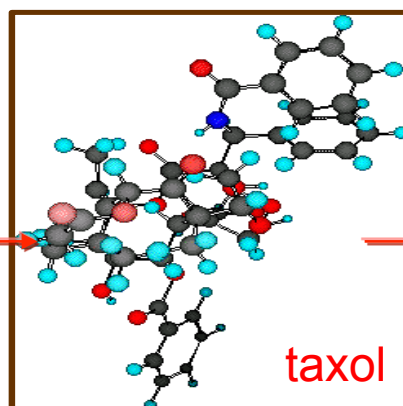
Producció biotecnològica de terpens: aplicacions a la indústria
farmacèutica i cosmètica

Aplicacions dels cultius cel·lulars

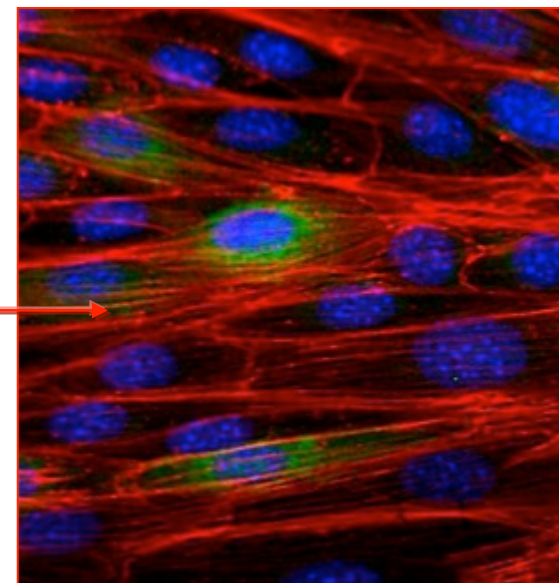
Producció de taxol i taxans en
cèl·lules en suspensió de *Taxus*



teix



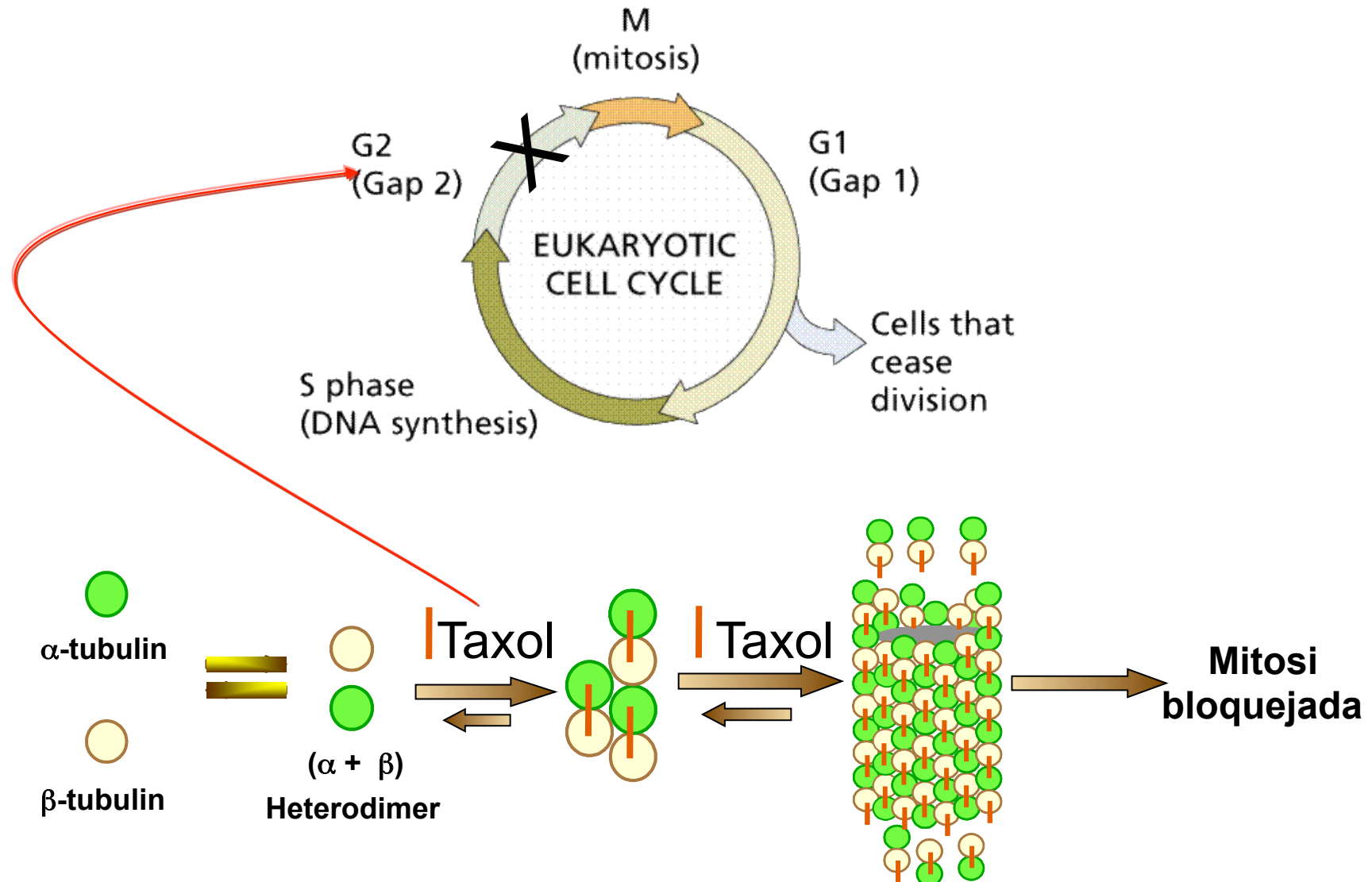
Estructura 3D del taxol



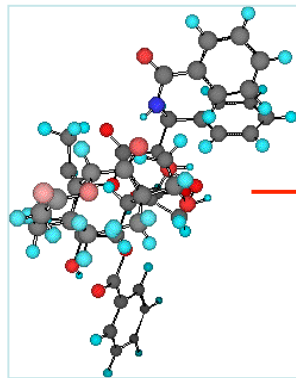
Cèl·lules
cancerígenes
(càncer de pit de
ratolí)



Taxol: mecanisme d'acció



Font natural de Taxol



taxol



Escorça interna
(0.01%)

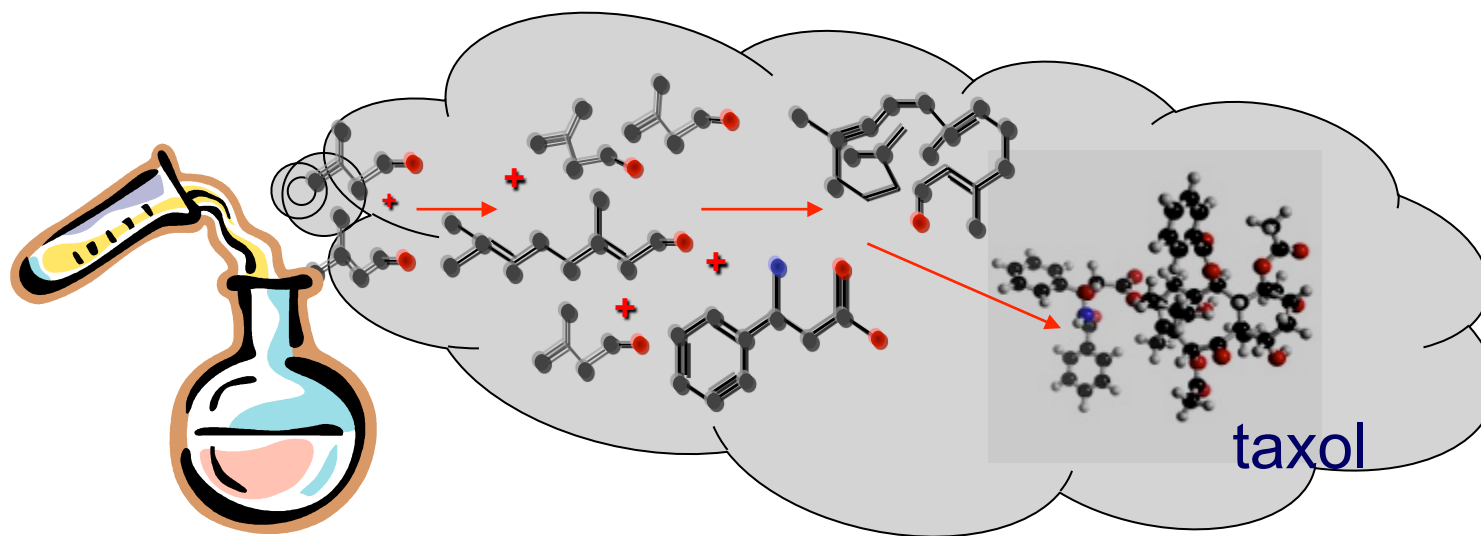


Bosc de teixos
(World Heritage)

4-6 arbres de *Taxus* sp de 60 anys
↓
1 pacient de càncer

Fonts alternatives de taxol:

◇ Síntesi química:
(Comercialment inviable)



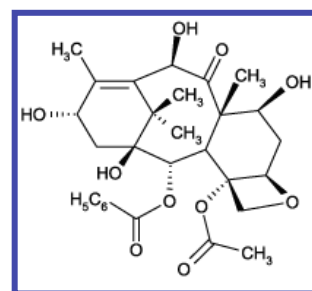
Fonts alternatives de taxol:

Semi-síntesi



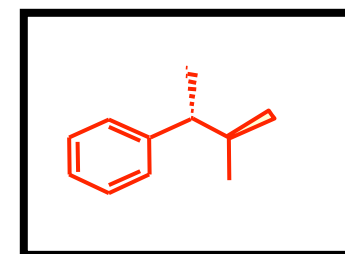
Fulles de *Taxus*

Extracció
i
purificació

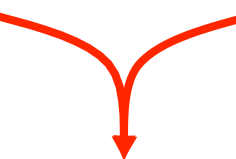


Baccatina III

+



Fenilisoserina



Taxol

Fonts alternatives de taxol: Cultiu de la planta



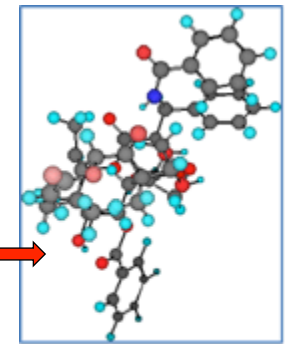
Fonts alternatives de taxol: Cultiu de la planta



Plantacions de *Taxus yunnanensis*



Extracció amb
dissolvents orgànics



taxol

Fonts alternatives de taxol:

Producció biotecnològica



Taxus



Cultiu cel·lular



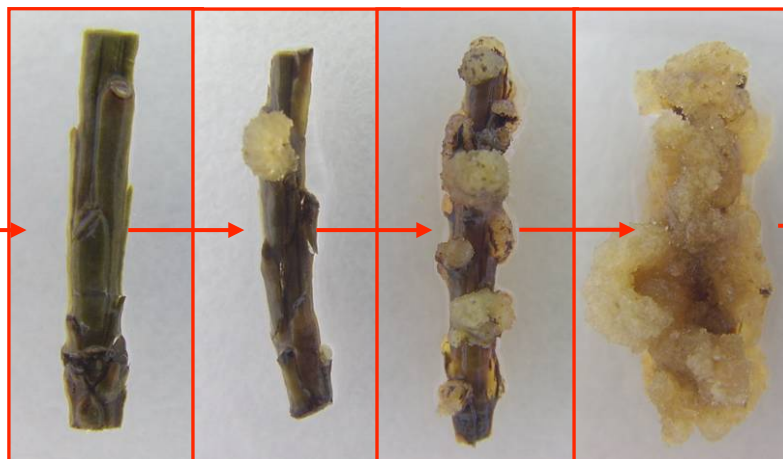
Phyton/Bristol Myers, Mitsui, etc.



Taxol

Cultius cel·lulars:

*1er pas: inducció de call:



0

2

3

4

setmanes



cultiu de call

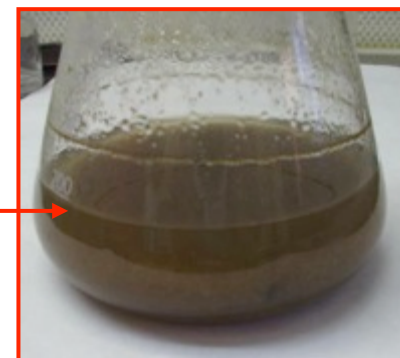
*2on pas: suspensions cel·lulars:



línia de call



disgregació



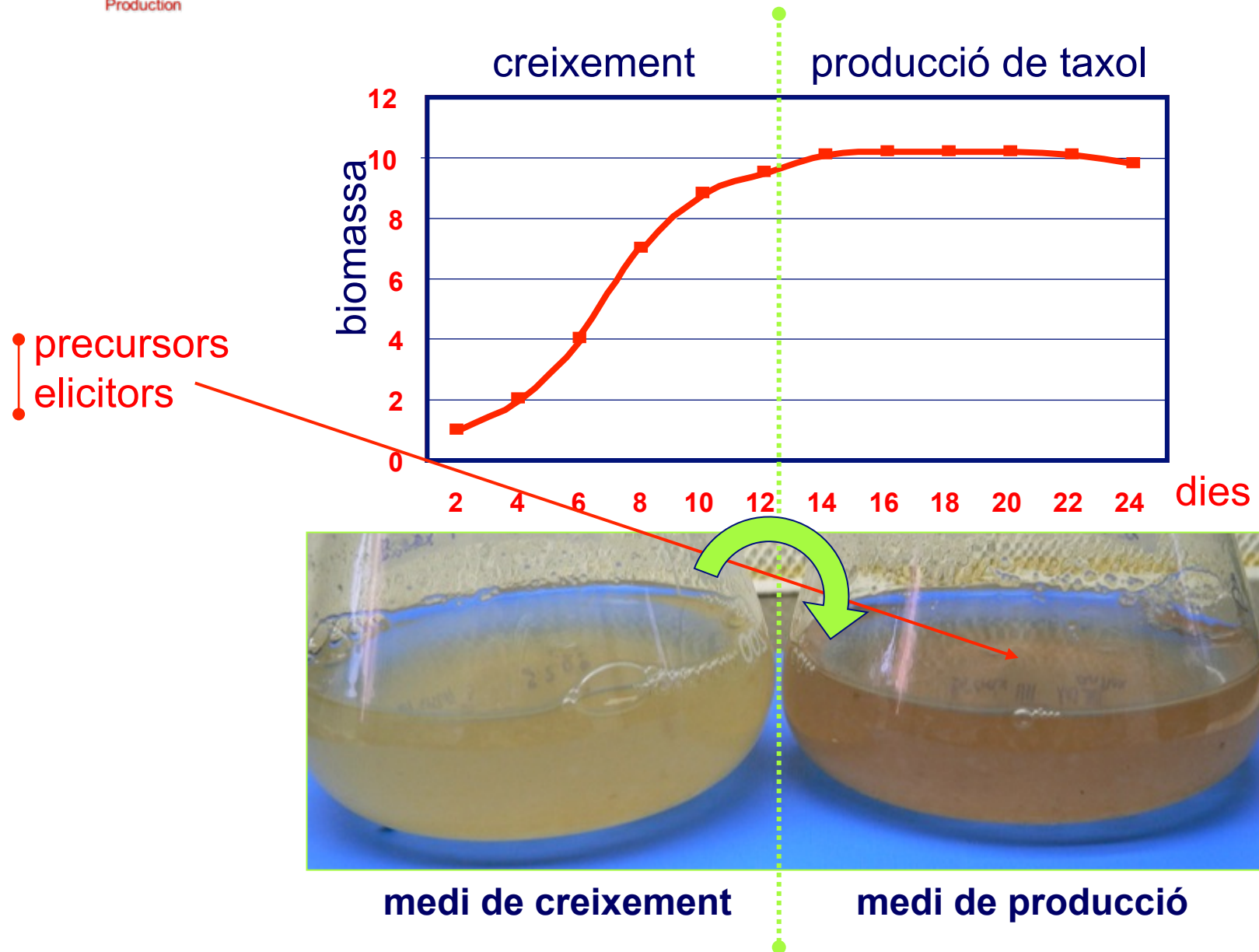
línia cel·lular

Alta producció de taxol: Optimització de les condicions de cultiu

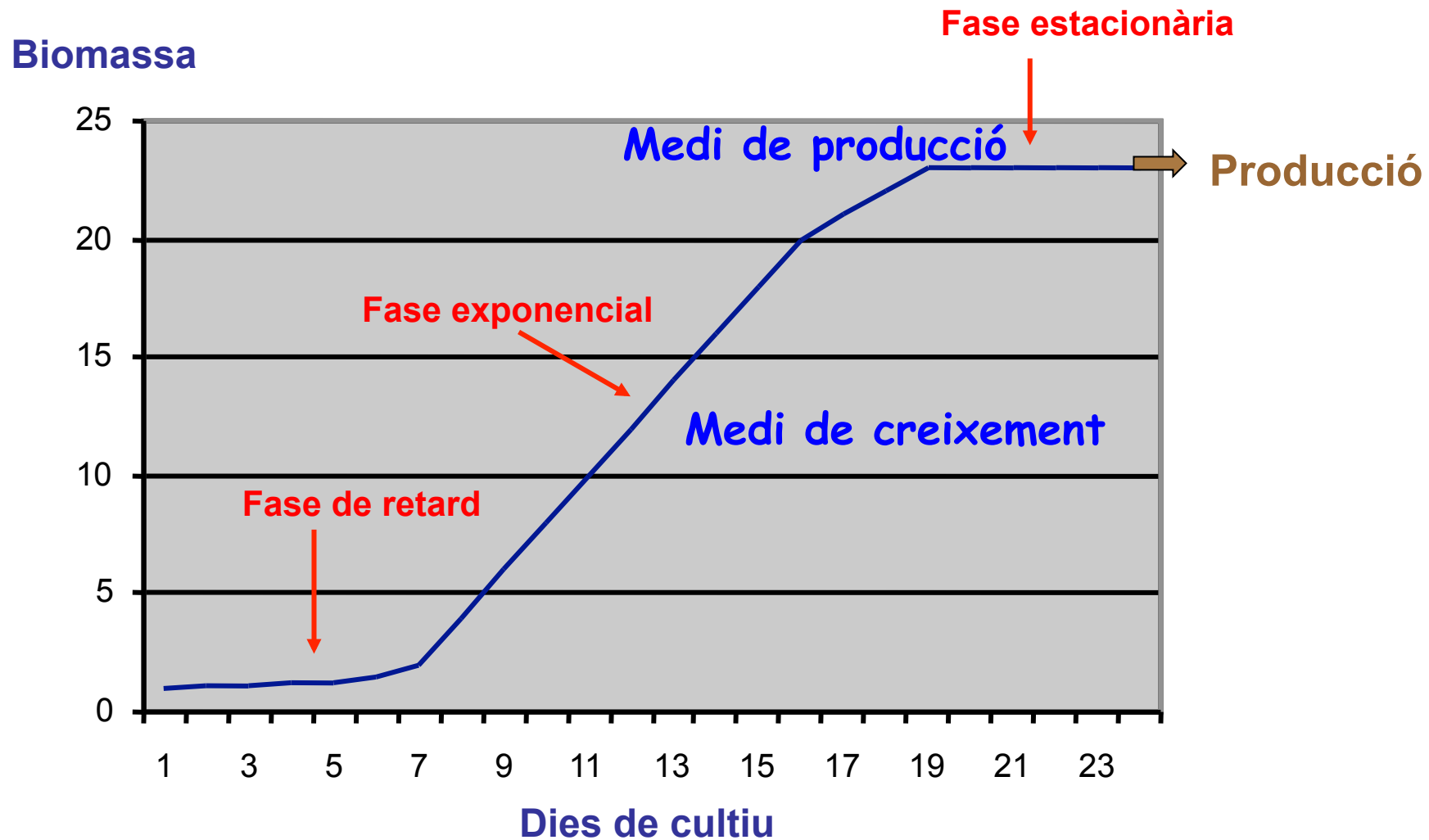


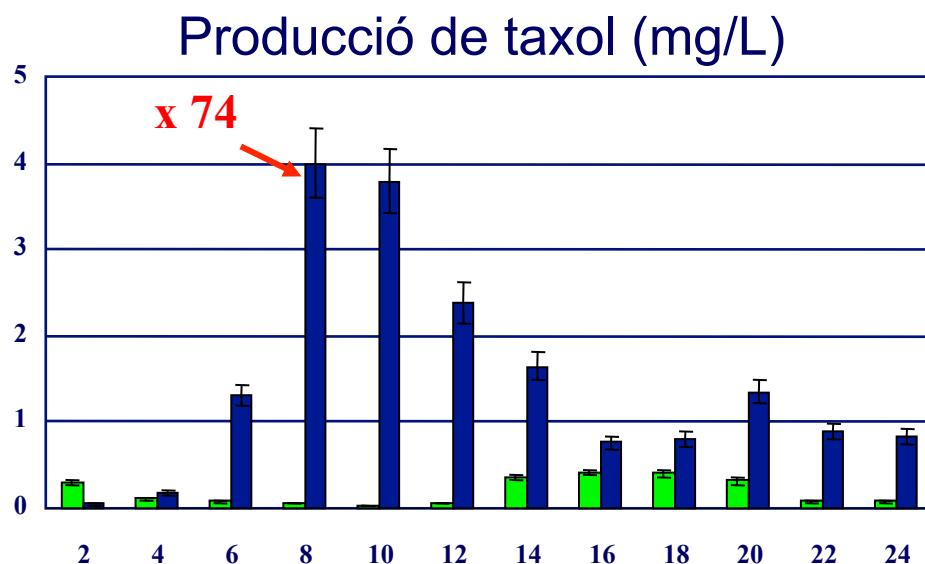
- Medis de cultiu | MS
B₅
- PGRs | Auxines (AIA, NAA, 2,4-D,)
Cinines (kinetin, BAP,)
- Sucres | Sacarosa
Fructosa

Cultiu en dues etapes:



Millora de la producció: Corbes de creixement



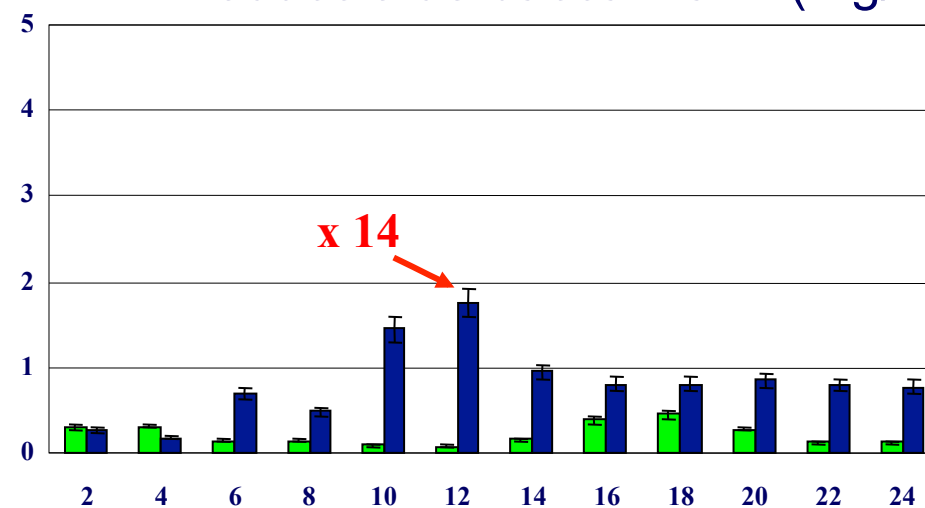


Producció de taxans en
cèl·lules en suspensió
de *Taxus baccata*
crescudes en un cultiu
de dues etapes:

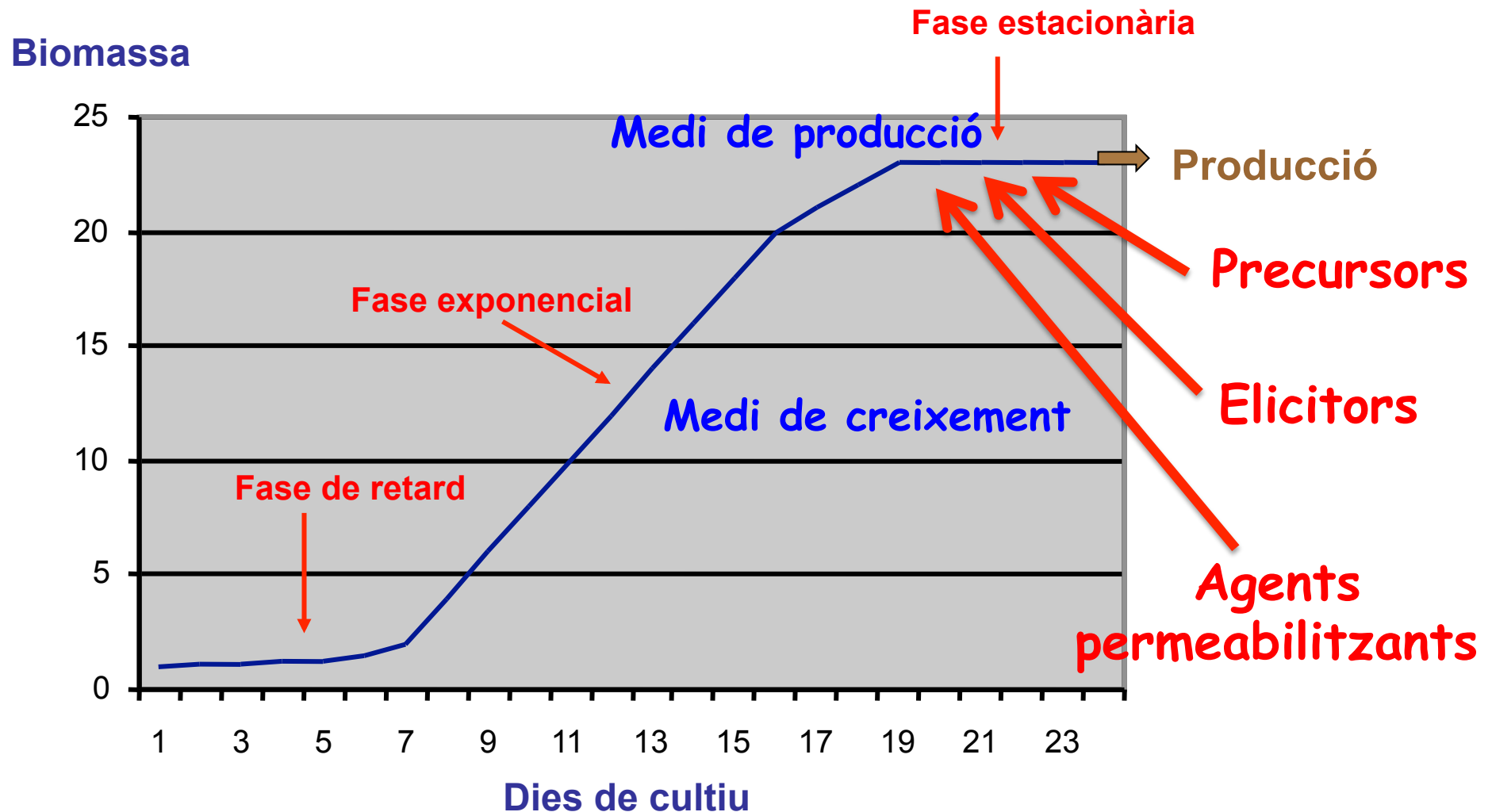
 Medi de creixement

 Medi de producció

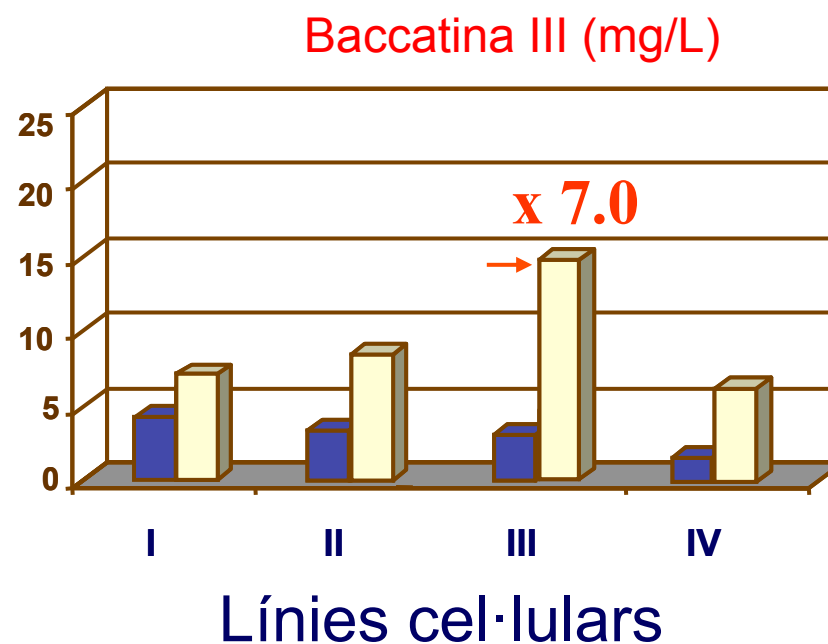
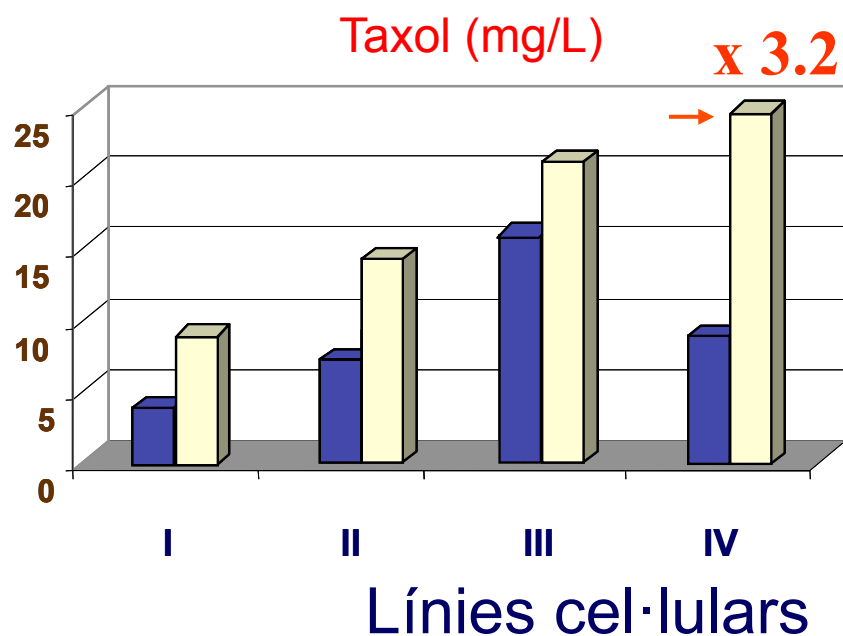
Producció de baccatina III (mg/L)



Millora de la producció: Corbes de creixement



Producció de taxol i baccatina III en cultius cel·lulars de *T. baccata*. Efecte de l'addició de jasmonat de metil (MJ)



medi de
producció

Control MJ

Producció de taxol i baccatina III en cultius cel·lulars de *T. baccata* en un bioreactor airlift

Optimització de les condicions de cultiu :

Capacitat: 20

Volum de treball : 18

Densitat de l'inòcul: 10%

Aireació i agitació: Difusor circular

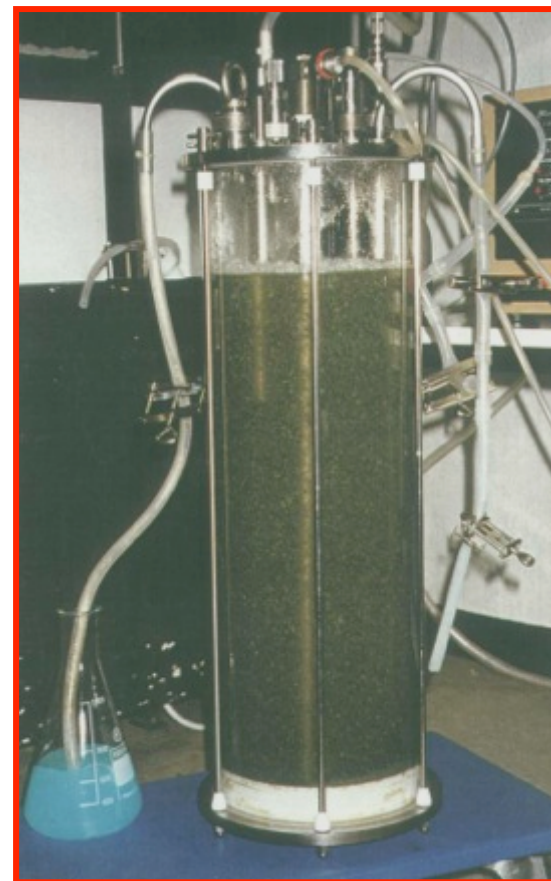
Temperatura i pH : 25°C i 5.5 - 6



Producció a gran escala de
metabòlits secundaris d'alt valor

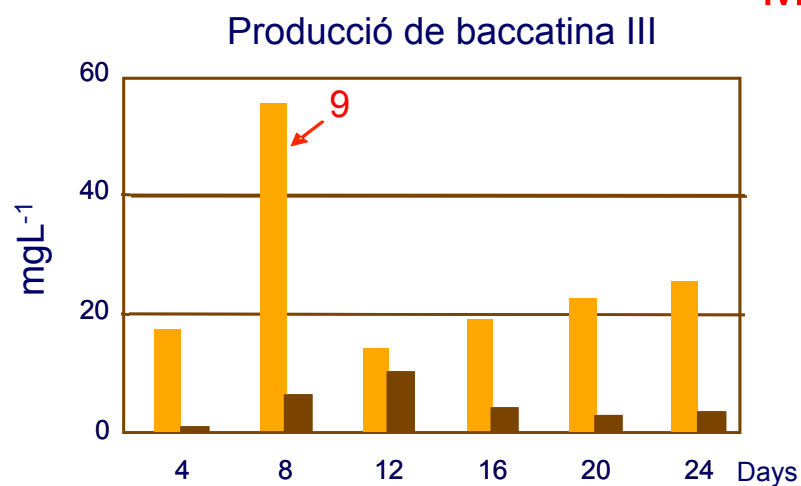
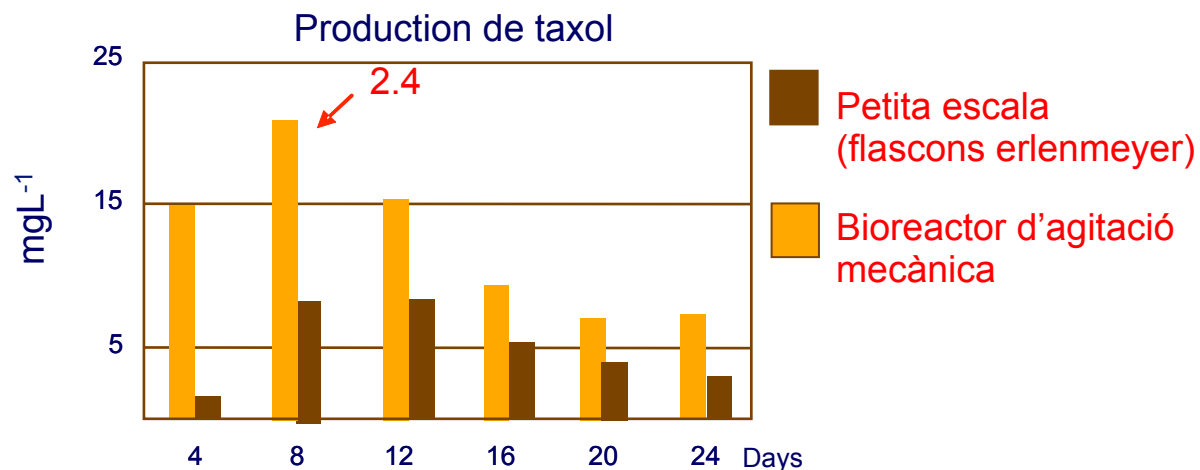


Escalat del cultiu



Col·laboració amb el Prof. Alfermann
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Producció de taxol i baccatina III en cultius cel·lulars de *T. media* en un bioreactor d'agitació mecànica



Medi de producció
Addició de MJ

Bioreactor
d'agitació
mecànica



Immobilització de cultius cel·lulars en perles d'alginat. Petita escala:

perles d'alginat al 2%



medi de creixement



medi de producció



Flascons en agitació

Immobilització   Producció de metabòlits vegetals valuosos

- Alta concentració cel·lular
- Millor contacte cèl·lula - cèl·lula
- Millors condicions per la diferenciació cel·lular

Producció de taxol en cèl·lules immobilitzades de *Taxus baccata* en un bioreactor d'agitació mecànica

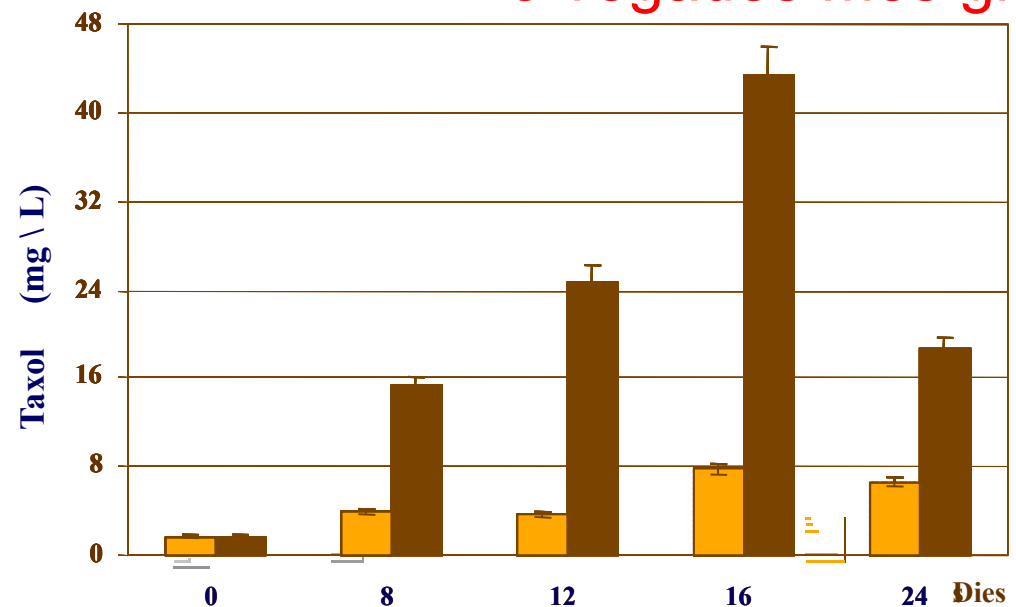


perles d'alginat al 2%

5 vegades més gran

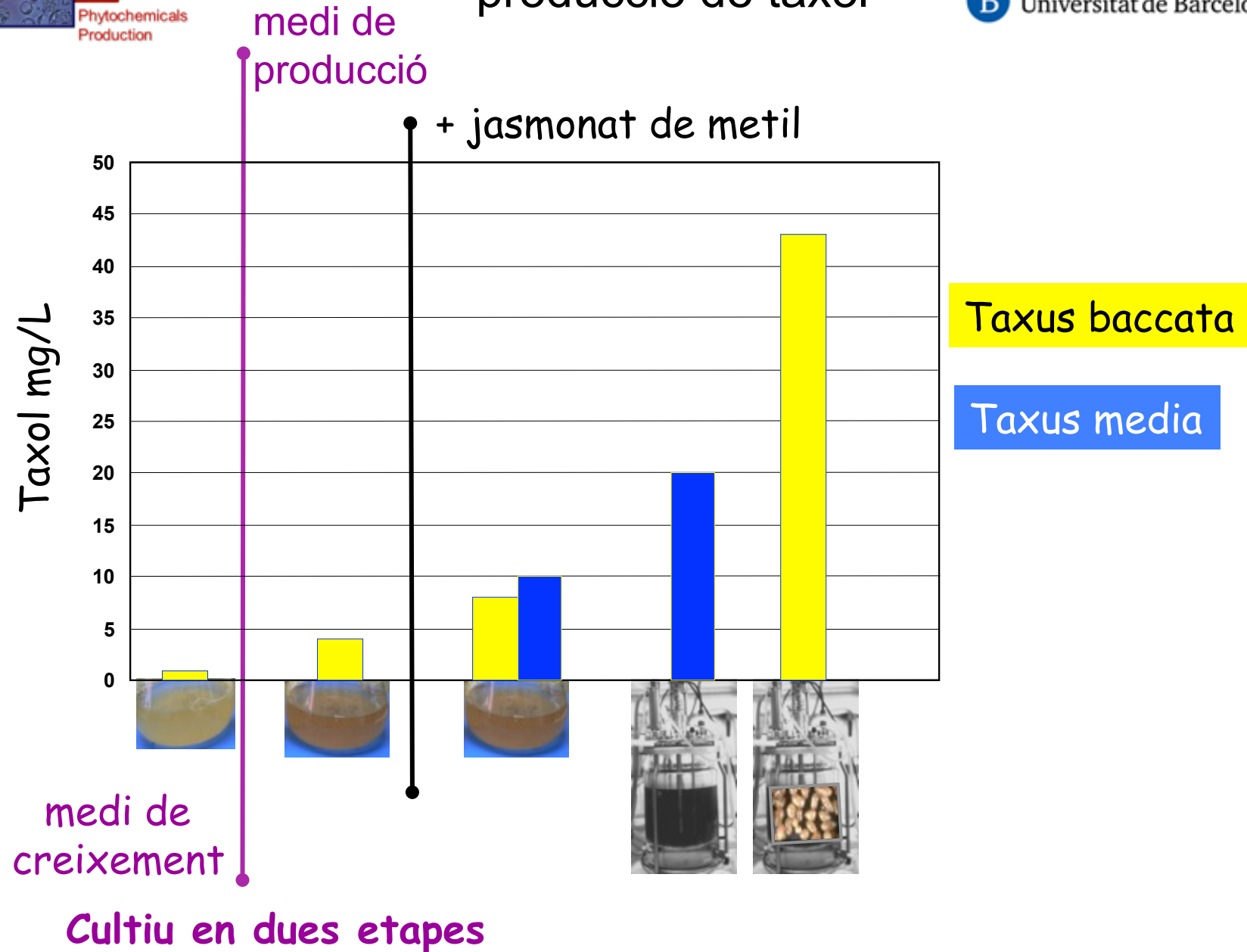


Bioreactor d'agitació mecànica

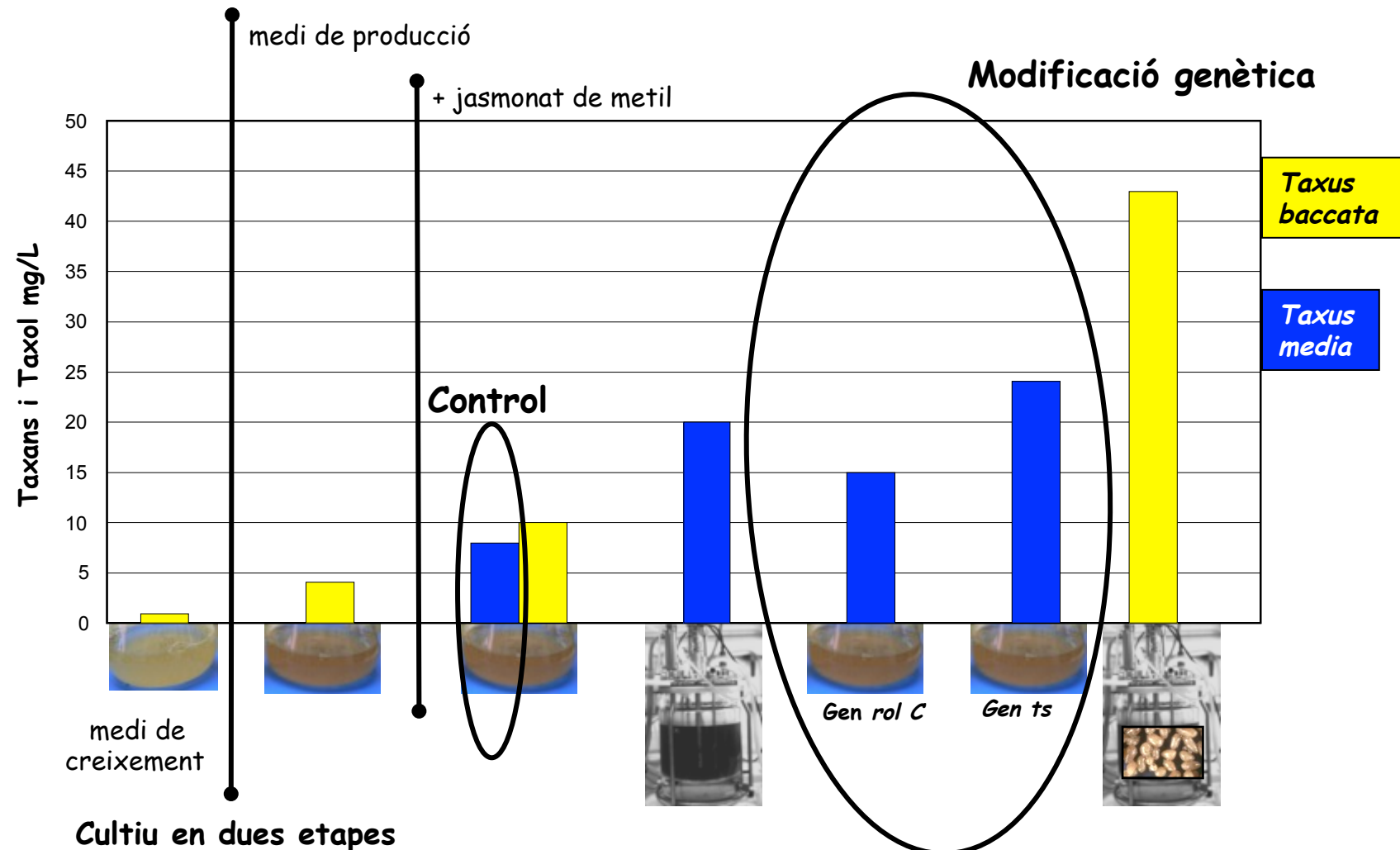


-  Cèl·lules en suspensió
-  Cèl·lules immobilitzades

Enfocaments empírics per la producció de taxol



Enfocament empíric i racional per la producció de Taxol

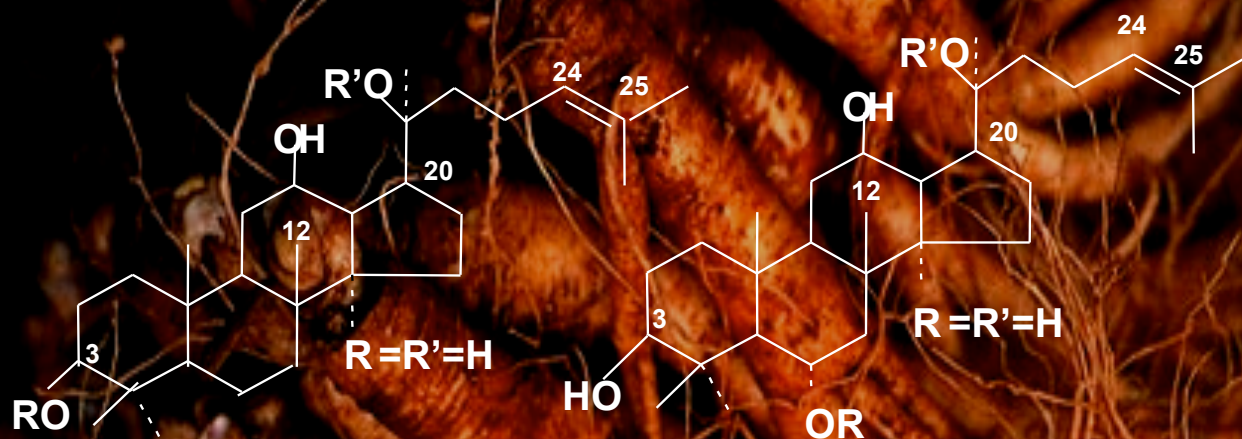


Producció biotecnològica de terpens: aplicacions a la indústria
farmacèutica i cosmètica

Aplicacions dels cultius d'arrels

Producció de ginsenosids en cultius
d'arrels transformades de *Panax*
ginseng

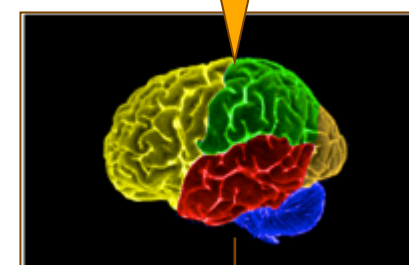
Estructures dels ginsenosids



20(S)-protopanaxadiol

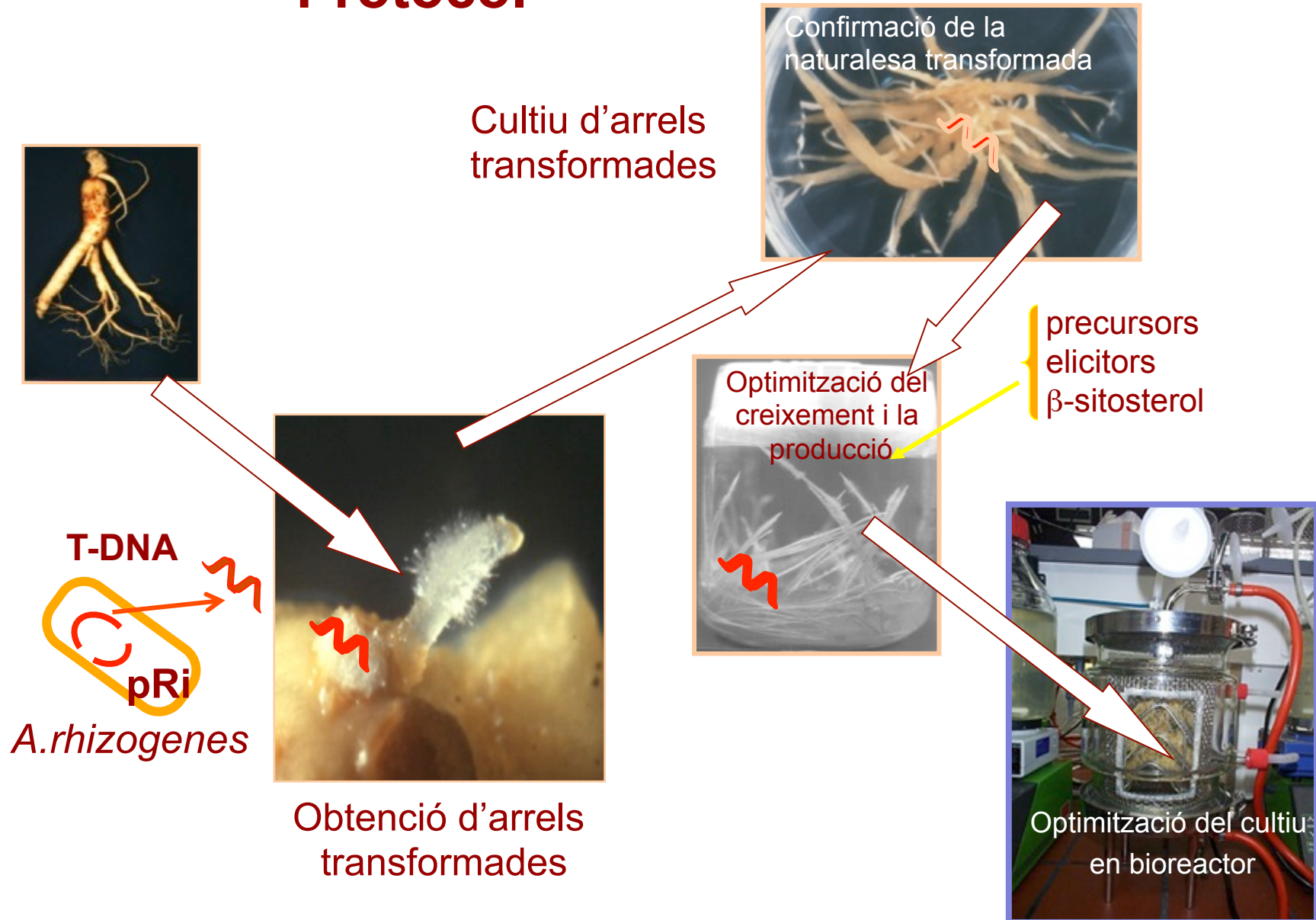
20(S)-protopanaxatriol

Rb1: glc(2-1)glc. glc(6-1)Rc H. glc. glc(2-1)rha
 Rb2: glc(2-1)glc. glc(6-1)Rc H. glc(2-1)glc
 Rc: glc(2-1)glc. glc(6-1)Rc H. glc. glc
 Rd: glc(2-1)glc. glc



Tònics
 Analgèsics
 Antipirètics
 Anti-estrès

Protocol



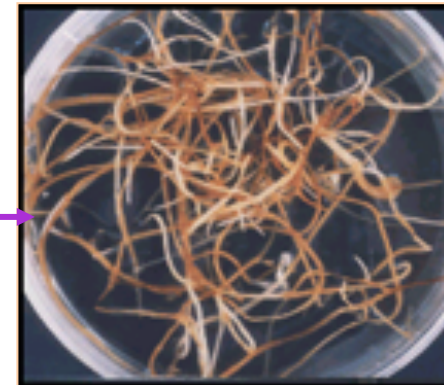
Obtenció d'arrels transformades

Medi sòlid

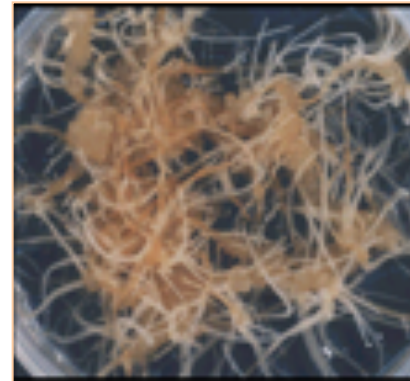
Morfologia callosa (C-M)



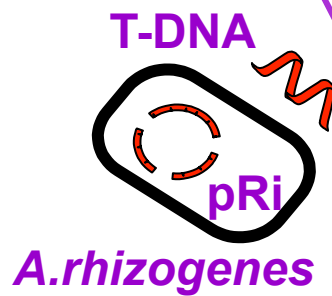
Morfologia fina (T-M)



Morfologia típica hairy root
(HR-M)



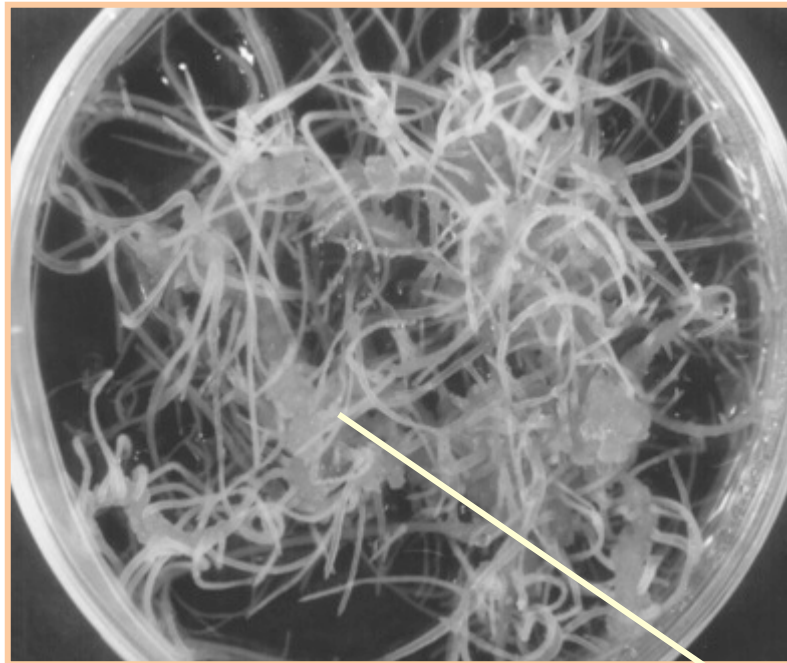
Obtenció d'arrels transformades



50%

35%

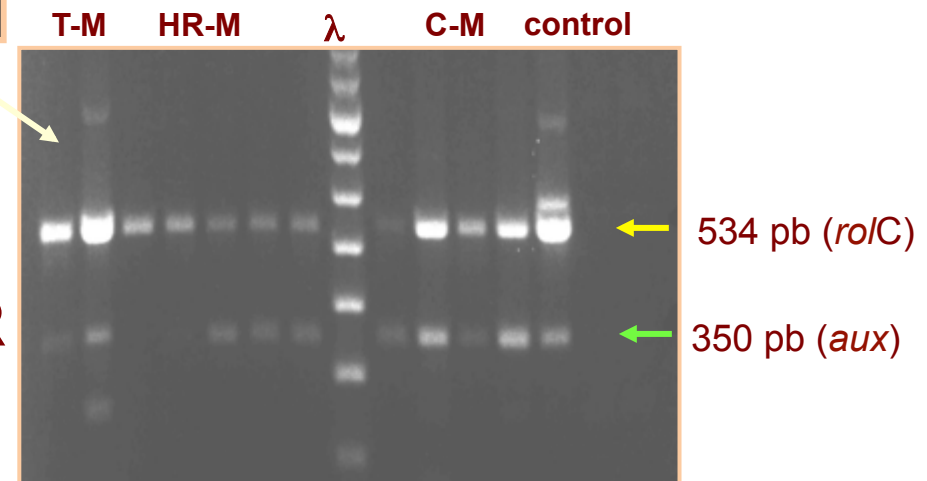
15%



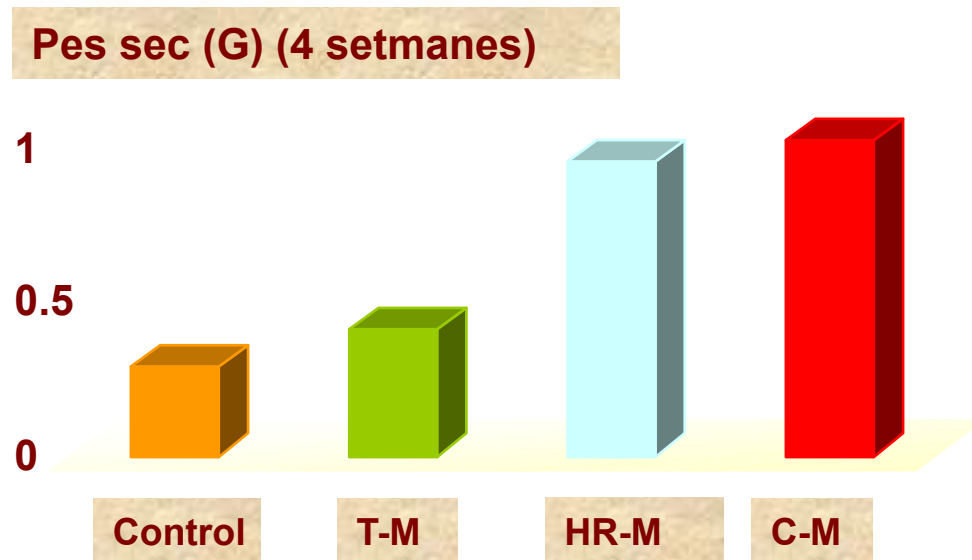
Medi sòlid

Confirmació de la naturalesa transformada de cada tipus d'arrel

PCR



Estudi del creixement en medi sòlid (setmana 4)

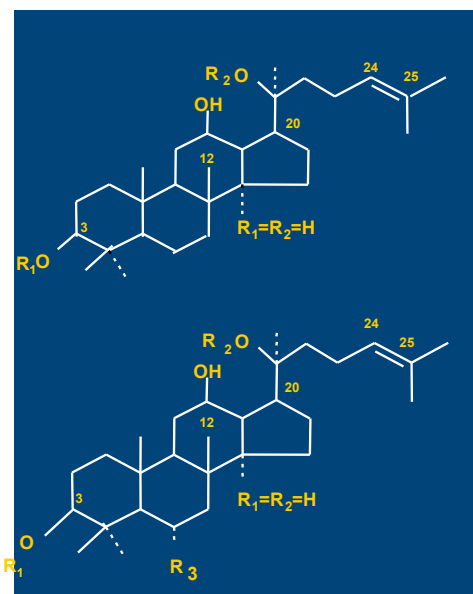


Aspecte de les arrels de morfologia callosa al final del període de cultiu



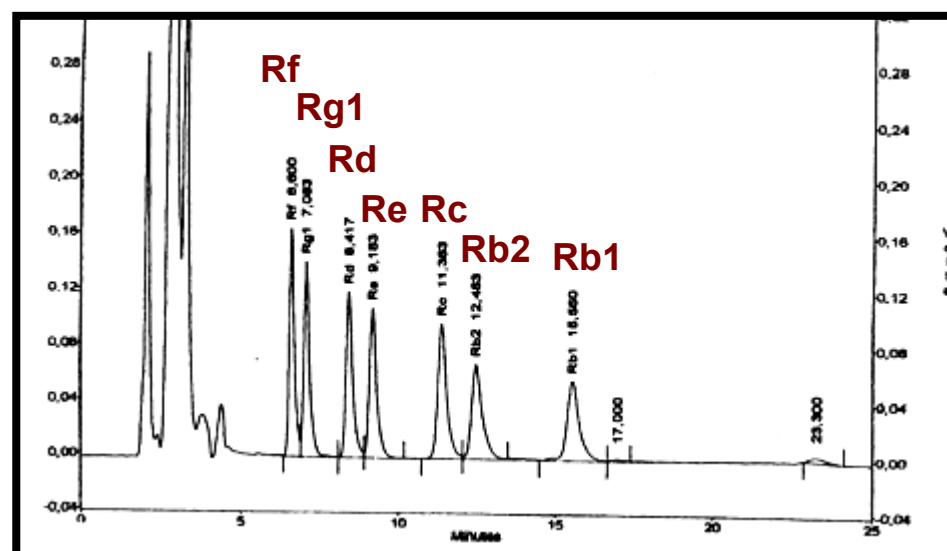
Contingut en ginsenòsids en medi sòlid

mg/g PS	T _{Rb}	T _{Rg}	Total ginsenòsids	T _{Rb} / T _{Rg}
Control	0.95 ±0.37	2.60 ±0.45	3.55	0.36
T-M	0.93 ±0.35	2.80 ±0.08	3.73	0.33
HR-M	0.86 ±0.54	1.42 ±0.35	2.30	0.60
C-M	0.67 ±0.92	1.32 ±0.79	2.00	0.93
Rizoma	2.78 ±0.15	2.09 ± 0.11	4.87	1.33



grup Rb

grup Rg



Transferència de les arrels del medi sòlid al líquid



MEDI SÒLID

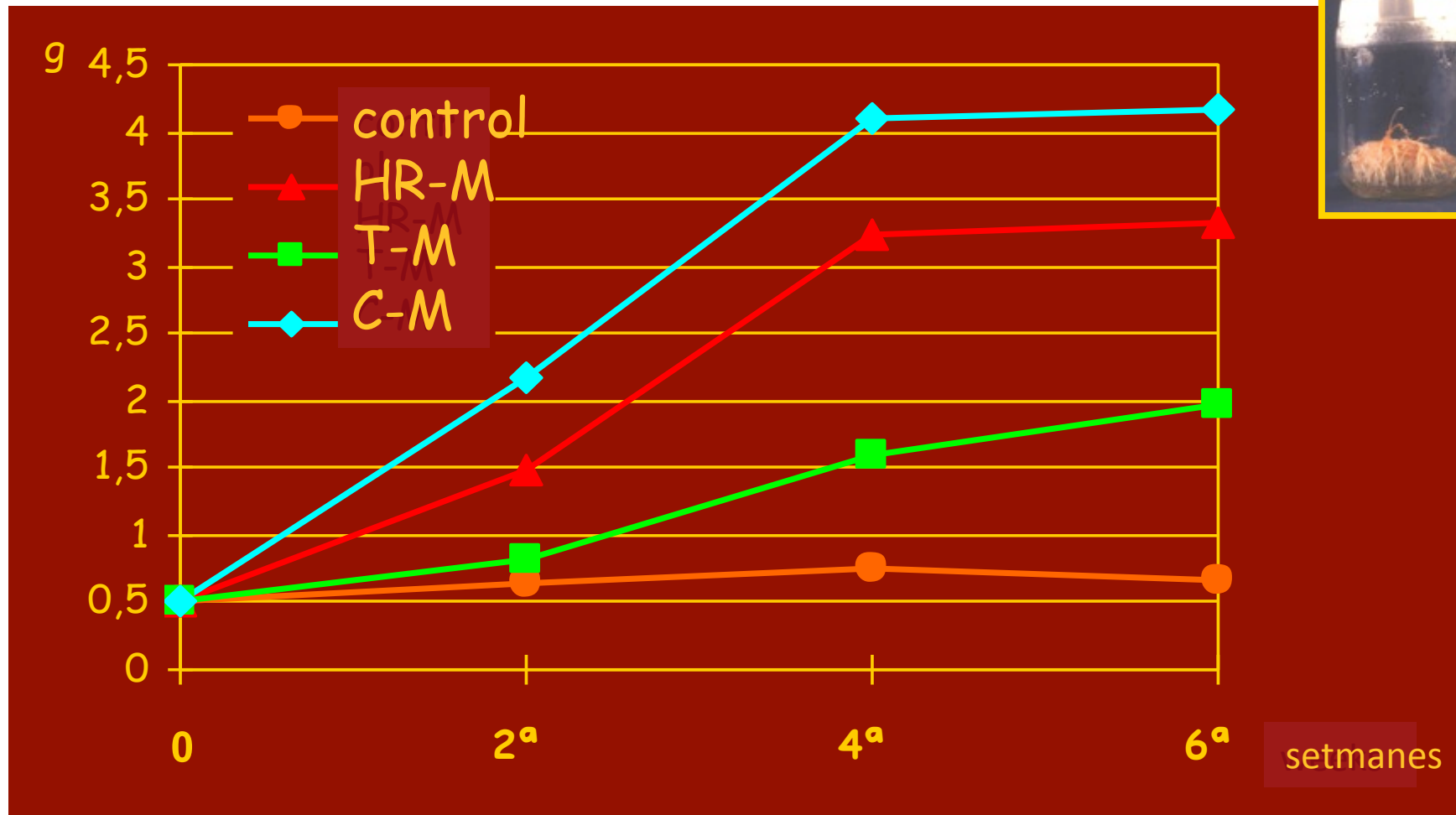
MEDI LÍQUID



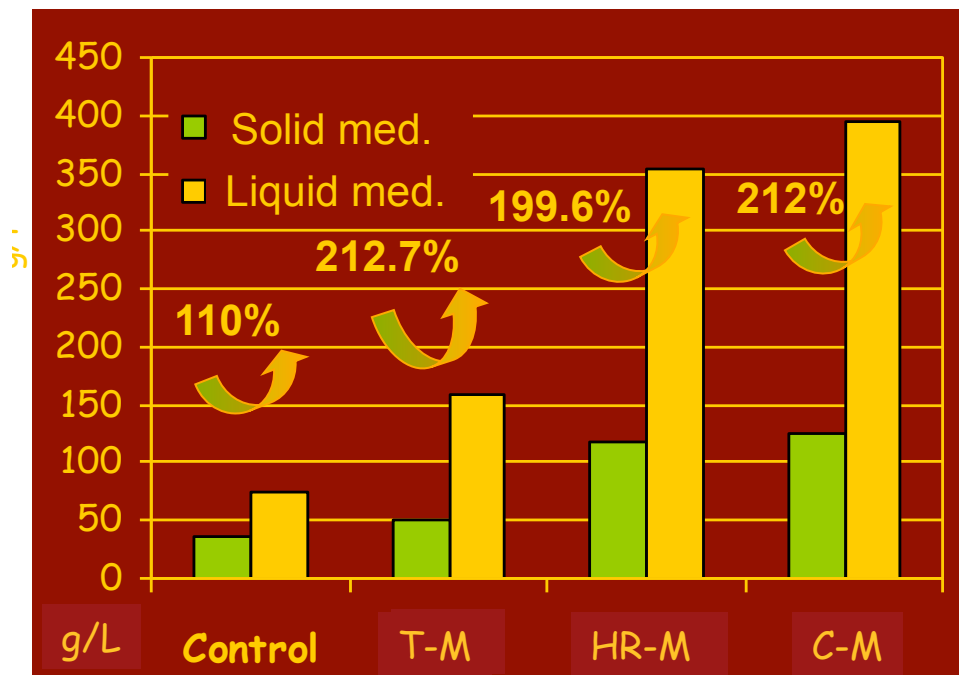
5 línies d'arrels

- control
- T-M
- HR-M
- C-M

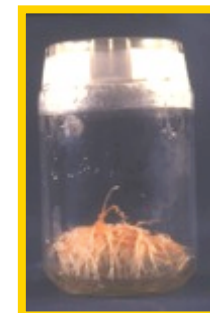
Estudi del creixement en medi líquid (6 setmanes)



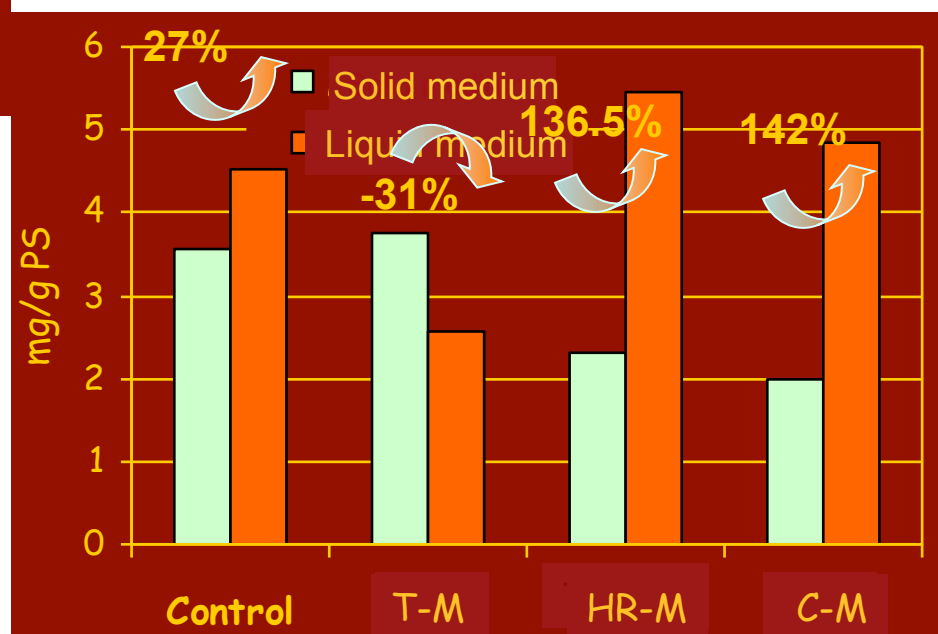
Comparació medis sòlid / líquid



**Producció de
biomassa**
(g/L)



**Producció de
ginsenòsids**
(mg/g PS)



Optimització

• elicitors

Quitosan

Jasmonat de metil
 $VOSO_4$

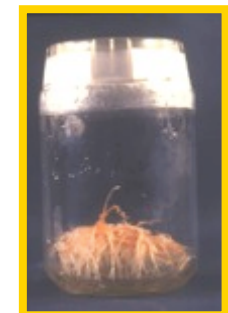
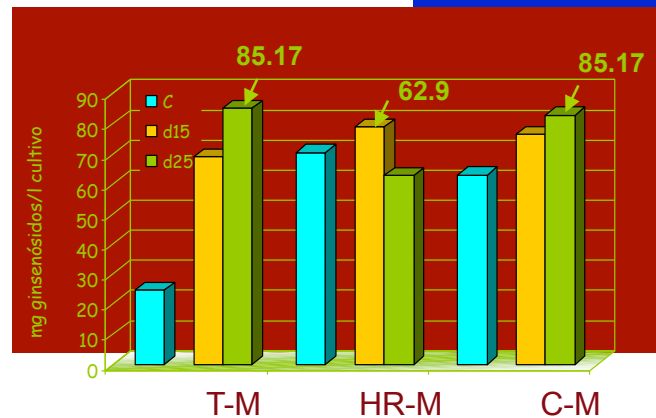
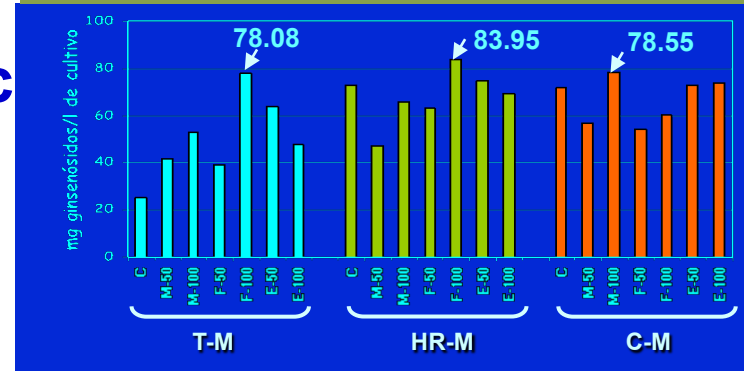
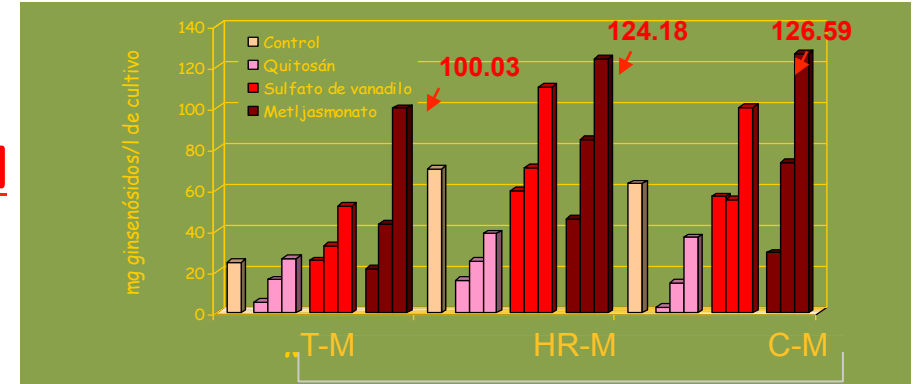
• precursors

Àcid mevalònic

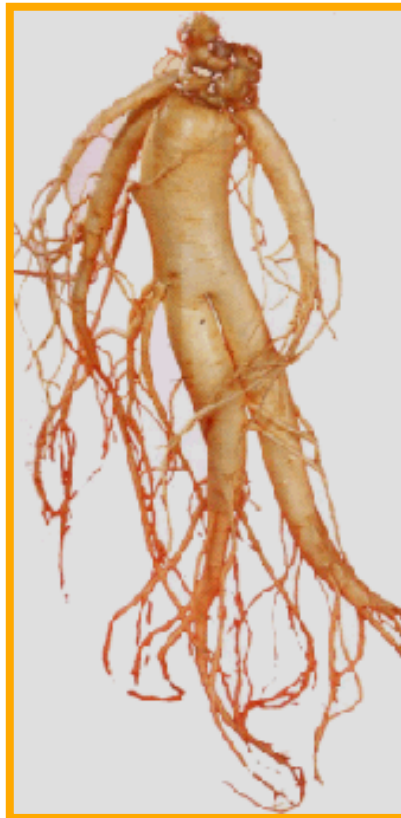
Farnesol

Esqualè

• β -sitosterol

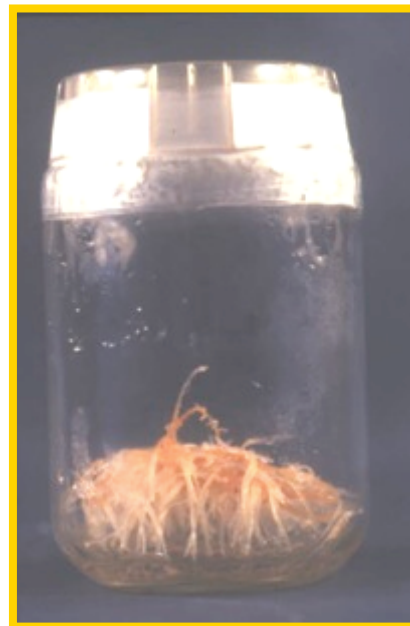


Comparació rizoma / arrels transformades

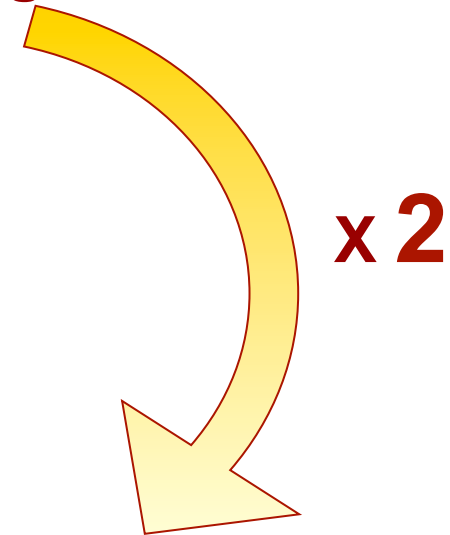


Rizoma de *P. Ginseng*
(4 anys)

4.87 mg ginsenòsids/g PS

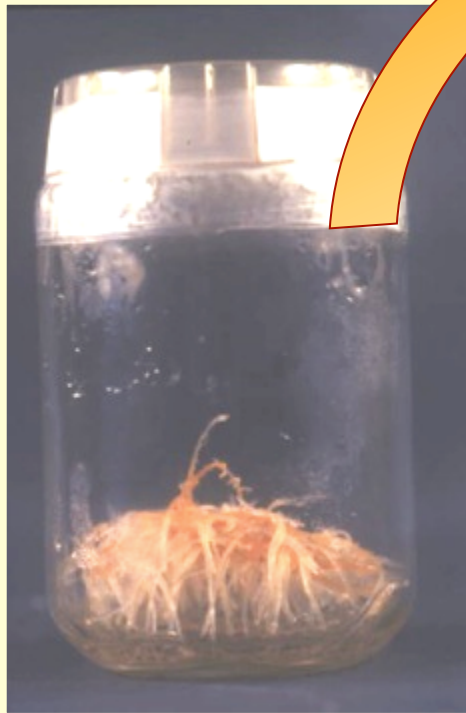


HR-M + 200 μ M jasmonat de metil



8.07 mg ginsenòsids/
g PS

Escalat a bioreactor



Cultiu en bioreactor

- Selecció de la línia d'arrel pel cultiu: T136 (HR-M)
- Cultiu en medi líquid optimitzat
- Selecció del disseny de bioreactor

Selecció del disseny de bioreactor



**Bioreactor airlift
modificat**

(Roig et al., 1998)

Bioreactor spray

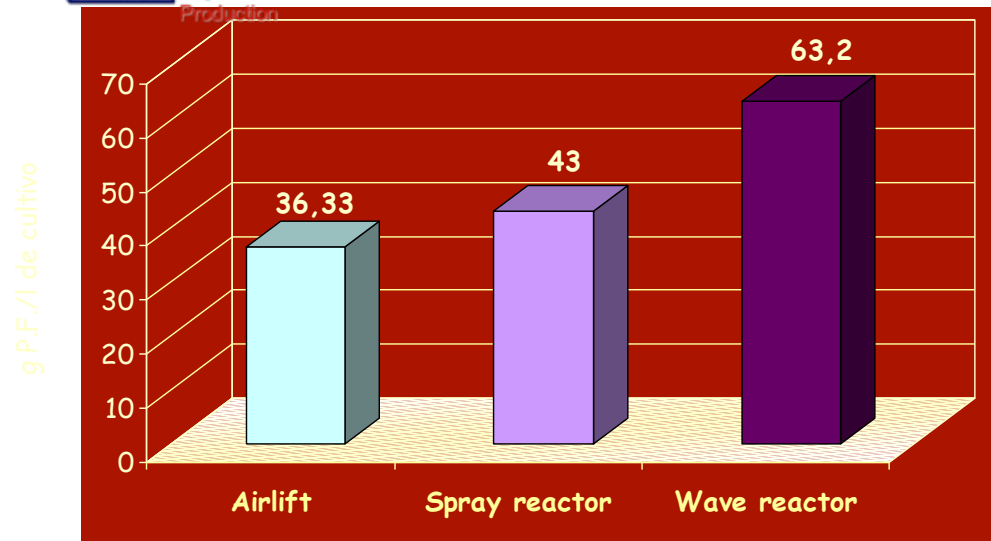
(Hokama, 1990/ Whitney, 1990)



Bioreactor wave

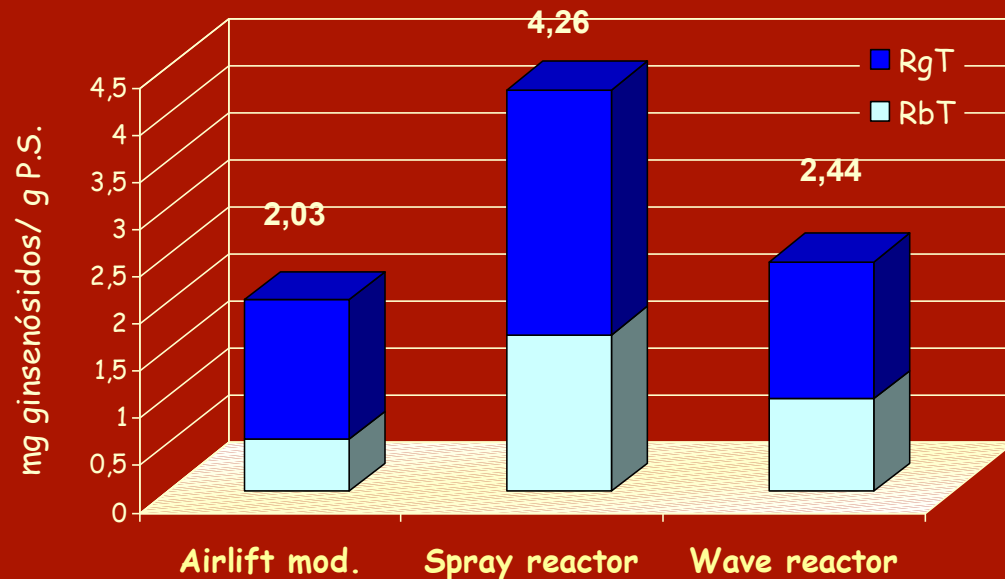
(Singh, 1999)

Bioreactors



**Producció de
biomassa
(g PF)**

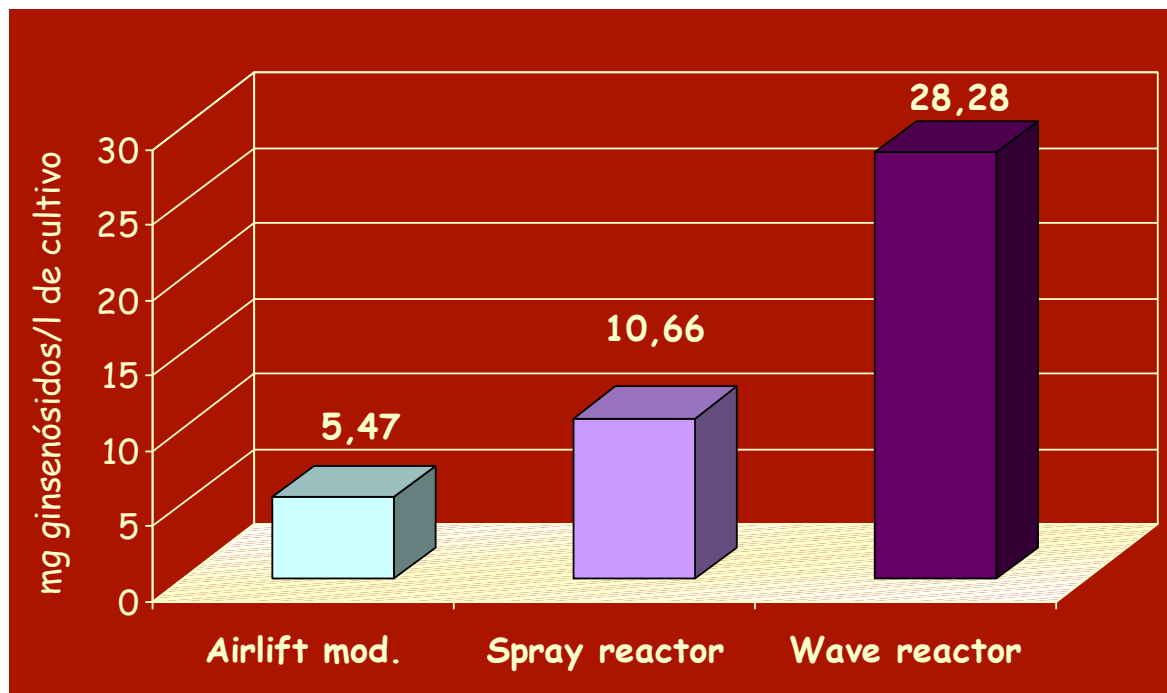
**Producció de
ginsenòsids
(mg/g PS)**



28 dies de cultiu sense canvi de medi

Bioreactors

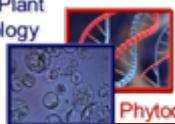
Productivitat del cultiu (mg/l/dia)



28 dies de cultiu sense canvi de medi



bioreactor wave

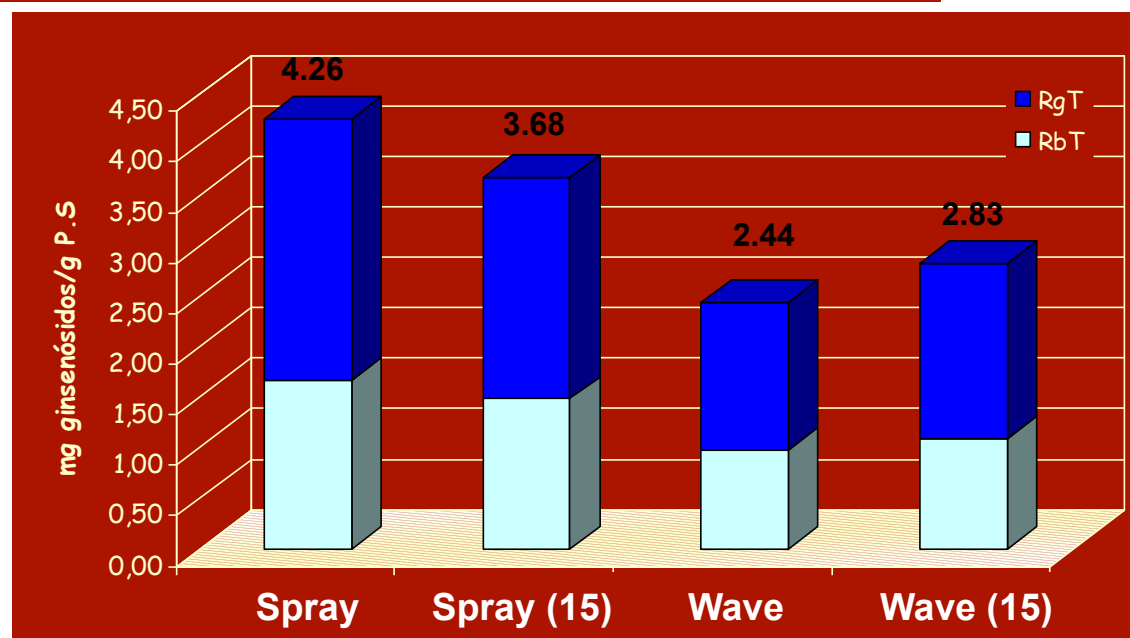


Bioreactors

Process	Spray	Spray (15)	Wave	Wave (15)
Inoculum FW (g)	10 ± 0,1	10 ± 0,1	5 ± 0,05	5 ± 0,05
Final FW (g)	43 ± 3,8	46,7 ± 4,2	31,6 ± 3,2	34,4 ± 2,8
Biomass prod. (g/l)	43	58,3	63,2	68,9

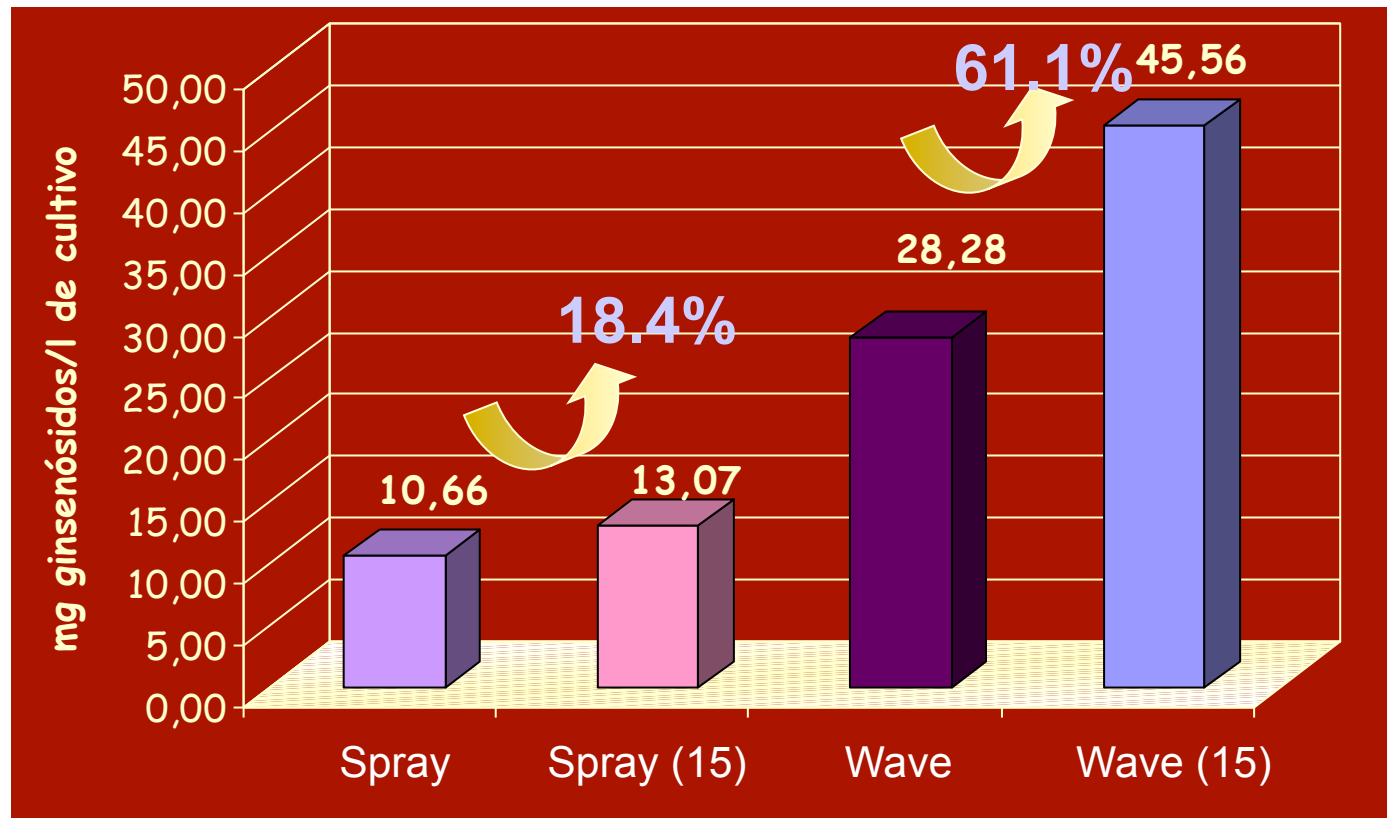
**Producció de biomassa
(g PF)**

**Producció de
ginsenòsids
(mg/g PS)**



28 dies de cultiu amb canvi de medi al dia 15

Productivitat del cultiu (mg/l/dia)



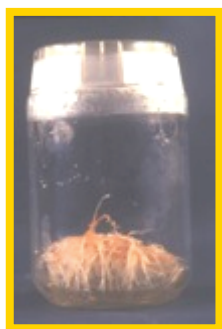
28 dies de cultiu amb canvi de medi al dia 15

Resultats finals



bioreactor spray

PF final: 121.18 g
Producció de biomassa: 121.20 g/l
Producció: 37.0 mg gin./l de cultiu
Productivitat: 0.7 mg/l/dia



Productivitat: 1.9 mg/l/dia

PF final: 142.45 g

Producció de biomassa: 284.91 g/l
Producció: 142.1 mg gin./l de cultiu
Productivitat: 2.6 mg/l/dia



bioreactor wave

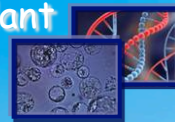
56 dies de cultiu amb canvi de medi cada 15 dies



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Barcelona-plant



biotech-group

Gràcies!!!

