

Capítulo 9

Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas in vitro

M. L. Robert*
J. Reyes**
V. M. Loyola***

Agradecimientos

Los autores agradecen a la señora Genny Gil por la mecanografía del manuscrito del presente capítulo. Reconocen además que las investigaciones efectuadas por ellos, y mencionadas aquí, han sido posibles gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México PCCBCNA-020845.

* Departamento de Genética y Fisiología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

** Departamento de Química Orgánica, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

*** Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

Introducción

Los cultivos de células y tejidos vegetales in vitro constituyen actualmente una alternativa para producir sustancias de uso farmacéutico, agrícola o industrial, cuya producción comercial por los métodos convencionales —síntesis química o extracción de las plantas que los sintetizan— resulta difícil o económicamente poco viable.

Estos cultivos in vitro constituyen asimismo una promesa para aumentar el rendimiento de los principios activos presentes en las plantas, así como para controlar más adecuadamente su producción.

Los conocimientos que se adquieran acerca de los metabolitos secundarios y de su biosíntesis son necesarios, no sólo por el conocimiento en sí, sino para aprovechar mejor los componentes sintetizados por las plantas, especialmente las nativas. Conocer la regulación de una vía metabólica en particular dará mayores posibilidades de producir el compuesto deseado en mayor cantidad. En este caso, la bioquímica, el cultivo de células vegetales y la genética tendrán un papel muy importante.

La Fitoquímica y los Metabolitos Secundarios

La industria farmacéutica tuvo su origen en los pequeños laboratorios que se encontraban en la parte posterior de las boticas (las actuales farmacias) donde se preparaban las mezclas de 'yerbas' que serían usadas en algún té o infusión, o donde se extraían principios activos de las plantas cuando esto era posible. Surgieron así medicamentos tan importantes como el derivado de la *Cinchona ledgeriana*, conocido entre los indígenas de la Nueva España como la "yerba para las fiebres" y en Europa como los "polvos de la condesa". El principio activo, ahora usado y conocido como quinina, se sigue extrayendo de la misma *C. ledgeriana* y de *C. officinalis*.

Otra planta muy importante estudiada en la 'botica' fue la portadora del principio alcalino del opio, el cual es capaz de disminuir o quitar el dolor más fuerte. Se trata de un analgésico que hasta nuestros días no tiene igual, pero cuyos efectos secundarios son tan agudos que han limitado fuertemente su uso. Sin embargo, se sigue estudiando la morfina para obtener compuestos que puedan usarse como analgésico, sin producir adicción (opiáceos sintéticos).

Hasta principios del siglo XX, todos o casi todos los medicamentos usados provenían de las plantas. Vino después la época en que la síntesis

orgánica sustituyó a las plantas como fuente de los principios activos y se produjeron los llamados medicamentos de patente; aún no se lograba la síntesis de la quinina, la morfina y muchos otros compuestos, pero la fitoquímica pasó a ser una disciplina secundaria pues ya las plantas no constituían la única fuente de fármacos. Sólo muchos años después del aislamiento de la morfina y de la identificación de su estructura, Gates y Tschudi (1952; 1956) lograron su síntesis total, pero sin que ésta tuviera posibilidades comerciales. En 1944, Woodward logró la síntesis de la quinina, pero el método quedó también como una curiosidad de laboratorio.

Entre tanto, la fitoquímica siguió produciendo compuestos útiles; se aislaron los glucósidos de *Digitalis purpurea*, de los cuales se obtuvo el mejor cardiotónico que se conoce. En 1926, Cloetta logró el aislamiento de la digitoxina, y Windaus y Freese lograron su purificación en 1925; siguieron después la digitoxigenina (Cloetta, 1926; Stoll y Kreis, 1934) y la digitonina (Tschesche y Hagedorn, 1936; Marker et al., 1942).

La síntesis de los compuestos anteriores es un reto para los químicos, pues la lactona de cinco miembros conjugados, unida al carbono 17 con giro libre, y el grupo hidroxilo en posición beta del carbono 14 no facilitan esta síntesis. Por esta razón, todavía se sigue usando un extracto de *Digitalis*, a pesar de que otros medicamentos con estructuras químicas diferentes a los glucósidos mencionados son también útiles para mantener el ritmo cardíaco.

En 1940, Marker y colaboradores aislaron la diosgenina de *Dioscorea compositae*; se trata de una sapogenina esteroidal, la cual se convirtió en la base de la industria para la producción de las hormonas que se usan en el control de la natalidad o bien para sintetizar compuestos de la importancia de la cortisona; ésta se emplea en el tratamiento de la artritis. Pese al enorme desarrollo de la industria, no se ha logrado la síntesis comercial de estos compuestos; primero se debe extraer una genina, por ejemplo diosgenina, o alguna similar como la hecogenina (hasta hoy sin posibilidad comercial) para efectuar una degradación. Así se obtiene, del núcleo básico de estos compuestos, la 16-dihidro-pregnenolona, la cual se puede modificar químicamente para obtener los productos deseados, como corticoides y hormonas.

Otros compuestos de gran interés farmacológico y comercial son los alcaloides de *Catharantus roseus*, planta conocida en México como jua-nita, chula, vicaria, maravilla, etc., según la región. Se trata de la fuente natural de un gran número de compuestos, entre los cuales sobresalen la vincleucoblastina y la vincristina por su actividad antitumoral (Noble et

al., 1958); una vez más, la síntesis química ha fallado en sustituir una planta que produce rendimientos muy bajos.

Extracción de principios activos de plantas: algunas limitaciones

En los ejemplos anteriores se observa que existen muchas dificultades para sintetizar principios activos, no sólo de uso farmacéutico, sino también de otro tipo como las piretrinas (insecticidas), y esto ha hecho que se vuelva la atención hacia las plantas como fuentes de productos naturales. Sin embargo, las plantas también presentan problemas para la obtención de los compuestos.

La quinina, que se extrae de la corteza de *Cinchona officinalis* y de *C. ledgeriana*, es un ejemplo al respecto; hay que esperar aproximadamente 21 años para que la planta llegue a la edad adecuada y se pueda explotar, y se hace necesaria una reforestación bien organizada para no perder la producción.

También hay ejemplos de sobreexplotación de recursos silvestres no domésticos, que trae como consecuencia una reducción en el rendimiento o la extinción de la especie. Tal es el caso de *Dioscorea compositae*, especie que no se ha cultivado sino que se ha explotado como planta silvestre; como resultado, el contenido de diosgenina de las plantas ha disminuido actualmente de 8% a 3% ó 3.5% y, además, el recurso es ahora escaso.

Catharantus roseus presenta problemas diferentes para el aislamiento de la vincristina y la vincoleucoblastina; estos compuestos se encuentran en cantidades pequeñas en la planta, lo que ha creado la necesidad de buscar variedades con mayores porcentajes de tales alcaloides; sin embargo, aun después de una búsqueda exhaustiva como la que realizaron Zenk et al. (1977), quienes analizaron 184 muestras provenientes de diferentes sitios geográficos, no se ha encontrado una planta con mayor rendimiento.

Otro caso es el de *Papaver somniferum*; pese a que el cultivo puede hallarse en muchos lugares del mundo, presenta dificultades especiales porque requiere un control muy estricto por parte de las autoridades, debido al tráfico ilegal de morfina. De esta planta se obtiene también la codeína, un derivado de la morfina, que es un antitusivo muy eficaz, además de analgésico.

El empleo del cultivo in vitro de células y tejidos vegetales ofrece actualmente una alternativa de solución a los problemas expuestos, con la

posibilidad de un mayor rendimiento en los principios activos de cada planta.

Conceptos básicos sobre los metabolitos secundarios

Se definen como metabolitos o productos secundarios aquellos compuestos que no tienen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de los organismos que los sintetizan. Aunque estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos entre los microorganismos, los que se encuentran en las plantas superiores son los que han despertado mayor interés desde el punto de vista de su posible función biológica y su aplicación.

Puesto que las plantas no se desplazan de un lugar a otro, han desarrollado gran cantidad de estrategias para sobrevivir en su condición sedentaria, y en este sentido los metabolitos secundarios desempeñan las siguientes funciones importantes: protegerlas contra los depredadores, permitirles competir ventajosamente por el hábitat con otras plantas, atraer polinizadores y simbiosistas y, tal vez, brindarles protección contra los diferentes tipos de estreses a los que se ven sometidas a lo largo de su vida (Loyola-Vargas, 1985).

Por otro lado, Bell (1981) sugiere que algunos metabolitos secundarios serían el producto final de un proceso biosintético aberrante y otros serían productos de excreción; propone además que tales productos se han mantenido a lo largo de la evolución debido a que los genes que codifican su síntesis se encuentran ligados a un gen esencial para la sobrevivencia de la planta.

Sin embargo, existen evidencias de que los metabolitos secundarios se encuentran bajo una estricta regulación metabólica (Reyes et al., 1985; Loyola-Vargas et al., 1984) y que su síntesis está regulada también por factores como la luz (Endress et al., 1984; Hagimori et al., 1982), los reguladores del crecimiento (Hagimori et al., 1982; Elliot, 1983) y la temperatura (Lipskii et al., 1982). Esto sugiere que los metabolitos pueden tener una función importante para la sobrevivencia de las plantas, y que la falta de información sobre las vías de su síntesis es lo que ha provocado la especulación.

En la actualidad se dispone de un esquema general sobre la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Figura 9.1), pero se desconocen en gran medida los pasos intermedios y las estrategias que siguen las células para regularla. Se sabe, por ejemplo, que un estrés nutricional puede modificar la calidad y la cantidad de los alcaloides en *C. roseus* (Loyola-Vargas et al., 1984; Reyes et al., 1985) pero no se sabe cómo lo hace.

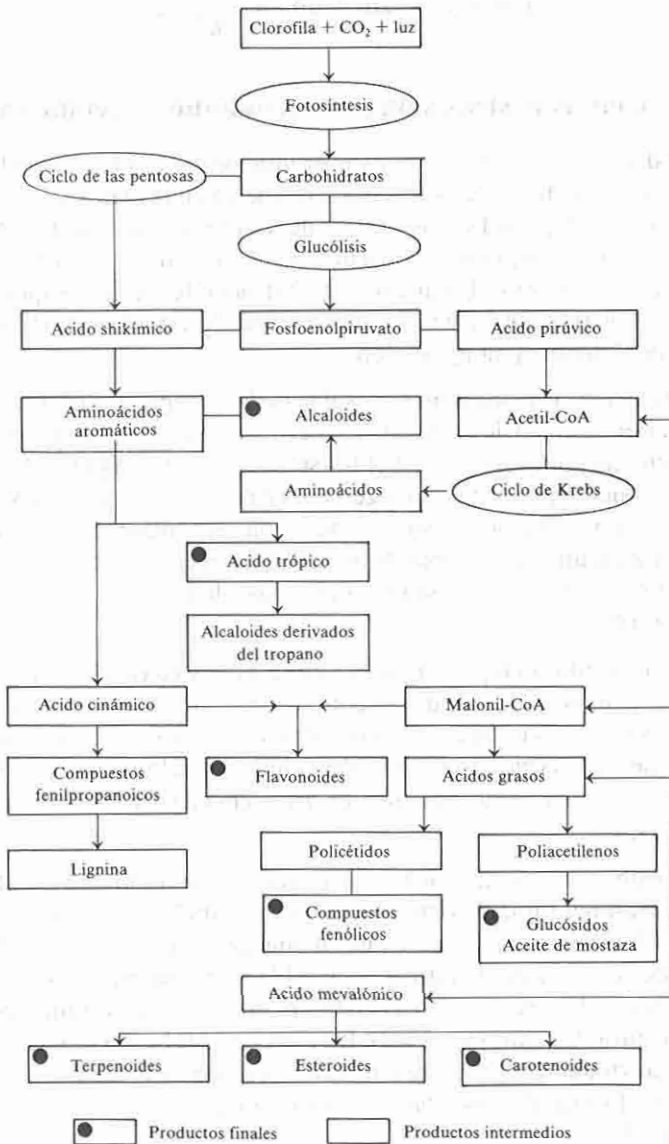


Figura 9.1. Principales vías del metabolismo secundario en las células vegetales.

FUENTE: Loyola-Vargas, 1984.

Técnicas para la Producción de Metabolitos Secundarios

Para que el cultivo de células vegetales *in vitro* tenga aplicación en la producción industrial de metabolitos secundarios, se requiere que éstos se puedan obtener en grandes cantidades; no ocurre así en la mayoría de los cultivos celulares que producen esos compuestos en niveles inferiores a los obtenidos en las plantas de las cuales se derivan tales cultivos. No obstante, este panorama cambia rápidamente y, como se verá en los ejemplos que se presentan más adelante, la producción de algunos metabolitos específicos ha aumentado notablemente mediante diferentes métodos que se empezaron a utilizar recientemente. Las tres alternativas principales son:

- Seleccionar variantes genéticas sobreproductoras.
- Optimizar el medio de cultivo para la producción de biomasa y para la biosíntesis.
- Producir biomasa en gran escala.

Modificación genética y selección de líneas sobreproductoras

A diferencia de lo que ocurre con la biología de los microorganismos en cuanto a sus aplicaciones biotecnológicas, las células vegetales no han recibido todavía un beneficio de los métodos de modificación genética disponibles actualmente.

El desconocimiento de los factores que regulan el metabolismo secundario, e inclusive de las reacciones y enzimas involucradas en él, ha dificultado el desarrollo de métodos de selección para obtener líneas sobreproductoras de metabolitos específicos —inducidas por tratamientos mutágenicos— o simplemente para obtener productos de la variación somaclonal presente en las células vegetales.

Se pueden aplicar eventualmente en este caso las técnicas para transferir genes, descritas en el Capítulo 33. Por ejemplo, existen enzimas que desvían los metabolitos primarios hacia las vías metabólicas secundarias y son, por lo tanto, factores importantes en la acumulación de los productos de tales vías; estas enzimas constituyen blancos específicos de los productores en la manipulación de la expresión de los genes. Recientemente, Berlin (1984) comunicó los resultados preliminares de experimentos sobre

modificación genética tendientes a aumentar el rendimiento de quinalizidina en cultivos de *Lupinus* sp.; este objetivo podría lograrse introduciendo genes para la expresión (constitutiva) de una lisina-decarboxilasa bacteriana.

Probablemente, una de las más grandes aplicaciones de la fusión somática es la obtención de líneas celulares sobreproductoras de metabolitos secundarios. La falta de rediferenciación no es un impedimento si tales líneas se van a cultivar en fermentadores, y lo único que se requiere son métodos de selección adecuados. Los resultados obtenidos con algunos híbridos somáticos de *Nicotiana tabacum* x *N. rustica*, que producen cuatro veces más alcaloides que *N. rustica* y 10 veces más que *N. tabacum* (Douglas et al., 1981), son muy sugestivos acerca del potencial que tiene la fusión somática en esta área de la biotecnología. Sería también factible pensar en líneas sobreproductoras normales pero, con más rápido crecimiento u otras cualidades deseables.

A menudo, los cultivos in vitro que se seleccionan porque producen niveles de metabolitos suficientemente elevados y despiertan, por ello, el interés comercial, son inestables y no se pueden conservar sin una selección repetida; esto se debería a que las células sobreproductoras tendrían una velocidad de crecimiento menor que las demás, lo que conduce a su eliminación por dilución al hacer los subcultivos. La selección y clonación de las células sobreproductoras pueden dar como resultado líneas celulares sobreproductoras estables. Sin embargo, se tropieza con dos grandes dificultades: tener que seleccionar estas líneas entre una población de millones de células, y clonarlas cultivándolas a baja densidad; esto ha sido siempre difícil, si no imposible en algunas especies.

Chaprin et al. (1984) sugirieron una solución para el primer problema; midieron, por microespectrofotometría, la concentración intracelular de ácido rosmarínico en células de *Coleus blumei* cultivadas en suspensión, cuya absorbancia a 330 nm se debe exclusivamente a este ácido. No se ha demostrado, sin embargo, que cultivos derivados de células seleccionadas por este método sean sobreproductoras o estables.

Un método más eficiente de selección es el descrito por Brown et al. (1984), quienes separaron por fluorocitometría protoplastos de *Catharanthus roseus* con alto contenido de alcaloides, valiéndose de la fluorescencia azul causada por el contenido de serpentina. Este método permite separar, cada segundo, 1000 células con una viabilidad elevada; de 30% a 50% de estas células generan plantas (Galbraith et al., 1984), lo que representa la ventaja de no requerir el cultivo de células aisladas.

Otras técnicas, como la separación por punto isoelectrico, la cual se ha aplicado recientemente en la selección de productos de fusión de protoplastos, serían también de gran utilidad en la separación de células que acumulan algún compuesto (Griffin et al., 1985).

El preacondicionamiento al medio de cultivo es una alternativa que puede tener una aplicación generalizada en el plaqueo a baja densidad; consiste en cultivar las células a altas densidades sobre un papel filtro colocado encima del medio de cultivo sólido, removiendo posteriormente el papel y las células. Se ha logrado con este método una eficiencia de recuperación del 70%, plaqueando células de *C. roseus* a baja densidad.¹

Aunque la mayoría de los cultivos celulares producen metabolitos en cantidades más pequeñas que las producidas por la planta completa, los cultivos de tejidos organizados (órganos) producen a menudo cantidades mucho mayores de esos metabolitos. Estos cultivos no han recibido mucha atención por la dificultad que se presenta para mantenerlos; sin embargo, empleando líneas tumorales derivadas de cepas mutantes de *Agrobacterium tumefaciens* y de *A. rhizogenes*, las cuales forman tumores organogénicos fácilmente cultivables, se podrían obtener buenos rendimientos de ciertas sustancias.

Investigaciones realizadas por Florez et al. (1985) indican que las raíces que se forman en cultivos de *Nicotiana tabacum*, *Hyoscyamus muticus* y *H. niger*, transformados con *A. rhizogenes*, crecen a velocidades semejantes a las de los cultivos en suspensión, y producen niveles de alcaloides semejantes a los de la planta madre en el medio de White carente de hormonas. Los niveles de alcaloides se pueden incrementar optimizando el medio de cultivo.

Optimización de los medios de cultivo

Una de las principales dificultades del uso de células vegetales cultivadas in vitro para producir metabolitos a nivel industrial es la lentitud de crecimiento de aquéllas; esto aumenta significativamente el tiempo que se requiere para la producción de biomasa.

En los sistemas microbianos, el crecimiento y la síntesis de productos secundarios son procesos mutuamente excluyentes; algo similar parece suceder en los sistemas vegetales, en los que la acumulación de metabolitos ocurre durante la fase estacionaria.

1. Cresswell, P. Información publicada en Agricell Report, 1984.

Ejemplos de tal situación son la producción de antraquinonas por cultivos de *Gallium molugo* (Wilson et al., 1978) y la de alcaloides por *C. roseus* (Zenk et al., 1977). Más aún, se ha informado acerca de condiciones nutricionales o físicas que restringen el crecimiento y producen un aumento en el nivel de metabolitos (Knobloch et al., 1980; Curtois et al., 1980). Lindsey et al. (1983a y 1983b) han sugerido, inclusive, que en los cultivos de solanáceas es indispensable un cierto grado de rediferenciación para la producción de alcaloides de tropano.

Lo anterior sugiere la necesidad de definir la relación (o compromiso) entre la velocidad de producción de biomasa y la acumulación de productos, o la de separar ambas fases aunque esto represente mayor número de pasos en el proceso. La división del cultivo en dos fases, una de mantenimiento (crecimiento rápido) y otra de producción, empleando diferentes medios de cultivo (Zenk et al., 1977), parece ser una estrategia importante para lograr una mayor producción de metabolitos específicos; así lo demuestra el incremento del 400% en la producción de shikonina alcanzado por cultivos de *Lythosperum erythrorhizon* (Yamada et al., 1983).

Pese a lo anterior, Stafford et al. (1985) consideran que la separación entre el crecimiento y la acumulación se debe a la variedad de condiciones experimentales empleadas con células que se encuentran en un mismo estado fisiológico y que, por lo tanto, no corresponde a una característica propia de las células. Cuando ellos analizaron la producción de alcaloides en relación con el crecimiento del cultivo en células de *C. roseus* provenientes de diferentes fases de crecimiento, pero cultivadas en condiciones idénticas, encontraron que en todas las etapas de cultivo la acumulación de serpiente era proporcional a la acumulación de biomasa.

Las técnicas básicas para la inducción y el mantenimiento de callos y células en suspensión (descritas en otros capítulos de este libro) han sufrido modificaciones específicas dirigidas a resolver los problemas que ocasiona la producción de biomasa y el incremento de la productividad. Prácticamente todos los factores físicos y químicos que constituyen el medio de cultivo afectan, de una u otra forma, la velocidad del crecimiento o la acumulación de metabolitos— o ambas variables.

El análisis de todos esos efectos está fuera del objetivo del presente capítulo y, por lo tanto, sólo se darán algunos ejemplos para ilustrar la importancia de la influencia de tales factores.

Factores nutricionales y pH. Lógicamente, la cantidad de nutrimentos en el medio de cultivo tiene influencia directa sobre la velocidad del

crecimiento. En general, las concentraciones elevadas de macronutrientes como nitratos, potasio, amonio y fosfatos permiten un crecimiento acelerado, mientras que su eliminación lo limita, estimulando al mismo tiempo la acumulación de metabolitos.

El efecto anterior se ha observado en la producción de alcaloides por *C. roseus* (MacCarthy et al., 1980a) y de nicotina en cultivos de tabaco (Mantell et al., 1983), entre otros. Sin embargo, la calidad de los nutrientes presentes ejerce también influencia en la producción de metabolitos específicos; así, se observa que en cultivos de *C. roseus* diversos medios pueden sostener adecuadamente el crecimiento, pero sólo en MS ocurre la mayor acumulación de alcaloides (Zenk et al., 1977). Se observa también que la sustitución de nitrógeno inorgánico por nitrógeno orgánico, como peptonas o extracto de levaduras, incrementa grandemente la producción de alcaloides (Dougall, 1980).

Los bajos niveles intracelulares de fosfatos producen, en los microorganismos, una baja carga energética que resulta en la activación de las enzimas del metabolismo secundario (Drew et al., 1977). En las células vegetales, tales niveles son característicos de cultivos seniles; por tanto, no es sorprendente que el agotamiento de los fosfatos influya dramáticamente en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

La fuente de carbono, principalmente sacarosa y glucosa, es también fundamental para mantener el crecimiento celular; sin embargo, en algunas ocasiones su adición incrementa la acumulación de metabolitos (Davies, 1972). Este efecto se debe probablemente a factores osmóticos.

La mayoría de los cultivos celulares se desarrollan a un pH inicial óptimo, entre 5 y 6, el cual cambia durante el curso del cultivo. Estos cambios pueden afectar gravemente la acumulación de metabolitos, como lo demuestra la conversión de triptofano a una variedad de metabolitos indólicos. A un pH constante de 6.3, la cantidad de triptofol producido dobla la del cultivo con pH variable, y si el pH decae a 4.8, la síntesis se inhibe totalmente (Veliky, 1977).

Factores físicos. Las mismas características de la radiación que afectan el desarrollo de las plantas in vivo afectan el de las células cultivadas in vitro: tanto la longitud de onda, como la intensidad y el fotoperíodo, pueden estimular o inhibir la biosíntesis de algún metabolito. Para revisar las investigaciones hechas sobre estos efectos, el lector consultará Seiber et al. (1980).

La aireación, ya sea por flujo controlado de gases o por agitación mecánica, es indispensable para el incremento de la biomasa y afecta

también la acumulación de metabolitos. Este aspecto será discutido más adelante cuando se trate sobre el empleo de los fermentadores.

Existen pocos datos sobre el efecto de la temperatura en la síntesis de metabolitos secundarios, pero este efecto no se debe descuidar, como lo muestra el caso de los callos de *Peganum* sp. La temperatura óptima para el crecimiento de estos callos es de 30 °C, pero la producción óptima de alcaloides ocurre a 25 °C con un rápido decaimiento a temperaturas superiores (Nettleship et al., 1974); por otra parte, el contenido de ácidos grasos de las células cultivadas in vitro aumenta notablemente a temperaturas subóptimas para el crecimiento (MacCarthy et al., 1980b). Estos datos son congruentes con el hecho de que la acumulación de metabolitos ocurre principalmente en fases de lento o nulo crecimiento.

Reguladores. Los reguladores del crecimiento inducen generalmente la formación de metabolitos secundarios in vitro e in vivo. La cantidad y calidad de las auxinas presentes al principio del desarrollo del cultivo y durante él tiene un marcado efecto sobre el metabolismo primario y secundario.

Es necesario verificar la calidad y las proporciones de los reguladores, no sólo por su efecto sobre el crecimiento, sino también sobre la biosíntesis. La KIN no ejerce ningún efecto sobre el crecimiento de los callos de *Datura tatula*; no obstante, a elevadas concentraciones, inhibe la biosíntesis de alcaloides (Tabata et al., 1971). Detalles sobre la amplia literatura acerca del tema se pueden consultar en Mantell et al. (1983).

Otro grupo de compuestos que regulan el metabolismo celular y que pueden tener un efecto importante sobre la producción de metabolitos secundarios es el de las poliaminas. Muhitch et al. (1985) informaron que, cuando se añade sacarosa y espermidina a cultivos celulares de la rosa Escarlata de Paul en fase estacionaria, se previene el envejecimiento y se incrementa la cantidad y la variedad de los fenoles acumulados en las células. Este tratamiento podría alargar la vida de los cultivos maduros en la fase de producción.

Otros factores. La adición de carbón activado induce la síntesis de ciertos compuestos, como la benzoquinona, en cultivos de *Lithospermum erythrorhizon* (Fukui et al., 1984).

La infección por microorganismos patógenos induce la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios in vitro; de la misma forma, la adición de extractos microbianos induce la síntesis de alcaloides, flavonoides, cumarinas, etc., en las células cultivadas in vitro. Por ejemplo,

Heinstein (1985) añadió muestras de *Verticillium dahlia* o *Fusarium moniliforme*, esterilizadas en el autoclave, a cultivos de *Gosypium arborescens*, *Papaver somniferum* y *Cephalotaxus harringtonia*, y obtuvo rendimientos que eran, respectivamente, 19, 92 y 106 veces superiores a los testigos.

El cultivo en gran escala

Para la producción industrial de cualquier compuesto se requieren grandes volúmenes de mezclas de reacción, o de medios de cultivo, en fermentadores que permitan obtener toneladas del producto. El cultivo de células vegetales en gran escala presenta varias dificultades, las cuales se deben resolver antes de que esta técnica tenga mayor aplicabilidad comercial. Los principales problemas son: a) el lento crecimiento de la biomasa; b) una tendencia a la agregación celular; c) la acumulación intracelular de los productos; y d) poca resistencia a la agitación mecánica.

Ya se ha discutido aquí la rápida producción de biomasa y la acumulación de metabolitos mediante la optimización de los medios de cultivo; los otros problemas se están afrontando por medio de las siguientes técnicas:

- a) Inmovilización de células en matrices inertes.
- b) Permeabilización.
- c) Diseño de biorreactores especiales.

Inmovilización de las células. Se trata de una de las técnicas biotecnológicas más importantes para la bioconversión de sustancias por microorganismos. El desarrollo de esta técnica se inició en 1966, cuando Mosbach et al. (1966) atraparón células del líquen *Umbicaria pustulata* en un gel de poliacrilamida; desde entonces se ha empleado una gama de sustratos que comprende DEAE sephadex, dextrano, carboximetil-celulosa, lana metálica, ECTEOLA celulosa, colágeno y, más recientemente, geles de alginato, agarosa y carragenina (Lindsey et al., 1983a). La utilización de la técnica de inmovilización de células es posterior a 1966 y fue motivada por el interés de emplear estas células como reactores biológicos (Brodelius et al., 1979).

En Lindsey et al. (1983a) se encuentra un análisis más completo de las ventajas de la inmovilización de las células, aunque las razones que justifican esta práctica se pueden resumir así:

- a. Las células en suspensión se encuentran en un ambiente muy diferente al natural y sufren severos cambios en su metabolismo. Este hecho ha

sido demostrado por Zeleneva et al. (1980), quienes encontraron que los patrones de actividad de una variedad de enzimas eran similares en callos en desarrollo y en el tejido de la raíz del cual se originaron tales callos, pero eran muy diferentes en las células en suspensión derivadas de los mismos callos.

- b. Las células inmovilizadas tienden a crecer más lentamente y a diferenciarse, condiciones que conducen a una acumulación de metabolitos secundarios, como se mencionó anteriormente.
- c. La inmovilización de las células permite cambiar con facilidad la composición química del medio de cultivo y coleccionar los productos secretados sin tener que manipular físicamente las células; la manipulación, que es frecuente en los cultivos en suspensión, maltrata generalmente las células.

Se ha estudiado, empleando varios métodos, la viabilidad de las células inmovilizadas en esferas de alginato, agarosa o carragenina, y se ha encontrado que este proceso no afecta las condiciones metabólicas de las células. El análisis espectroscópico del metabolismo del ^{32}P y del pH celular por resonancia magnética nuclear no reveló ninguna diferencia entre células de *C. roseus* cultivadas en suspensión o inmovilizadas en agarosa o alginato.

El estudio de la viabilidad por medio de mediciones de la respiración, por incorporación de diacetato de fluoresceína, y por la actividad de la enzima 5-beta hidroxilasa (que es dependiente de la viabilidad celular) muestra que los protoplastos de *Daucus carota* y de *C. roseus* inmovilizados en carragenina, agarosa o alginato poseen, después de catorce días, una viabilidad superior a la de los que se cultivan libres bajo las mismas condiciones (Linsefors et al., 1985).

Otro método es el presentado por Lindsey et al. (1984), quienes inmovilizaron células de *Capsicum frutescens* permitiendo que invadieran pasivamente los poros de la espuma reticulada de poliuretano. Las células inmovilizadas de esta manera no muestran reducción en su actividad respiratoria ni en la actividad de las esterasas, y producen niveles de capsaicina mil veces superiores a los producidos por las células en suspensión. El método es menos tóxico y más barato que la inmovilización en esferas de alginato, y los autores lo consideran básico para el desarrollo de la inmovilización celular a escala industrial.

Permeabilización. Al contrario de las células animales, la mayoría de las células vegetales no secretan sustancias al medio de cultivo sino que

tienden a almacenarlas en vacuolas; esto es un gran inconveniente cuando lo que se desea es una producción continua y barata de tales sustancias, pues implica la necesidad de aplicar procesos de extracción y purificación, y de regenerar continuamente la biomasa. Lo ideal sería que las células secretaran sus productos al medio de cultivo, de donde éstos se recuperarían sin necesidad de destruir la biomasa.

La permeabilización celular se puede inducir por medio de tratamientos químicos, los cuales se deben definir antes de que el método pueda ser aplicado extensivamente.

Se ha empleado sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 10% durante 30 min para inducir, en células inmovilizadas de *C. roseus*, la liberación de ajmalicina; después del tratamiento se puede usar la misma biomasa para producir más ajmalicina y repetir el proceso varias veces. Sin embargo, este método no es aplicable a todos los tipos de células y de procesos; en *Cinchona ledgeriana* la liberación de alcaloides intracelulares requiere concentraciones de DMSO superiores al 20%, los cuales causan daños a las células (Parr et al., 1984).

No todos los metabolitos son almacenados intracelularmente, y existen algunos informes de liberación espontánea. Cultivos en suspensión de *Thalictrum minus* secretan mayor cantidad de berberina (10% del peso seco) que la producida por las raíces de la planta madre (0.01% del peso seco); las concentraciones son tan altas que el alcaloide se cristaliza como nitrato o cloruro, dependiendo de la composición del medio (Nakagawa et al., 1984).

Biorreactores. Por su diferente tamaño y características estructurales, las células vegetales no se pueden cultivar a gran escala en el mismo tipo de reactores biológicos que se emplean para el cultivo de microorganismos. Esto ha obligado al diseño de contenedores y sistemas de agitación y aireación especiales.

Se ha empleado un gran número de fermentadores con diferentes características, y con capacidades que fluctúan entre 2 y 20,000 litros (Martin, 1980; Fowler, 1983); estos fermentadores presentan ventajas y desventajas que dependen del tipo de cultivo. Aquí se citan algunas de las características que se deben considerar.

Las células vegetales son de 10 a 100 veces más grandes que las células microbianas (20 a 150 μ de diámetro) por lo que tienden a sedimentarse con rapidez. Esto produce zonas de maduración y de necrosis que afectan la población celular que se mantiene en suspensión, dando como resultado cultivos multifásicos.