

Enseñanza participativa de la asignatura Bioproducción de metabolitos vegetales de interés industrial: Una experiencia con quince años de vida

Carlos Vicente Córdoba

Departamento de Biología Vegetal I. Facultad de Biología. Universidad Complutense.
Avenida José Antonio Novais, 2. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. España.
cvicente@bio.ucm.es

Resumen: En el presente trabajo se expone la experiencia educativa a lo largo de 15 años de impartición de la asignatura optativa titulada Bioproducción de metabolitos vegetales de interés industrial. Se hace especial hincapié en las acciones desarrolladas en orden a lograr la máxima participación interactiva del alumno mediante el análisis de resúmenes previos, elaboración de fichas de productos naturales, sus aplicaciones industriales y su producción biotecnológica, resolución de problemas propuestos por el profesor, elaboración de sus propios problemas y desarrollo de clases prácticas.

Palabras clave: Biotecnología vegetal. Metabolitos de uso industrial. Educación participativa. Desarrollo de habilidades.

¿POR QUÉ LA BIOTECNOLOGÍA?

La **Biotecnología** surge como una nueva especialidad en los estudios de Biología, con lo que se pretende reconocer e incorporar al *currículum* científico del biólogo la preocupación social más o menos inmediata que subyace bajo cualquier ciencia pura: su potencial uso para elevar la calidad de vida del ser humano. No es que en sí misma sea una idea novedosa. Biotecnología fue la mejora genética vegetal, practicada desde la Prehistoria, cuando los primeros agricultores descubrieron que era más rentable, de cara al futuro, consumir las semillas más pequeñas o deformes y guardar las mayores y más perfectas como simiente de una nueva cosecha. Biotecnología fue (y lo sigue siendo) la fabricación del vino, del pan o la cerveza. Las disciplinas de Agricultura y Zootecnia, Mejoras genéticas vegetal y animal, serían sus precedentes más inmediatos en el siglo XX. Lo que diferencia a la nueva Biotecnología de sus predecesoras es el enorme potencial técnico que la Biología Molecular ha puesto en nuestras manos, la práctica imposibilidad de separar el avance técnico del avance científico y la enorme rapidez con la que se alcanzan, en algunos casos, los logros más descabellados. Nunca ha sido más cierta la

pretenciosa afirmación del conde de Bufón: “En Biología, todo lo que puede pasar, pasa”. Las plantas y los animales transgénicos no dejan nada al azar de la recombinación, ni tampoco las plantas clonadas de una sola célula, y la primera respuesta se obtiene en un periodo de tiempo tremendamente corto. Otra cosa es que haya que comprobar, con el paso de los años, que los nuevos genes incluidos en el genoma de una planta no desaparecen o se modifican con el transcurso de las generaciones. Eso es ya otro cantar y hay que esperar años para comprobarlo.

Plantas transgénicas, cultivos mono o pluricelulares, e inmobilizaciones celulares o enzimáticas son las tres técnicas que dominan la Biotecnología Vegetal. Las plantas poseen una serie de enzimas y acumulan una gran cantidad de metabolitos que son de un enorme interés aplicado. La Biotecnología no sólo hace frente (lo intenta) a la escasez de recursos primarios en alimentación. Tiene también una gran cantidad de frentes abiertos en temas de salud y comodidad, que no son menos importantes que los alimentarios. Muchos de esos metabolitos son producidos por las plantas en tan baja concentración, o son producidos por vegetales de tan lento crecimiento, que su extracción para uso industrial supondría la extinción de la especie en un periodo más o menos corto de tiempo. Quizá el ejemplo más palmario sea el taxol, uno de los más potentes citostáticos usados en la terapia de cáncer de mama, de ovario y de cerebro. También metabolitos antitumorales, fotoprotectores, decolorantes, astringentes o aromáticos, usados como base de perfumes, entrarían dentro de esta disyuntiva de consumo o extinción y la síntesis orgánica de los mismos no ha podido proporcionar una alternativa conveniente en muchos de los casos. Tratamos de demostrar en esta asignatura que las alternativas reales existen, que procesos biotecnológicos de clonación, cultivo de tejidos o inmobilizaciones celulares y enzimáticas pueden aumentar las tasas de producción de metabolitos esenciales particulares sin un consumo desproporcionado y suicida de biomasa (evitando así el peligro de extinción de especies), sin alteraciones del ecosistema por competición (evitando así el desequilibrio ecológico) y sin el notable incremento de costos que muchas veces conlleva la síntesis orgánica (evitando así el encarecimiento del producto). Trata la asignatura, pues, de demostrar que, mediante procesos biotecnológicos, el hombre puede seguir consumiendo productos vegetales, mejorando su salud y su bienestar, en un entorno rigurosamente conservacionista de la biodiversidad.

LA BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS APLICADA A LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS

La aplicación de los usos biotecnológicos a la mejora de las plantas es un arma particularmente potente para optimizar procesos agrícolas o industriales. Para situarse en lo que puede significar la biotecnología de plantas bajo el punto de vista de su aplicación, se transcriben textualmente los objetivos de esta nueva ciencia según los describió Armando Alberti en 1997, cuando afirmó que la biotecnología aplicada a los vegetales trataba de mejorar.

- La tolerancia o resistencia a los organismos que consumen, contaminan o destruyen las plantas.
- La tolerancia a situaciones de estrés abiótico en el ecosistema, tales como sequía, calor/frío, salinidad y contaminantes.
- La productividad, en términos de conversión de dióxido de carbono y nutrientes del suelo en material biológico útil.
- **Las características o propiedades de las plantas desde el punto de vista de su composición o conservación y de procesado (composición más nutritiva, reducción de la cantidad de toxinas naturales, producción de compuestos de interés farmacológico, mejores características de almacenamiento, etc.).**
- La adaptación al medio geográfico en las que pueden cultivarse como cosecha.

El párrafo resaltado en color azul constituye la justificación y base de la asignatura **Bioproducción de metabolitos vegetales de interés industrial**, uno de los objetivos que definen la Biotecnología Vegetal. Se trata, por tanto, de fijar un carácter genético (resistencia, producción) que se exprese de una forma continua y que sea estable a través de las generaciones. La forma de conseguirlo es variada. Puede ser que interese expresar dicho carácter en una especie vegetal que no lo tenga explícito en su genoma. Este interés puede tener varias causas: que se trate de una especie agrícola que no haya seleccionado el carácter de una manera natural o por mejora genética convencional, que se trate de expresar dicho carácter, no en la planta que lo posee de una manera natural por tener un sistema poco eficiente de producción de biomasa, sino en otra especie, afín o alejada filogenéticamente, que tenga un crecimiento mucho más rápido, etc. Hoy día es posible la introducción en el genoma de una especie de un gen extraño de forma que sea expresable, construyendo de esa manera lo que se denomina una **planta transgénica**.

Hay otros casos en los que es interesante la expresión de un bloque de genes con una distribución cuantitativa precisa. Es el caso, por ejemplo, de los aceites esenciales, mezclas complejas de productos volátiles que se emplean para dar aroma a las bebidas, cosméticos o perfumes. Bajo el punto de vista del consumidor, lo interesante de una bebida aromática es que tenga siempre el mismo sabor, o que la colonia que utiliza no varíe su aroma de un lote de producción al siguiente. Sin embargo, los individuos que producen dichos aceites esenciales, en condiciones naturales, están sometidos a recombinación por fecundación cruzada. Es posible, por lo tanto, que aún no variando la composición cualitativa del aceite esencial producido, pueda variar la composición cuantitativa del mismo de una generación a la siguiente. Por ello, es esencial anular estas variaciones, impidiendo la recombinación. La posibilidad de clonar un individuo mediante cultivo de tejidos proporciona el arma biotecnológica ideal para fijar las características organolépticas del producto industrial.

Otro punto de interés sería el conseguir un producto químico de una planta rara o en vías de extinción o de un crecimiento tan lento que la destrucción de biomasa que implica la purificación de dicho producto no puede ser compensada con el crecimiento normal de la especie. En ese caso, existe la posibilidad de purificar la enzima o enzimas de producción utilizando la menor cantidad de vegetal posible e inmovilizar dicha enzima, o dichas enzimas, en una matriz inerte. Este biorreactor puede fabricar el mismo producto en un ambiente abiótico, durante periodos de tiempo prolongados, solamente con suministrarle los precursores precisos. En el caso que el uso de dichos precursores supongan un coste económico indeseable, también existe la posibilidad de inmovilizar en las mismas matrices inertes células o agregados celulares (una porción de biomasa extremadamente pequeña) capaces de realizar el proceso completo desde precursores mucho más primarios y, por lo tanto, mucho más económicos, como pueden ser dióxido de carbono, acetato o glucosa. El sistema puede tener un coste adicional generado por la purificación del producto si el biorreactor da como resultado de su actuación una mezcla de diferentes compuestos, pero las técnicas analíticas preparativas siempre pueden generar alternativas en las que el aspecto crematístico del proceso no genere una carga excesiva.

Construcción de plantas transgénicas, clonación de individuos por cultivo de tejidos o preparación de biorreactores de células o enzimas inmovilizadas son los tres usos biotecnológicos que mayoritariamente se utilizan en la producción de metabolitos o mezclas de metabolitos de interés industrial.

TEMARIO DE LA ASIGNATURA

En su forma actual, el temario de la asignatura [Bioproducción de metabolitos vegetales de interés industrial](#) está establecido de la siguiente forma:

1. La biotecnología de plantas aplicada a la producción de metabolitos.

2. Matrices de origen vegetal para uso biotecnológico: producción y aplicaciones.

- 2.1. [Biopol](#).
- 2.2. Bioskin.
- 2.3. Alginatos.
- 2.5. Carragenanos.

3. Edulcorantes no energéticos.

- 3.1. Edulcorantes de síntesis.
- 3.2. Producción de fructanos en pratenses.
- 3.3. [Levanos](#).
- 3.4. Producción de heterofructanos por plantas azucareras.

3.5. Liberación de fructosa por sistemas enzimáticos inmovilizados.

3.6. Poliioles.

4. Emulsionantes y carcinostaticos.

4.1. Goma arábica y relacionadas.

4.2. Gutapercha.

4.3. [Gelanos](#).

4.4. [Xantanos](#).

4.5. Polisacáridos carcinostaticos.

4.6. Agentes antitumorales de origen liquenico.

4.7. Taxol.

4.8. Epotilonas.

5. Analgésicos y antipiréticos.

5.2. Analgésicos no opiáceos.

5.4. Analgésicos opiáceos.

6. Astringentes.

6.1. Taninos.

6.2. Astringentes fotodinámicos.

6.3. Inhibidores de la actividad biológica de los psoralenos.

6.4. Compuestos con actividad antitirosinasa.

7. Inhibidores metabólicos.

7.1. Los derivados del ácido cinámico.

7.2. Los ácidos úsnicos.

7.3. Inhibidores de elastasa.

7.4. El ácido caínico.

8. Estabilizantes y potenciadores del sabor.

8.1. Estabilidad del aroma de la cerveza.

8.2. Producción de ácido L-glutámico.

8.4. Produccion de GMP.

9. El perfume.

9.1. Componentes del perfume.

9.2. El análisis químico de los componentes del perfume.

9.3. Alergenos y reacciones alérgicas.

9.4. Notas y formulaciones.

9.5. Fijación y persistencia.

9.6. Bioproducción de componentes de perfumes.

Como se puede observar, alguno de los puntos del temario ha sido resaltado en color azul. Con esto se quiere indicar que se trata de productos microbianos que, por su analogía con los metabolitos típicamente vegetales que están siendo estudiados, conviene, al menos, hacer referencia a ellos para dar al alumno una más amplia panorámica de las posibilidades industriales.

LA ASIGNATURA EN SÍ MISMA: DESCRIPCIÓN DE LAS HERRAMIENTAS PARA SU ENSEÑANZA USANDO UN EJEMPLO CONCRETO: EL RESVERATROL.

El resveratrol, metabolito escogido para este ejemplo, estaría incluido en el tema [7. Inhibidores metabólicos, apartado 7.1. Los derivados del ácido cinámico](#).

Tradicionalmente se han empleado seis actos docentes, cada uno de distinto significado, que tratan de aunar en una acción conjunta la actividad del profesor con la participación de los alumnos. Cada uno de ellos va dirigido a desarrollar una habilidad particular que colabore en la máxima eficacia final del aprendizaje. Estas seis acciones son:

- a) A través del Campus virtual, el alumno dispone, con una semana de antelación, de un resumen del tópico correspondiente a la clase.
- b) A la semana, el alumno recibe del profesor los conocimientos teóricos correspondientes al resumen que obra en su poder.
- c) Tras estas dos acciones, el alumno debe elaborar una ficha del metabolito correspondiente. La elección es voluntaria, como voluntaria y libre es la agrupación de dos o tres alumnos para la elaboración de cada ficha. El alumno dispone del resumen elaborado por el profesor, que debe confrontar con el desarrollo del tema recibido en clase. De esta forma, el estudiante tiene acceso al conocimiento de un sistema de síntesis, con el que puede estar de acuerdo (el resumen posiblemente le haya resultado útil para la comprensión de la clase) o criticarlo si ha habido algún punto específico para el que no le ha resultado útil. Ahora, el alumno puede ejercitarse en su propia acción de síntesis de conocimientos de una forma relativamente sencilla. La ficha sería, por decirlo así, el resumen que el alumno elabora tras recibir las dos acciones precedentes. Estas fichas son acumuladas en el Campus virtual, con referencia explícita a su autoría, de tal manera que todo el alumnado posea al final del curso, la colección completa de fichas de los principales metabolitos estudiados.
- d) Resolución de problemas propuestos por el profesor. Los alumnos disponen, desde el comienzo del curso, de una colección de problemas que tratan de profundizar en los aspectos más importantes de cada uno de los puntos del temario. Se trata de

extraer conclusiones precisas de unos resultados encaminados a demostrar experimentalmente un hecho concreto relativo, en general, a la producción biotecnológica del metabolito correspondiente. La elección de problemas por parte del profesor es una acción completamente dirigida, ya que se trata de reforzar con ejemplos experimentales aspectos difíciles o conflictivos de tal manera que la resolución de problemas relativos a estos aspectos es un refuerzo del proceso de comprensión.

- e) Propuesta de problemas por parte del alumno. El sistema es inverso. No se trata en este caso de reforzar puntos concretos de la teoría con suplementos experimentales. Se trata de elegir un experimento al azar, tratar de extraer las conclusiones más claras de los resultados experimentales y, sobre estas conclusiones, establecer una secuencia de preguntas para que sus compañeros extraigan similares conclusiones. Para esta acción, el alumno recibe las siguientes

Instrucciones para la propuesta de problemas

Normalmente se suministrará una separata de un trabajo original, breve pero informativo.

Se debe leer atentamente el trabajo para tratar de seleccionar resultados experimentales cuya interpretación sea posible a la luz de los conocimientos adquiridos.

Debe escogerse de tal manera que en el enunciado puedan resumirse, en el menor espacio posible, el objetivo que se persigue, la información básica de los métodos usados que sea indispensable para una completa comprensión de los resultados experimentales y cualquier otra información adicional requerida para la completa comprensión de los mismos.

Una vez hecho esto, se procederá a:

1º Establecer y redactar el enunciado del problema.

2º Representar (tabla, fotografía o gráfica) los datos experimentales que van a ser objeto de estudio e interpretación.

3º Enunciar dos o tres preguntas, como máximo, secuenciadas en un estricto orden de interpretación lógica, que agoten las posibilidades de análisis de los resultados ofrecidos.

Cada problema elaborado por un pequeño grupo de alumnos (2-3) es primero analizado por el profesor, que trata siempre de respetar la autonomía del alumno

pero también de centrar el enfoque de tal manera que sea lo más asequible que se pueda para el resto del alumnado Posteriormente el problema es discutido en clase y colgado en el Campus virtual, con referencia explícita de su autoría.

f) Clase práctica de laboratorio.

Las prácticas vienen determinadas por una duración de 15 h, lo cual significa que el alumno solo tiene acceso a dos experimentaciones distintas, completamente ajustadas al horario oficial.

Sistemáticamente, se ha huido de otros usos comunes. Por ejemplo, nunca en esta asignatura se ha encargado la realización de seminarios a los alumnos. En quinto curso de Licenciatura, el agobio que aquellos sufren con múltiples asignaturas, elaboración de memorias de las asignaturas troncales, prácticas muy difíciles de encajar, etc., ha hecho que se evite una sobrecarga más a las tareas ya descritas, más que suficientes, a mi juicio, para que los estudiantes ejerciten sus habilidades. También se ha evitado suministrar un exceso de bibliografía complementaria. Muy pocas revisiones, casi todas procedentes de revistas como Trends in Biotechnology o Current Opinion in Plant Science, y sobre temas muy específicos. Muy especialmente se ha evitado la tentación de suministrar a los alumnos traducciones de publicaciones o capítulos de libros, dado que nuestros estudiantes tienen que acostumbrarse al uso de una segunda lengua, absolutamente necesaria en el ámbito científico, y muy especialmente se evita presentar (o confundir) estas traducciones (o versiones, en algunos casos) como una contribución didáctica propia. Siempre puede haber alguien que descubra el libro original, que lo coteje con nuestra “contribución” y que saque las conclusiones pertinentes. De hecho, todo el temario ha sido construido, y es revisado año tras año, a base de artículos de investigación originales. Este trabajo, iniciado en 1995, ha sido recientemente publicado como un texto aunque eso no impide que las clases sigan siendo actualizadas curso por curso.

Clase teórica (Resumen), correspondiente a las acciones a) y b)

- **Naturaleza y distribución**

Resveratrol (3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno) es una fitoalexina producida por fresa, uva y cacahuete. También se encuentra en el vino tinto y tanto el propio resveratrol como alguno de sus derivados tienen amplias propiedades biológicas y farmacológicas. Hoy día ya se expende en las oficinas de farmacia un concentrado de resveratrol, específicamente indicado para tratamientos anti-envejecimiento.

- **Aplicaciones**

Es un polifenol que media como regulador de numerosas moléculas de señalización celular, tales como la proteína multirresistencia a las drogas, topoisomerasa II, aromatasas, DNA polimerasa, receptores de estrógenos, tubulina y F1-ATPasa. El resveratrol activa también diferentes factores de transcripción, suprime la expresión de productos de genes antiapoptóticos, inhibe proteína quinasas, induce enzimas antioxidantes, suprime la expresión de marcadores inflamatorios, inhibe la expresión de productos de genes angiogénicos y metastáticos, y modula genes regulares del ciclo celular. Numerosos estudios con animales han demostrado que este polifenol podría constituir un tratamiento prometedor de numerosas enfermedades asociadas a la vejez, incluyendo, cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares y pulmonares (Harikumar y Aggarwal, 2008).

El resveratrol incrementa el alargamiento de la vida en levaduras, gusanos, moscas y ratones obesos, actuando como un mimético de un régimen de restricción calórica mediante la activación de la histona desacetilasa Sir2 ([Silent information regulator](#)) de levadura, una enzima que separa grupos acetilo de proteínas en presencia de NAD⁺, acetilando el fragmento ADP-ribosa de la coenzima, o su homóloga SIRT1 en mamíferos (Baur *et al.*, 2006). Estas enzimas reciben el nombre genérico de [sirtuínas](#) y juegan un importante papel en las respuestas de los organismos al estrés (térmico o carencial) y en los efectos de alargamiento de la vida producidos por restricción calórica. Además, SIRT1 antagoniza con la senescencia celular ya que su sobre-expresión en fibroblastos primarios de embrión de ratón rescata las células de una senescencia prematura y su inhibición conduce a una activación del programa de senescencia celular en células cancerígenas.

- **Biosíntesis de resveratrol**

Los estilbenos son sintetizados a partir de una unidad fenilpropanoide iniciadora, activada en forma de acil-CoA y tres unidades de malonil-CoA, elongadoras de la cadena de 3C. El primer paso en la biosíntesis del fenilpropanoide iniciador es la desaminación de una molécula de L-fenilalanina para producir ácido *trans*-cinámico, una reacción catalizada por la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL, EC 4.3.1.5). El ácido cinámico es hidroxilado en 4 por una cinamato-4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.13.11) para producir ácido *p*-cumárico, que es entonces activado por una 4-cumaril-CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12) que produce 4-cumaril-CoA. Una policetónido sintasa de tipo III (PKS-III) añade entonces secuencialmente tres restos acetato para elongar la cadena lateral de una única molécula iniciadora de 4-cumaril-CoA. Dependiendo de la actividad PKS-III elegida por el organismo, se producirá una calcona precursora de flavonoides (calcona sintasa CHS, EC

2.3.1.74), o un estilbeno (estilbeno sintasa STS, EC 2.3.1.95), que producen el plegamiento y ciclación de la cadena lateral elongada.

- **Producción biotecnológica**

Los primeros estudios sobre ingeniería genética del resveratrol estaban enfocados hacia su capacidad como agente antimicrobiano. La expresión del gen de uva para STS en hojas de tabaco derivaba hacia esta proteína los sustratos típicos de CHS e incrementaban notablemente la síntesis de resveratrol (Hain *et al.*, 1993) las plantas transgénicas exhibían resistencia frente a *Botrytis cinerea*, lo que sugería que la expresión heteróloga de la fitoalexina sería tóxica para patógenos que no habían desarrollado mecanismos de resistencia.

La expresión del gen para STS era conducida por promotores constitutivos, como CMV (cauliflower mosaic virus) 35S, lo que se traducía en una acumulación de resveratrol en toda la planta, o por promotores específicos de tejidos, lo que dirigía la acumulación del estilbeno a órganos específicos. Es interesante constatar que el resvetratrol que se produce en estas plantas transgénicas, incapaces de producirlo antes de la transformación, normalmente suele conjugarse a glucosa, lo que indica que estos huéspedes extraños secuestran el tóxico en el interior de sus vacuolas para evitar daños celulares.

Cuando se analizan compuestos relacionados, productos de una PKS-III alternativa, se observa que la sobre-expresión de STS conduce a niveles reducidos de ácido ferúlico, rutina, quercetina y naringenina, lo que sugiere que, bajo un promotor fuerte, STS puede redirigir el flujo metabólico, alterando el perfil fenólico de la planta transgénica (Nicoletti *et al.*, 2007). Estos datos han sido confirmados para fresas (*Fragaria × ananassa*) transformadas con el gen *NS-Vitis3*, que codifica para STS en *Vitis riparia*, bajo control de los promotores CMV 35S y *FFSF1* (floral filament-specific fil1) que acumulan cinamato, cumarato y ferulato con un concomitante descenso en la acumulación de flavonoles (Hanhineva *et al.*, 2009).

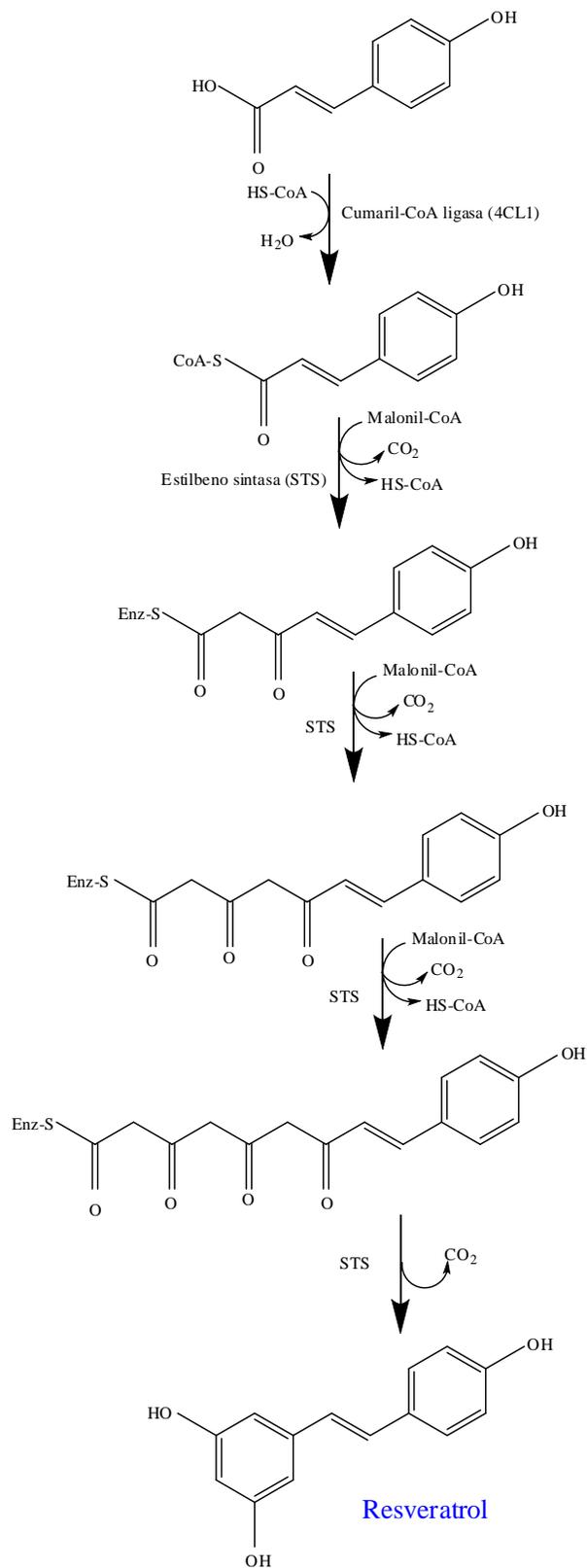
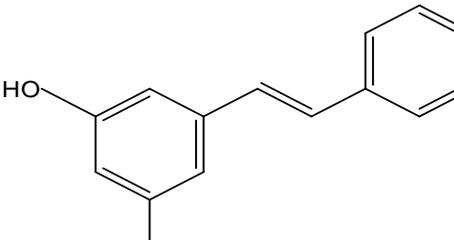
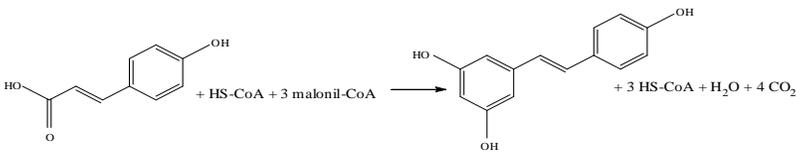


Figura 1. Biosíntesis de resveratrol en *Vitis vinifera*.

La sobre expresión del gen *STS* en *Saccharomyces cerevisiae* no ha dado resultados demasiado esperanzadores (Jung *et al.*, 2009). Sin embargo, sí se ha tenido éxito al desarrollar técnicas de ingeniería genética usando *E. coli*. La vía de producción del estilbeno fue construida en esta bacteria introduciendo en su genoma los genes para 4CL1 de *Arabidopsis thaliana* y el de STS clonado de *Arachis hypogaea*. Los cultivos de *E. coli* que expresaban ambas enzimas convertían *p*-cumarato en resveratrol con un rendimiento superior a los 100 mg L⁻¹, mientras que la inclusión de ácido cafeico en los medios de cultivo producía el análogo esperado, piceatanol, con un rendimiento superior a los 10 mg L⁻¹. Sin embargo, el ácido ferúlico no fue convertido en estilbeno (Watts *et al.*, 2006). Buenos resultados en la producción biotecnológica de resveratrol junto con otro estilbeno, pinosilvina, se han obtenido también utilizando un transgénico de *Streptomyces venezuelae* modificado mediante la introducción de un plásmido que expresa el gen para 4-cumarato/cinamato:coenzima A ligasa de *Streptomyces coelicolor* (ScCCL) y un gen de STS de *A. hypogaea* (Park *et al.*, 2009).

Ficha de resveratrol (elaboración por los alumnos), correspondiente a la acción c)

Producto	Resveratrol (3,4',5-trihidroxi- <i>trans</i> -estilbeno)
Fuente	<i>Vitis, Arachis, Fragaria</i>
Estructura química	
Biosíntesis	<p>A. <i>p</i>-cumárico + HS-CoA + 3 malonil-CoA → resveratrol + 3 HS-CoA + H₂O + 4 CO₂</p> 
Aplicaciones	Enfermedades cardiacas y oncogénicas, obesidad, alargamiento de la vida.
Producción Biotecnológica	Inserción del gen STS de <i>Vitis</i> o <i>Arachis</i> en <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptomyces venezuelae</i>

Propuesta de problemas por el profesor, correspondiente a la acción d)

Se han construido dos cepas transgénicas de *E. coli* con el fin de producir flavonoides estructuralmente relacionados con estilbenos por vía fermentativa. La primera de ellas, pET-P T7-3GS, contiene un cluster biosintético que incluye *PAL*, que codifica fenilalanina amonioliasa de levadura, *ScCCL*, que codifica cinamato/cumarato CoA ligasa de *Streptomyces coelicolor*, y *CHS*, que codifica para calcona sintasa de una planta aromática. En la segunda cepa se ha insertado, además de los tres genes anteriores, el gen *CHI*, que codifica para calcona isomerasa de *Pueraria*. Ambas cepas producen S-naringenina, el isómero natural de este flavonoide, aunque en ciertas condiciones podrían formarse por vía no enzimática, una mezcla racémica SR (Fig. 2).

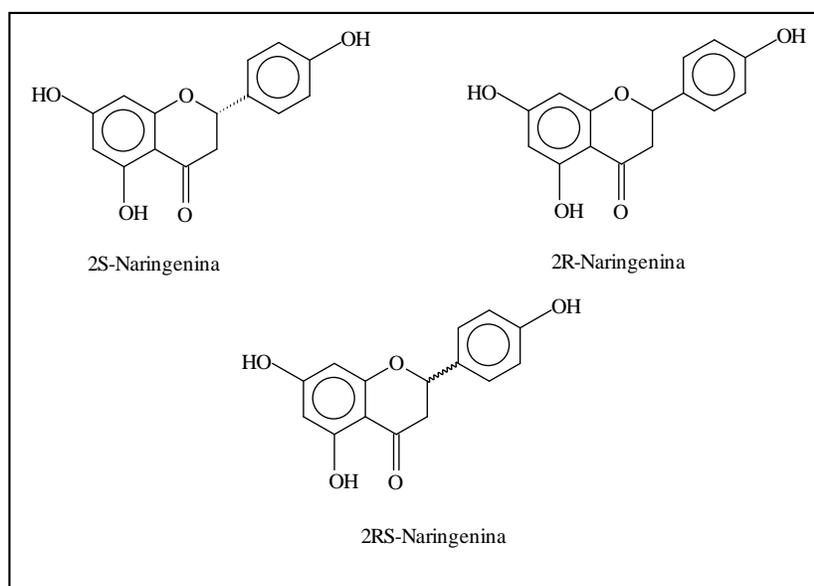


Fig. 2. Estructura química de los isómeros de naringenina.

La separación de los productos finales de ambas cepas mediante HPLC quiral, así como la de una mezcla racémica preparada por catálisis no enzimática, proporciona los resultados que se especifican en la Fig. 3. El pico a 35 min ha sido inequívocamente reconocido como S-naringenina, por lo que, por comparación con el cromatograma de la mezcla racémica, el pico a 40 min debería ser el isómero R.

Se **pregunta**:

- 1º ¿Son completamente funcionales ambos clones en la producción de naringenina?
- 2º ¿Por qué la cepa transgénica pierde capacidad de producción del isómero R-naringenina?

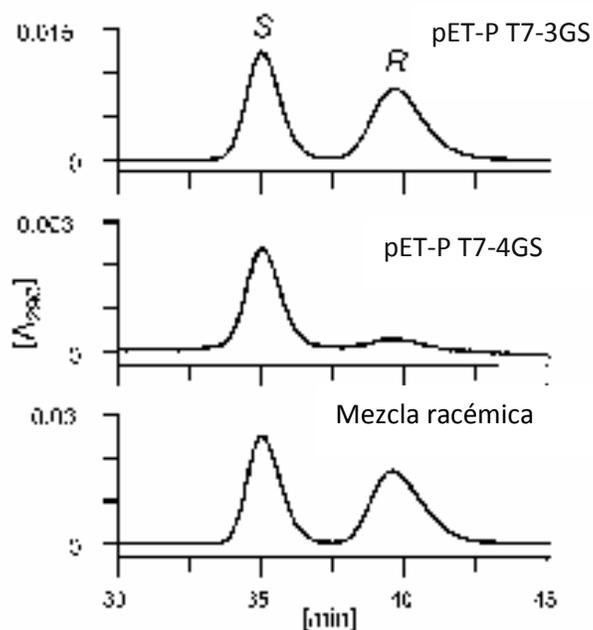


Figura 3. HPLC quiral de los isómeros de naringenina producidos por dos cepas transgénicas de *E. coli* y de una mezcla racémica.

Propuesta de problemas por el alumno correspondiente a la acción e)

La existencia de una isomería SR de naringenina en los productos de la cepa pET-P T7-3GS de *E. coli* a la que alude el problema anterior radica principalmente en la mitad de la molécula del flavonoide, derivada del *p*-cumaril-CoA. Cabría preguntarse entonces si en estos transgénicos podría modificarse el rendimiento en la producción de naringenina por modificación del resto de la molécula derivada del malonil CoA. Para ello, se ha utilizado una tercera cepa a la que se le ha adicionado doble dosis del gen para la acetil CoA carboxilasa de *Corynebacterium glutamicum*, valorándose entonces la producción de naringenina y el consumo de glucosa del medio de cultivo.

Los resultados se expresan en la grafica de la figura 4.y se pregunta:

- a) ¿Existe la posibilidad de que la glucosa sea utilizada por la bacteria transgénica para aumentar la población de malonil CoA, disponible para la síntesis de flavonoides?
- b) ¿Cómo alteraría dicha síntesis un aporte suplementario de acetato al medio de cultivo?

Para la elaboración de ambos problemas, se ha utilizado como fuente bibliográfica el trabajo de Miyahisa *et al.* 2005.

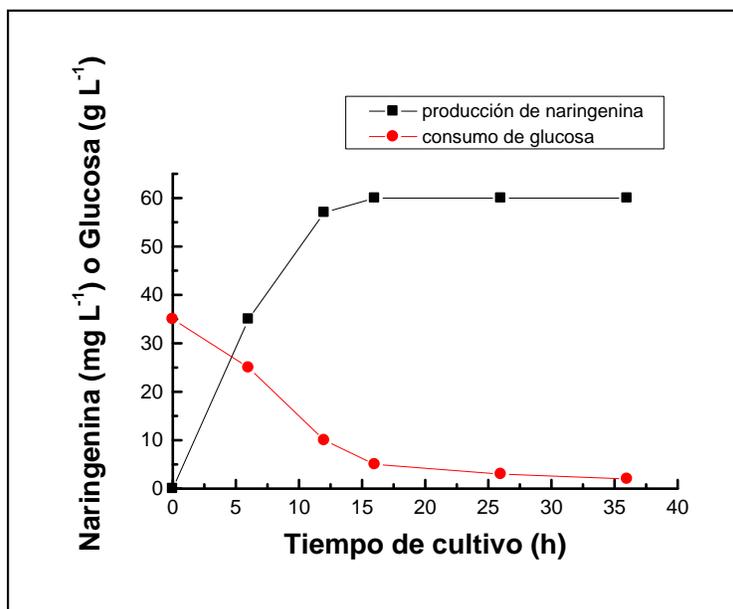


Figura 4. Valoración de la producción de naringenina y el consumo de glucosa del medio de cultivo.

CONCLUSIONES

La metodología que se ha expuesto en este ensayo se ha ido desarrollando paulatinamente a lo largo de 15 cursos consecutivos, corrigiendo errores, cambiando enfoques, mejorando los procedimientos. La media de alumnos que eligen esta asignatura (ya que se trata de una materia optativa de 5º curso, primer cuatrimestre, de 3 créditos teóricos y 1,5 créditos prácticos) ha sido de 77, nunca menos de 60, nunca más de 105. Durante todos estos años, tanto el programa teórico, que ha sufrido sucesivas ampliaciones, como el programa práctico se han cumplido en su totalidad. Cada curso, los alumnos han resultado en clase 35 problemas propuestos por el profesor, han propuesto 12-15 problemas elaborados por ellos mismos y han realizado 16 fichas-resumen de diferentes productos. Dado que estas dos últimas acciones son complementarias y no influyen en la calificación final, el índice de participación en las mismas, que osciló entre 75-82%, puede considerarse extraordinariamente alto. Este grado de participación indica claramente el interés y la aceptación que esta formación complementaria ha despertado entre el alumnado.

Con ellos tengo contraída una enorme deuda de gratitud. Sin su participación activa, sin su actitud crítica, sin su interés constante, esta asignatura no sería hoy lo que es. Como también es grande mi gratitud hacia los profesores que han colaborado en su desarrollo y, de una manera muy particular, a los becarios de Formación del Personal Investigador, que jamás han negado su ayuda cuando se les necesitó.

BIBLIOGRAFÍA

- Albert, A. 1997. Introducción a la Biotecnología. En Libro Verde de la Biotecnología en la Agricultura (Editado por la Sociedad Española de Biotecnología, pag. 13-26. SEBIOT, Madrid.
- Baur, J. A.; Pearson, K. J.; Price, N. L.; Jamieson, H. A.; Lerin, C.; Kalra, A.; Prabhu, V. V.; Allard, J. S.; Lopez-Lluch, G.; Lewis, K.; Pistell, P.J.; Poosala, S.; Becker, K.G.; Boss, O.; Gwinn, D.; Wang, M.; Ramaswamy, S.; Fishbein, K.W.; Spencer, R.G.; Lakatta, E.G.; Le Couteur, D.; Shaw, R.J.; Navas, P.; Puigserver, P.; Ingram, D.K.; de Cabo, R. y Sinclair, D.A. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444: 337–342.
- Hain, R.; Reif, H.J.; Krause, E.; Langebartels, R.; Kindl, H.; Vornam, B.; Wiese, W.; Schmelzer, E.; Schreier, P.H.; Stöcker, R.H., y Stenzel, K. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 361: 153–156.
- Hanhineva, K.; Kokko, H.; Siljanen, H.; Rogachev, I.; Aharoni, A. y Kärenlampi, S.O. 2009. Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Experimental Botany*, 60: 2093–2106.
- Harikumar, K.B. y Aggarwal, B.B. 2008. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, 7/8: 1020-1035.
- Jung, J.C.; Lim, E.; Lee, Y.; Kang, J.M.; Kim, H.; Jang, S.; Oh, S. y Jung, M. 2009. Synthesis of novel *trans*-stilbene derivatives and evaluation of their potent antioxidant and neuroprotective effects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 3166–3174.
- Miyahisa, I.; Kaneko, M.; Funa, N.; Kawasaki, H.; Kojima, H.; Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. 2005. Efficient production of (2S)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 498–504.
- Nicoletti, I.; De Rossi, A.; Giovinazzo, G. y Corradini, D. 2007. Identification and quantification of stilbenes in fruits of transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by reversed phase HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3304–3311.

Park, S.R.; Yoon, J.A.; Paik, J.H.; Park, J.W.; Jung, W.S.; Ban, Y.H.; Kim, E.J.; Yoo, Y.J.; Han, A. R. y Yoon, Y.J. 2009. Engineering of plant-specific phenylpropanoids biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Biotechnology*, 141: 181–188.

Watts, K.T.; Lee, P.C. y Schmidt-Dannert, C. 2006. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 6: 22-31.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

De Rossi, A.; Giovinazzo, G. y Corradini, D. 2007. Identification and quantification of stilbenes in fruits of transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by reversed phase HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3304–3311.

Halls, C. y Yu, O. 2008. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. *Trends in Biotechnology*, 26: 77-81.

Recibido: 2 diciembre 2009.

Aceptado: 15 enero 2010.