

TEMA 11. Productos orgánicos producidos por biotecnología

Bibliografía: Biotecnología Muñoz de Malajovich 2Ed. Cap 6, 10, 15

Materias primas fermentables

<i>Sector</i>	<i>Materia prima</i>	<i>Composición</i>	<i>Aplicaciones</i>
Azúcar y almidón	Caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo sacarino, trigo, maíz, papa, arroz, mandioca, etcétera	Azúcar, almidón, melaza	Solventes, productos farmacéuticos, adhesivos, resinas, polímeros, selladores, limpiadores, etanol
Aceites vegetales	Canola, soja, coco, girasol, dendé, grasas de origen animal	Triglicéridos, ácidos grasos, glicerol	Surfactantes para jabones y detergentes, ingredientes inactivos para productos farmacéuticos, tintas, pinturas, resinas, cosméticos, ácidos grasos, lubricantes, materiales de construcción
Madera	Pino, eucalipto	Celulosa, papel y lignina	Materiales de construcción, fibras, polímeros, resinas, adhesivos, pinturas, revestimientos, tintas, piche

<i>Metabolitos primarios</i>	
Alcoholes y solventes	Etanol, butanol, acetona, glicerol, manitol
Ácidos orgánicos	Ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético, ácido glucónico, ácido itacónico, ácido málico, ácido tartárico, ácido pirúvico, ácido succínico
Aminoácidos	Ácido L-glutámico (monoglutamato de sodio), L-lisina, L-fenilalanina, ácido L-aspártico, L-carnitina
Polisacáridos	Xantano, dextrano, pululano, gelana, agar, alginatos, carrageninas
Nucleótidos e nucleósidos	Ácido guanílico (5'GMP) y ácido inosínico (5'IMP)
Vitaminas	Vitamina B ₂ (riboflavina), vitamina C (ácido L-ascórbico), vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)
Colorantes	β-caroteno, astaxantina, ficocianina, monascina

La producción de ácido cítrico se debe casi exclusivamente al cultivo del hongo filamentoso *Aspergillus niger*, en diversos tipos de procesos fermentativos (cultivo de superficie en medio sólido, cultivo sumergido en medio líquido). El ácido cítrico es utilizado en la industria de alimentos como aditivo (acidulante y antioxidante), en cosmética como regulador del pH y en la industria farmacéutica como anticoagulante y componente de tabletas efervescentes.

En relación al ácido acético, los procesos industriales modernos también dependen de la acción bacteriana (géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter*). Además de tener muchos usos, el ácido acético es un precursor de varias moléculas intermediarias, como el anhídrido acético

El ácido láctico es obtenido por fermentación bacteriana (*Lactobacillus*) o fúngica (*Rhizopus oryzae*) y es un importante insumo en las industrias de alimentos, fármacos y cosméticos. También es utilizado como monómero en la síntesis del ácido poliláctido (PLA), un polímero biodegradable.

La vía fermentativa es utilizada para producir varios aminoácidos. La bacteria *Corynebacterium glutamicum* sintetiza ácido glutámico, que es usado en la cocina oriental como aditivo (glutamato monosódico) para realzar el sabor de los alimentos.

El ácido aspártico y la fenilalanina se obtienen por inmovilización conjunta de *Escherichia coli* y *Pseudomonas dacunhae* en una columna de fermentación, o por una bacteria genéticamente modificada (*Escherichia coli*). Ambos aminoácidos son los componentes del edulcorante no calórico Aspartame

El xantano es un producto de fermentación de la bacteria *Xanthomonas campestris*

La mayor parte de las vitaminas son obtenidas industrialmente por vía sintética o extractiva. Sin embargo, la vía fermentativa es ventajosa en el caso de la riboflavina (vitamina B2) y del ácido ascórbico (vitamina C) y la única posible para la cianocobalamina (vitamina B12),

<i>Metabolitos secundarios</i>	
Moléculas para la salud humana y animal	Antibacterianos, antivirales, antifúngicos, antihelmínticos, antitumorales, sueros, inmunoglobulinas, vacunas, inmunosupresores, estatinas, etcétera
Moléculas para la agricultura	Insecticidas y pesticidas, factores de crecimiento vegetal
Moléculas para la industria de alimentos	Condimentos y aromatizantes para la industria alimentaria

Enzimas

<i>Enzimas</i>	<i>Origen</i>
Amilasas	Malta de la cebada
Papaína	Papaya
Ficina	Higo
Bromelina	Ananá (piña)
Pepsina	Estómago de porcinos
Pancreatina (amilasas, proteasas y lipasas)	Páncreas de porcinos
Renina	Cuarto estómago de terneros
Catalasa	Hígado o sangre de bovinos

Desde el punto de vista económico, no es conveniente determinar o redimensionar los parámetros de la producción industrial cada vez que se descubre un microorganismo productor de una enzima interesante.

Resulta más ventajoso transferir la secuencia codificadora de esa enzima a un microorganismo cuyos requerimientos para el cultivo en condiciones industriales estén bien estudiados, como *Escherichia coli*, *Streptomyces* o *Bacillus subtilis* (bacterias), *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Kluyveromyces* (levaduras y hongos).

La lactasa hidroliza la lactosa y puede extraerse de bacterias, levaduras u hongos. Las condiciones óptimas de funcionamiento son, respectivamente, 40 0C, 37 0C y 55-60 0C para la temperatura, y 3,0-4,0, 7,2 y 6,6 para el pH. La elección de una u otra dependerá de las condiciones exigidas por el bioproceso.

El costo de una enzima también depende de las dificultades técnicas encontradas en la extracción y la purificación, que son las etapas *downstream* de un bioproceso. Las enzimas más baratas suelen ser las extracelulares como, por ejemplo, algunas hidrolasas (amilasas, proteasas y celulasas). Las más caras son las enzimas intracelulares, porque requieren métodos de purificación más complejos y son utilizadas como fármacos o en pruebas de diagnóstico.

Producción de etanol

FIGURA 1. Materias primas posibles para la producción de etanol

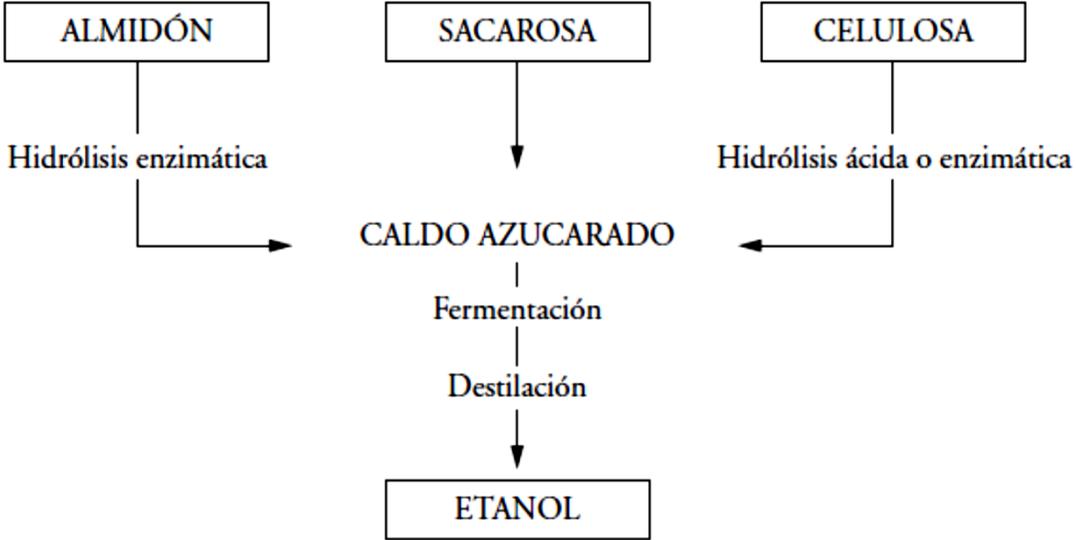
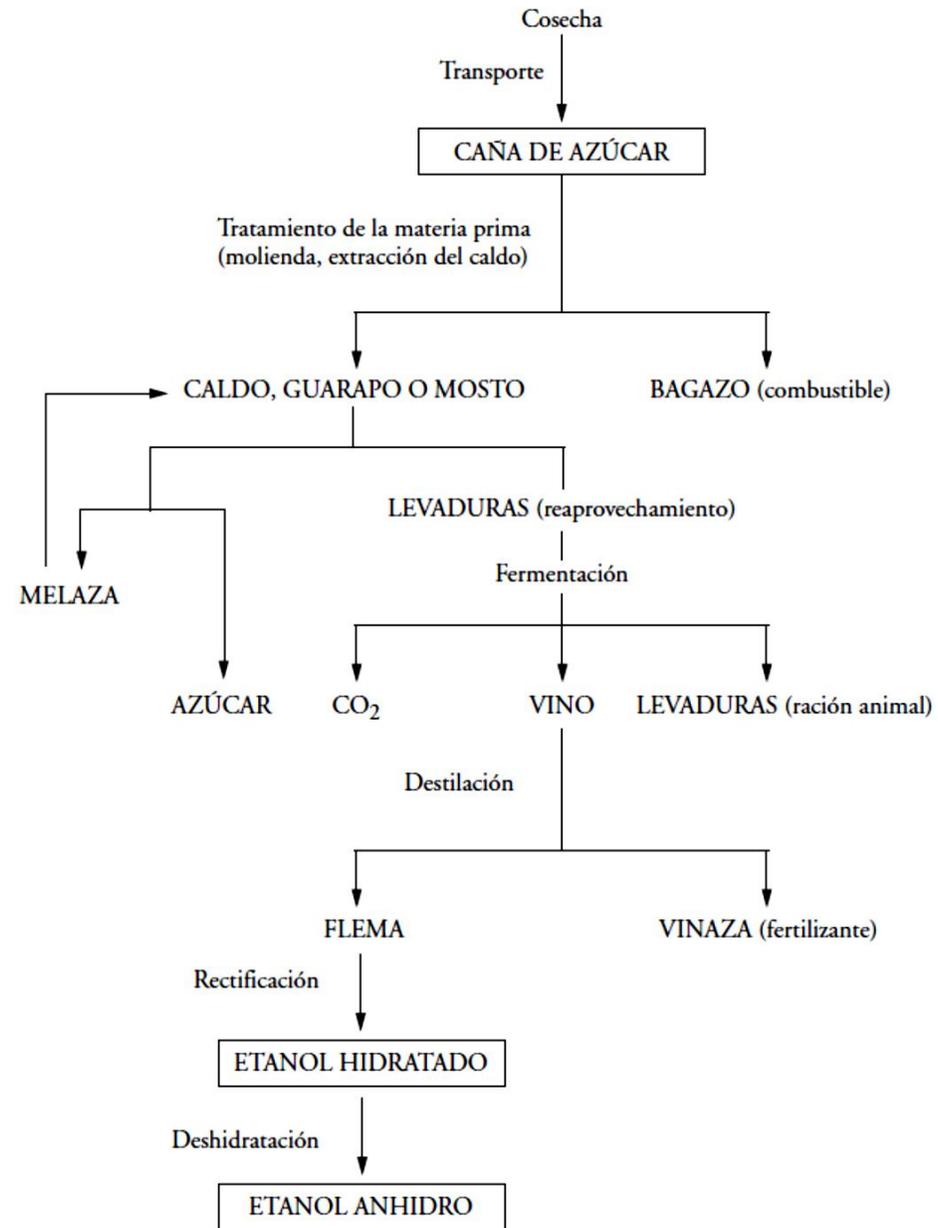
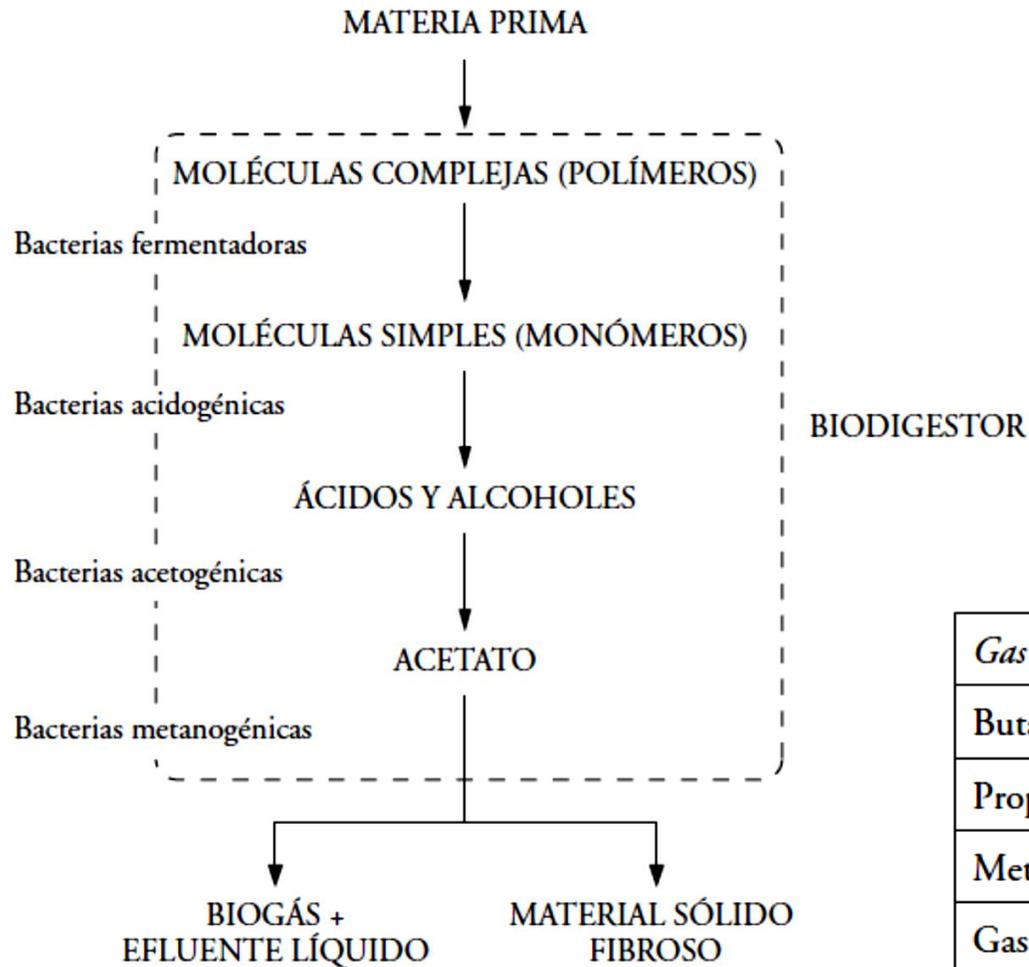


FIGURA 2. Las principales etapas de la producción de etanol por fermentación

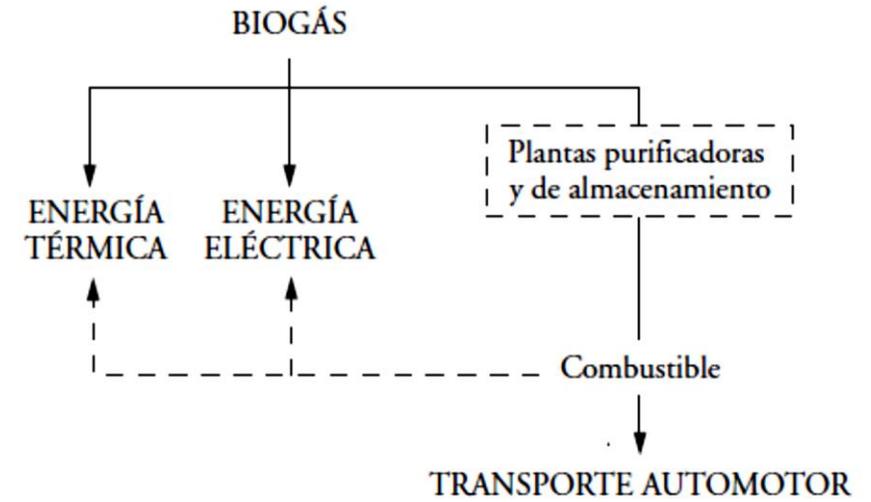


Producción de biogás

Las principales etapas, dentro del biodigestor



El uso del biogás



Gas	Poder calorífico (kcal/m ³)
Butano	28.000
Propano	22.000
Metano	8.500
Gas natural	7.600
Biogás	5.500
Gas de ciudad	4.000

Producción de levadura de panadería

Bibliografía: Microbiología Industrial OEA
(Merchuck, Yantorno, Ertola y otros) Cap 8

Levaduras de varios tipos: *Saccharomyces uvarum*, *syn S. carlsbergensis*, el *Saccharomyces cerevisiae*. También se puede usar *Candida*, *Hansenula* y *Zygosaccharomyces*.

El que mejor funciona es *S. cerevisiae* y ha sido muy difícil obtener cepas mejoradas genéticamente

Fuentes de carbono y energía que pueden emplear el *Saccharomyces cerevisiae* figuran en primer lugar la glucosa y la sacarosa, aunque también pueden emplearse fructuosa, galactosa, maltosa y suero hidrolizado, ya que la levadura de cerveza no puede asimilar lactosa. También puede utilizarse etanol como fuente de carbono.

El nitrógeno asimilable debe administrarse en forma de amoníaco, urea o sales de amonio, aunque también se pueden emplear mezclas de aminoácidos. Ni el nitrato ni el nitrito pueden ser asimilados.

El fósforo que se emplea comunmente en forma de ácido fosfórico y el Mg como sulfato de magnesio, que proporciona azufre. También hacen falta Fe, Ca, Cu y Zn además de vitaminas del grupo B como biotina, ácido pantoténico, inositol, tiamina, pyridoxina y niacina.

Y x/s = 0,5 g de levadura seca por g de glucosa,

Temp: 28,5 °C

Medio industrial

	Melaza de Caña	Melaza de Remolacha
Materia seca	75%	74-78%
Azúcares totales	48 - 56%	48 - 57%
Materia orgánica no azúcares	9 - 12 %	12 - 17%
Cenizas sulfatadas	10 - 15%	10 - 12%
<i>Vitaminas (mg Kg⁻¹)</i>		
Biotina	1.2 - 3.2	0.4 - 0.13
Acido fólico	0.04	0.2
Inositol	6,000	5,800 - 8,000
Pantotenato de Ca	54 - 64	50 - 100
Piridoxina	2.6 - 5	5.4
Riboflavina	2.5	0.4
Tiamina	1.8	1.3
Acido nicotínico	30 - 800	20 - 45
Colina.....	600 - 800	400 - 600

La mejor forma de trabajar es usar ambas melazas combinadas, previamente clarificadas
 Hay que suplementar la fuente de Nitrógeno, Fósforo, S y Mg. A veces Zn.

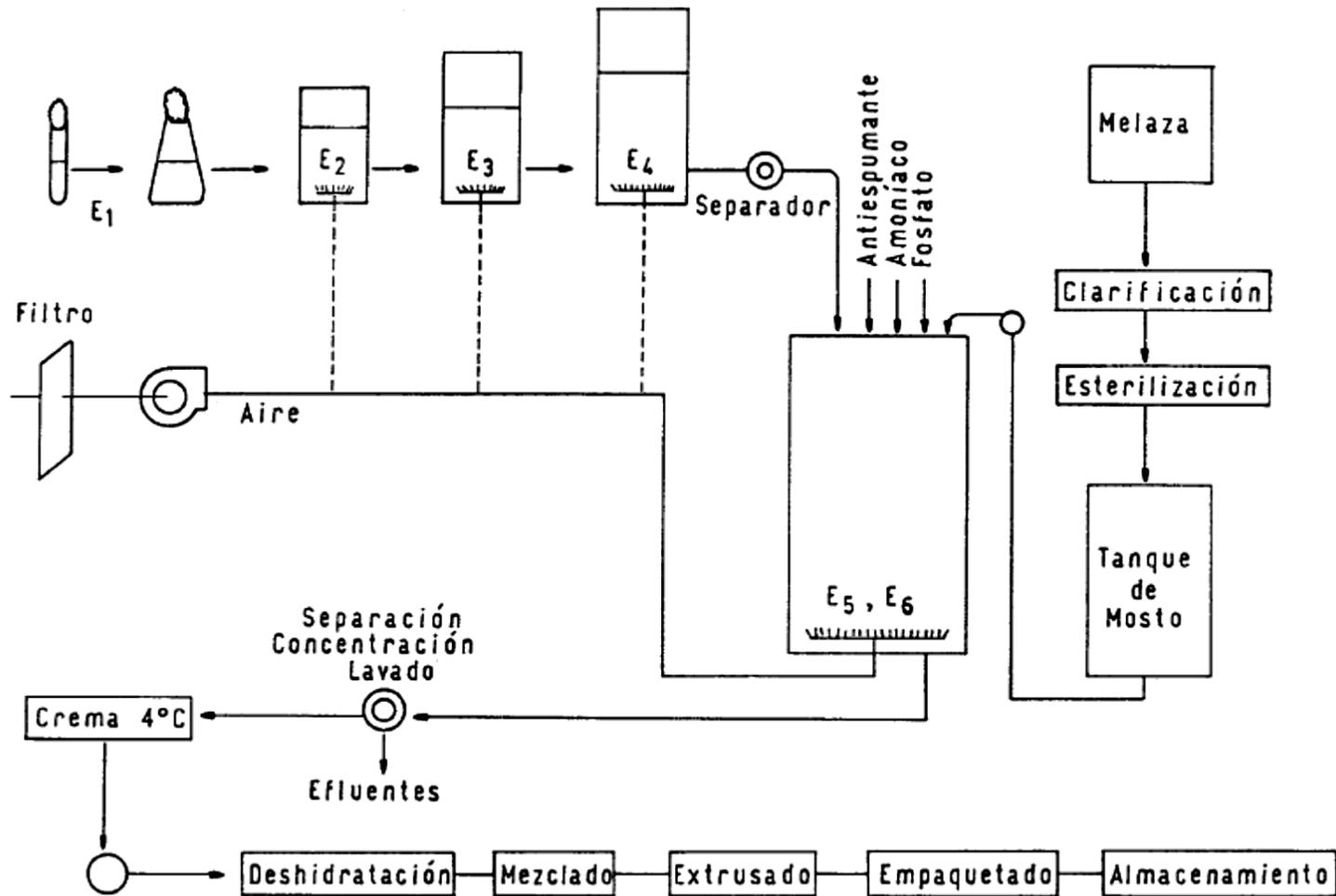


Figura 21. Esquema de la producción de levadura prensada.

Penicilina

Los antibióticos son por definición moléculas con actividad antimicrobiana, que incluyen una gran cantidad de compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas. Son metabolitos secundarios, producidos en la mayoría de los casos después de la fase de crecimiento.

Penicillium chrysogenum

El empleo de técnicas de mejoramiento genético permitió entonces el aumento de rendimientos y la obtención de nuevas cepas que no producen pigmentos, lo cual ha sido de gran importancia en las etapas de extracción y purificación.

Además de glucosa y lactosa, *Penicillium chrysogenum* puede utilizar una gran variedad de fuentes de carbono y energía. Alternativamente se han usado sacarosa, almidón, dextrinas, melaza, aceites vegetales y animales, etanol y glicerol.

Temp: 25 a 29 °C

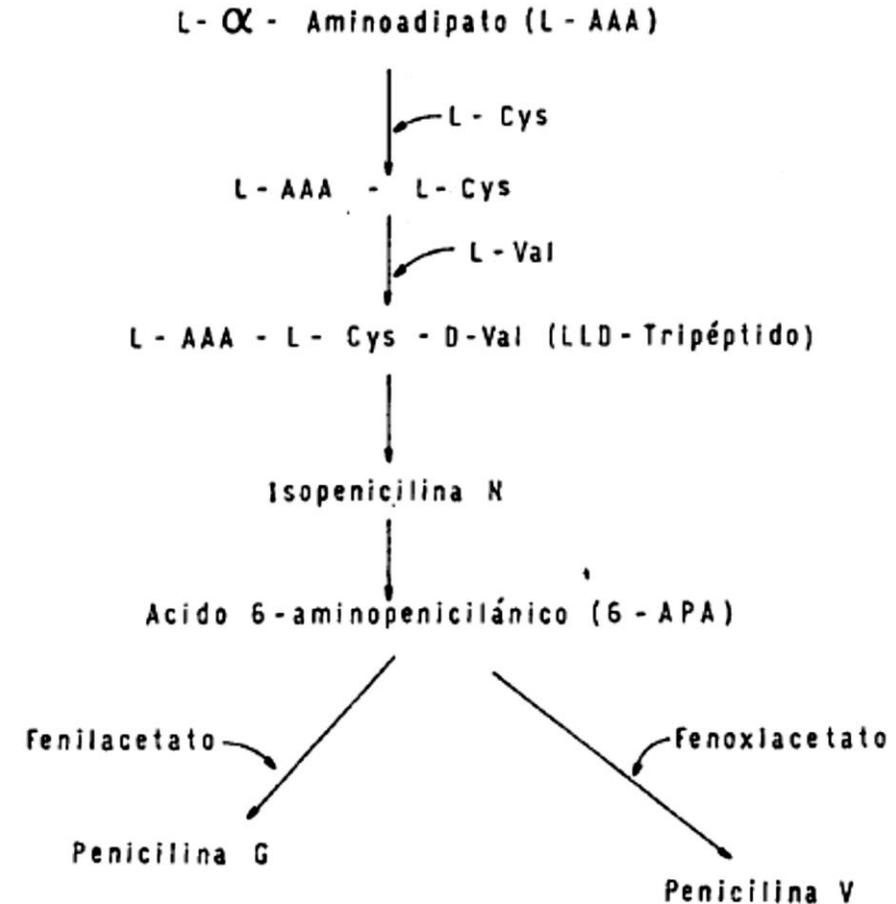


Figura 23. Ruta biosintética de la formación de penicilina en *P. chrysogenum*.

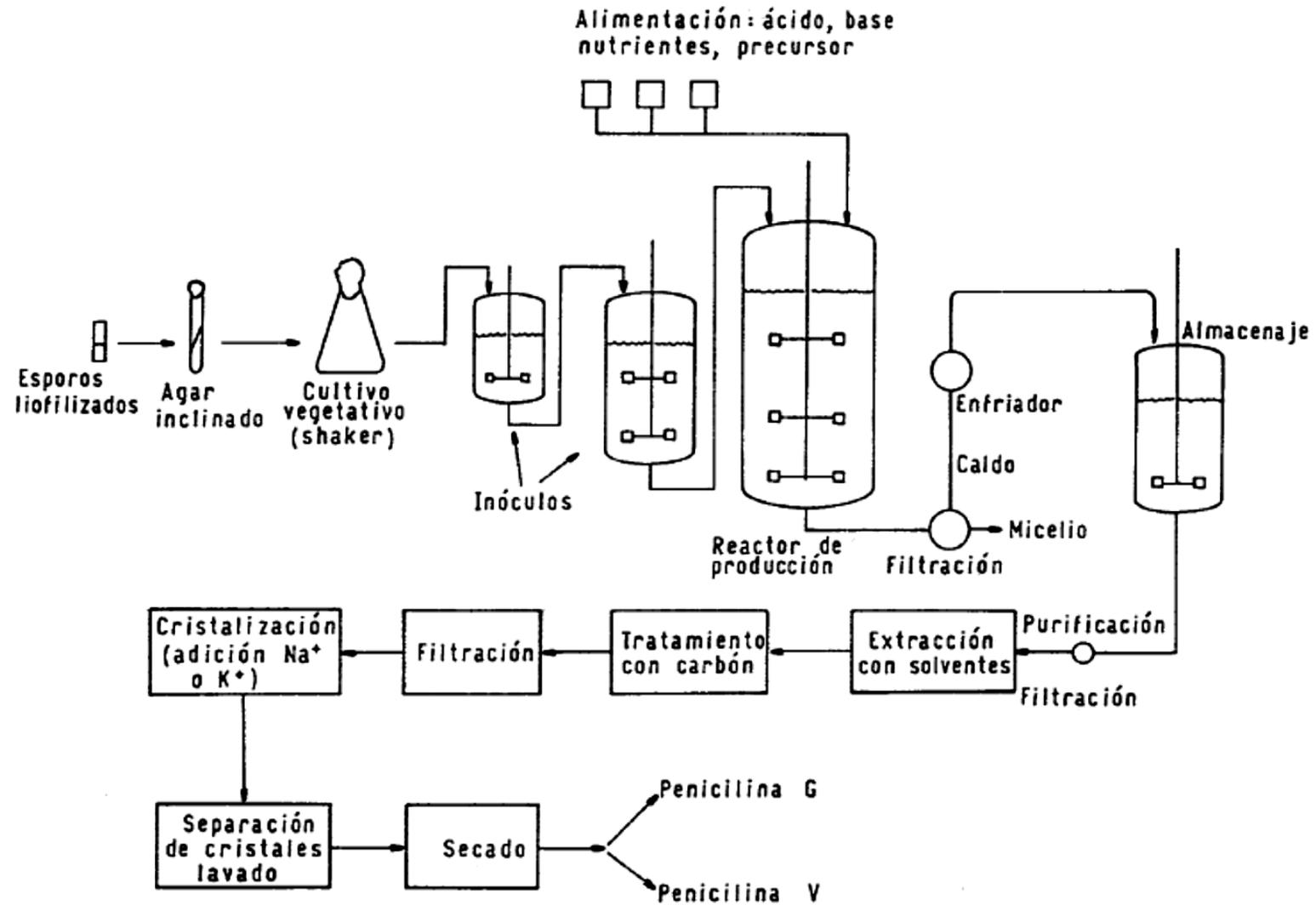


Figura 26. Esquema de la producción de penicilina.

Antibiótico	Fuente microbiana	Usos habituales del antibiótico
Bacitracina	<i>Bacillus subtilis</i> (bacteria)	Pomada de primeros auxilios y cremas faciales
Eritromicina	<i>Streptomyces erythraeus</i> (bacteria)	Cuenta con numerosas utilidades para tratar infecciones bacterianas, especialmente en niños
Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i> (bacteria)	Antibiótico oral para tratar infecciones bacterianas en niños
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i> (bacteria)	Pomadas faciales y otras cremas
Penicilina	<i>Penicillium notatum</i> (hongo)	Antibiótico inyectado u oral usado en humanos y animales de granja (ganado bovino y porcino)
Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i> (bacteria)	Usado para tratar infecciones del tracto urinario en humanos; se suele utilizar en la alimentación animal para reducir las infecciones y estimular la ganancia de peso

Producción de insulina recombinante en bacterias

Bibliografía: Introducción a la Biotecnología. Thieman Paladino pág 131-133

Por lo general, las bacterias no producen insulina, por tanto el hecho de que las bacterias recombinantes produjeran insulina humana supuso un avance significativo. La insulina fue la primera proteína expresada en bacterias recombinantes cuyo uso fue aceptado en humanos.

La insulina consiste en dos cadenas proteicas (A y B) producidas a partir de genes separados. Para fabricar insulina recombinante los científicos clonaron los genes de insulina en plásmidos que contenían el gen *lacZ*, el cual codifica la enzima beta-galactosidasa (β -gal). Los plásmidos recombinantes fueron utilizados para transformar las bacterias, ya que permitían que éstas produjeran proteínas de fusión de insulina β -gal. La cromatografía por afinidad se utilizaba para aislar las proteínas de fusión, y éstas eran posteriormente tratadas químicamente para separar la insulina clonada de las proteínas β -gal. Las formas purificadas de las cadenas proteicas de insulina A y B podían en ese momento combinarse para formar insulina activa. Esta es la que se proporciona a las personas con diabetes para controlar los niveles de azúcar en sangre.

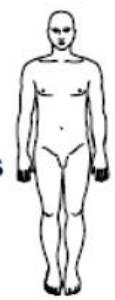
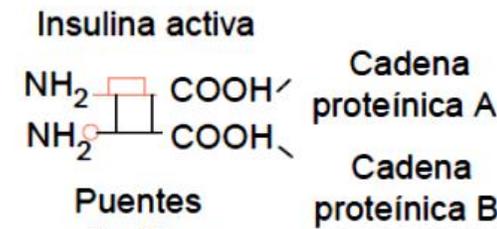
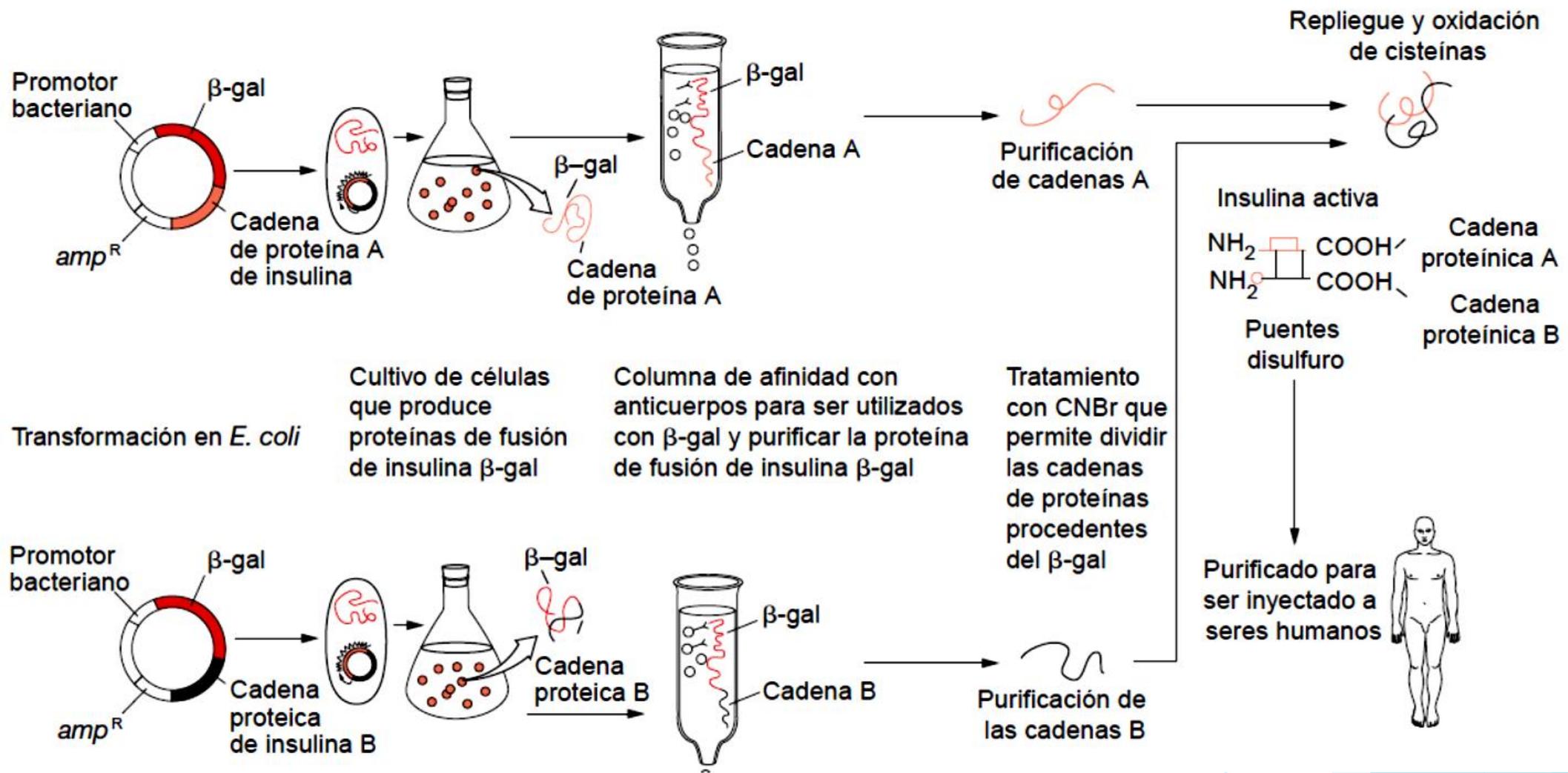


Tabla 5.1 PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS PROCEDENTES DE BACTERIAS RECOMBINANTES

Proteína	Función	Aplicaciones médicas
Activador tisular del plasminógeno (tPA)	Disuelve los coágulos de sangre	Se usa para tratar a pacientes que sufren infartos de miocardio y víctimas de accidente cerebrovascular
DNasa	Enzima que digiere el DNA	Tratamiento de pacientes con fibrosis quística
Eritropoyetina	Estimula la producción de glóbulos rojos (poca cantidad de glóbulos rojos)	Se usa para tratar a pacientes con anemia
Factor VIII (enfermedades con hemorragia)	Factores de coagulación de la sangre	Se usa para tratar ciertos tipos de hemofilia (enfermedades con hemorragia debido a deficiencias de los factores de coagulación de la sangre)
Factor estimulador de colonias de granulocitos	Estimula el crecimiento de glóbulos blancos	Se usa para aumentar la producción de ciertos tipos de glóbulos blancos y estimular la producción de células sanguíneas tras un trasplante de médula ósea
Hormona del crecimiento (humana, bovina, porcina)	La hormona estimula el crecimiento del hueso y el tejido muscular	Se usa en el hombre para tratar a pacientes con enanismo. Contribuye al aumento de peso en cerdos y vacas, y estimula la producción de leche en vacas

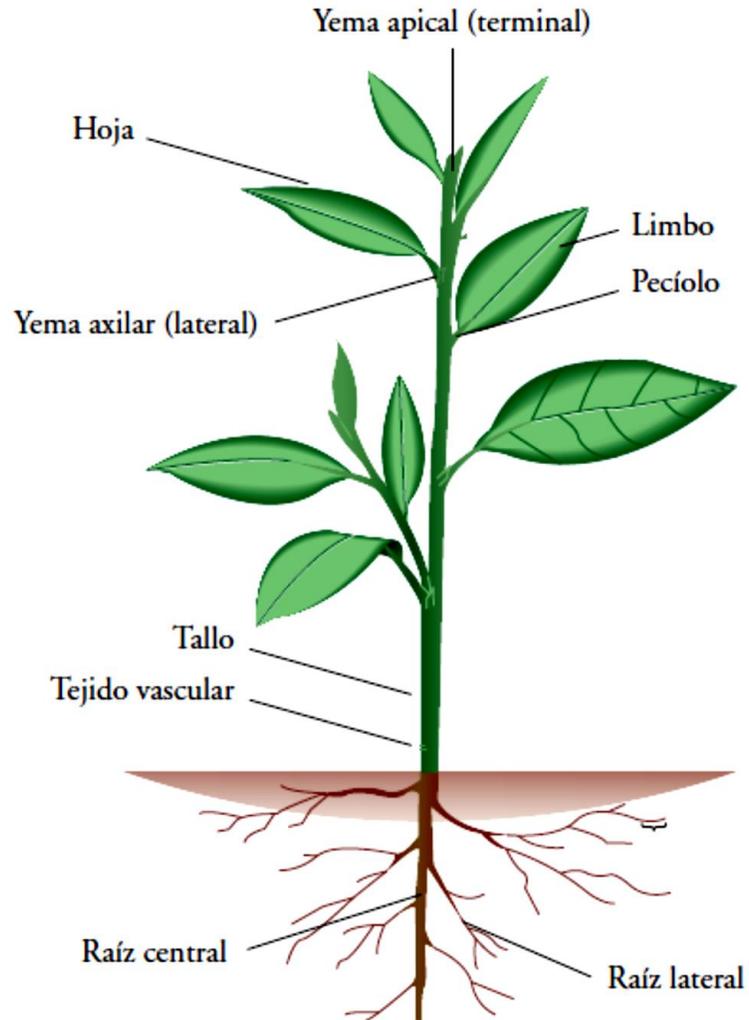
Tabla 5.1 PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS PROCEDENTES DE BACTERIAS RECOMBINANTES

Insulina	Hormona necesaria para la absorción de glucosa por parte de las células del organismo	Se usa para controlar los niveles de azúcar en sangre de pacientes con diabetes
Interferones e interleucinas	Factores de crecimiento que estimulan el crecimiento y la producción de células sanguíneas	Se usan para tratar cánceres sanguíneos como la leucemia, mejoran el recuento de plaquetas y algunas son utilizadas para tratar diferentes tipos de cáncer
Superóxido dismutasa radicales libres peligrosos	Antioxidante que une y destruye los de un infarto de miocardio	Minimiza el daño tisular durante y después
Vacunas (p. ej., vacuna contra la hepatitis B)	Estimulan el sistema inmunitario para prevenir infecciones bacterianas y virales patógenos. También se usa para tratar	Se usa para inmunizar a seres humanos y animales contra una gran variedad de algunos tumores cancerígenos

Micropropagación de vegetales

Bibliografía: Biotecnología Muñoz de Malajovich 2Ed. Cap 7

Morfología de una planta angiosperma



la micropropagación se inicia a partir de explantos, es decir, pequeños fragmentos de tejido extraídos de diversas partes de la planta, tales como hojas, raíces, segmentos nodales y yemas axilares, florales y apicales.

FIGURA 2. Obtención de un cultivo aséptico en el laboratorio

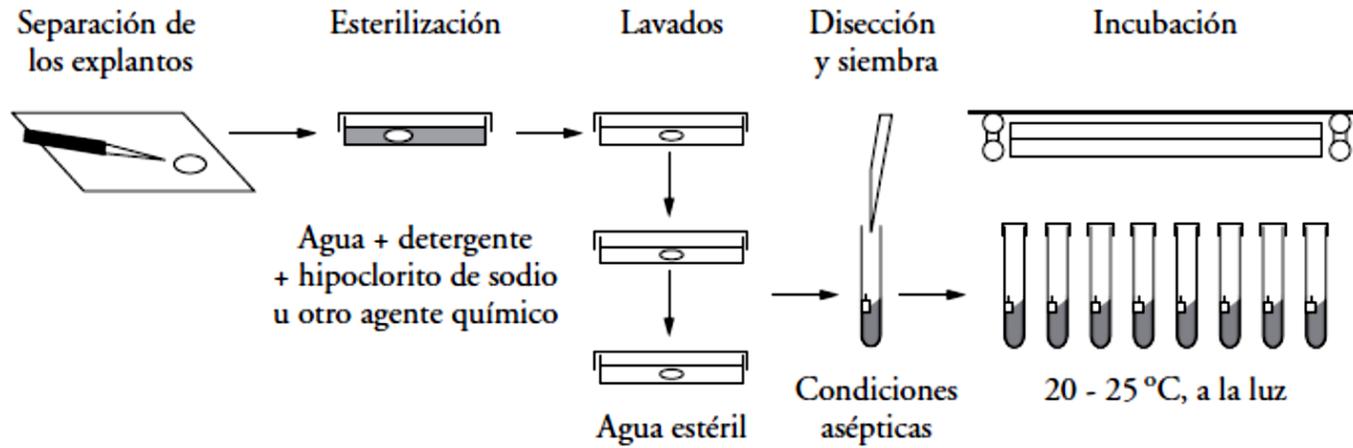
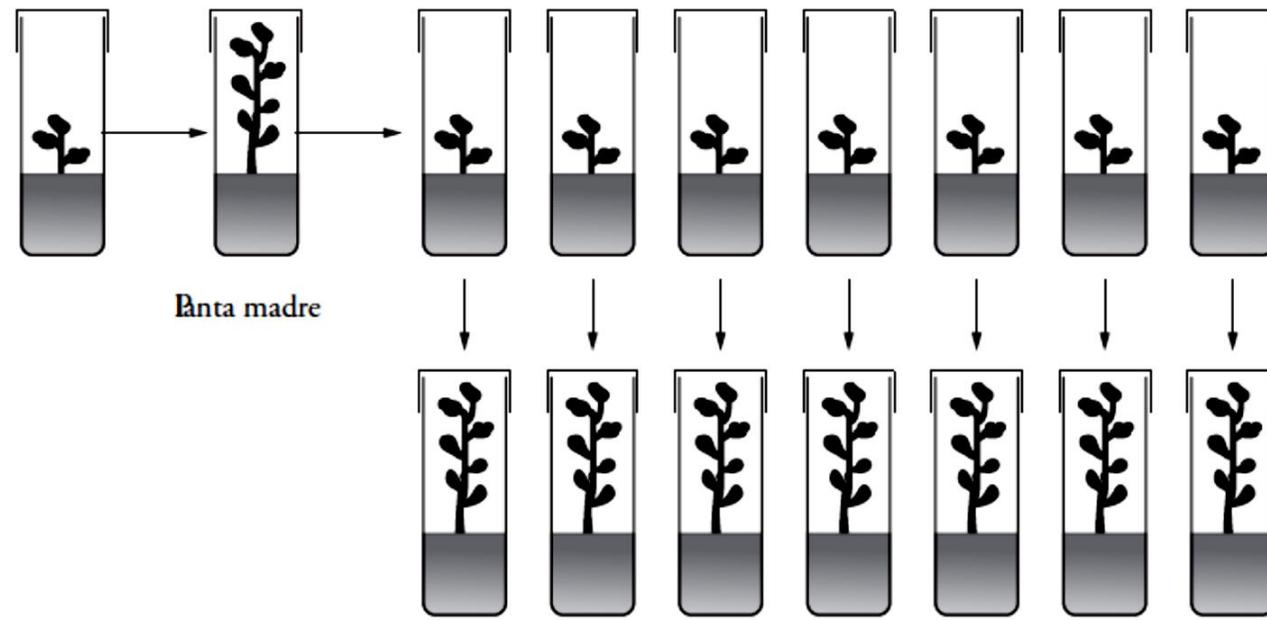


FIGURA 3. Micropropagación, por multiplicación de explantos nodales



Si un tubérculo de ñame (también llamado yame o batata de China) de 100 g produce 25 kg de tubérculos en dos años, por micropropagación producirá 300.000 kg. A partir de una yema apical se pueden obtener 4.000.000 de claveles en un año.

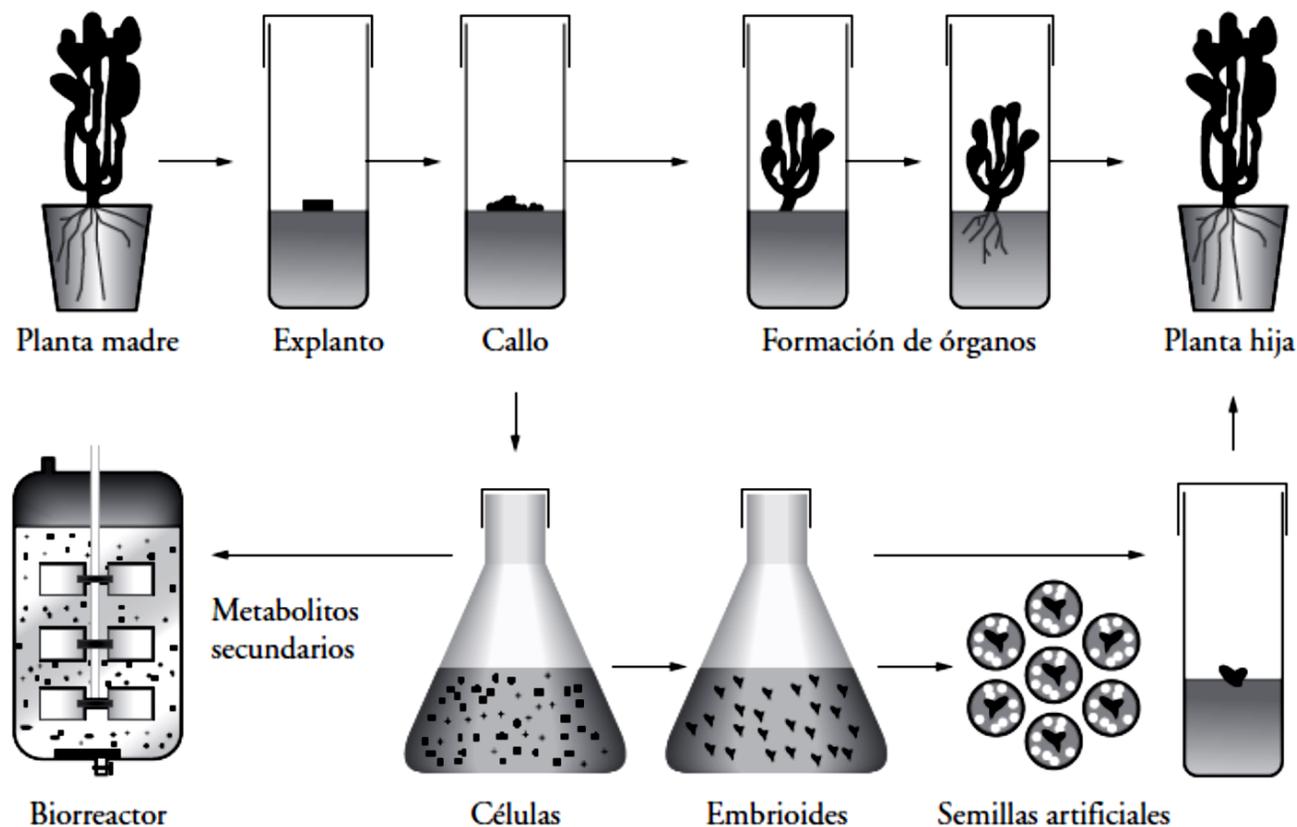
TABLA 1. Composición del medio de cultivo para células vegetales

<i>Componentes</i>	<i>Características y ejemplos</i>
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente
Fuente de carbono	Generalmente se utiliza sacarosa. La fuente de carbono es necesaria porque los explantos no son totalmente autotróficos y la fotosíntesis <i>in vitro</i> no supe las necesidades de las células
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción que depende de la planta elegida
Vitaminas	Mioinositol, vitamina B1 (tiamina), ácido nicotínico (niacina), vitamina B6 (piridoxina), pantotenato de calcio, ácido fólico, vitamina B2 (riboflavina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina H (biotina), ácido para-aminobenzoico y vitamina E (tocoferol)

<i>Componentes</i>	<i>Características y ejemplos</i>
Hormonas y reguladores del crecimiento	<i>Auxinas.</i> Promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, la embriogénesis en suspensiones celulares. Ejemplos: IAA (ácido indol acético), NAA (ácido naftaleno acético), IBA (ácido indol butírico), 2,4 D (2,4- diclorofenoxiacético) <i>Citoquininas.</i> Promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Ejemplos: quinetina, 2iP (2-isopentiladenina), BAP (benzilaminopurina), zeatina <i>Otras sustancias.</i> Ejemplos: giberelinas, ácido abcísico, etileno
Mezclas de sustancias poco definidas	Ejemplos: extracto de levadura, extractos vegetales, hidrolizados de caseína, peptona y triptona. La tendencia actual en investigación es la de reemplazarlos por medios de composición definida
Materiales inertes	Utilizados como soporte. Ejemplos: agar, agarosa, otros polisacáridos (Gelrite, Phytigel), lana de vidrio, papel de filtro, arena, esponjas de poliestireno

El cultivo de callos es el método alternativo para las plantas que pueden propagarse directamente a partir de meristemas. Un callo es una masa de células desdiferenciadas que prolifera de manera irregular a partir de un explanto. Se trata de un tejido de tipo tumoral que se produce *in vivo* como respuesta a las heridas sufridas por los órganos y tejidos

FIGURA 5. Diferentes posibilidades del cultivo de callos



Hay diversos modelos de biorreactores para el cultivo de células vegetales, entre los que se encuentran el tradicional de palas giratorias adaptadas para el cultivo de células vegetales y otros del tipo *air-lift* o de lecho fluido. El proceso puede ser discontinuo, semicontinuo o continuo. En este último caso se utilizan células inmovilizadas. La elección de la modalidad depende del producto ser intra o extracelular y estar o no asociado al crecimiento celular.