



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 344 775**

② Número de solicitud: 200803107

⑤ Int. Cl.:

C12P 7/22 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **31.10.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
06.09.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta, 5
Edificio Convalecencia
30003 Murcia, ES
Universidad de Alicante

⑦ Inventor/es: **Sabater Jara, Ana Belén;**
Almagro Romero, Lorena;
Bru Martínez, Roque y
Pedreño García, María Ángeles

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Uso de las ciclodextrinas para la producción y extracción de fitoesteroles en cultivos celulares.**

⑦ Resumen:

Uso de las ciclodextrinas para la producción y extracción de fitoesteroles en cultivos celulares.

Procedimiento para incrementar la producción y/o extracción de fitoesteroles estableciendo cultivos de células vegetales y adicionando al medio ciclodextrinas y, opcionalmente, jasmonato de metilo.

ES 2 344 775 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de las ciclodextrinas para la producción y extracción de fitoesteroles en cultivos celulares.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología y la farmacia, y se refiere a un procedimiento para incrementar la producción y extracción de fitoesteroles a partir de cultivos de células vegetales mediante la adición al medio de cultivo de ciclodextrinas y, opcionalmente, jasmonato de metilo.

Estado de la técnica anterior

10 Los fitoesteroles y los fitoestanoles (formas reducidas de los fitoesteroles) son compuestos derivados del escualeno cuya característica común es la presencia de un anillo esteral, diferenciándose en sus cadenas laterales. Su función principal es la de actuar como componentes estructurales, ya que son constituyentes de las membranas celulares vegetales, aunque algunos fitoesteroles presentan también una acción hormonal (Azcón-Bieto & Talón., 2000. Ed. McGraw-Hill).

15 Los fitoesteroles pertenecen a la familia de los triterpenos, son esteroides de origen vegetal, cuya estructura química es muy similar a la del colesterol, que se encuentran presentes en los frutos, semillas, hojas y tallos de prácticamente todos los vegetales conocidos (Ling & Jones, 2005. *Life Sci.* 57:195-206). Por este motivo, los incorporamos normalmente en nuestra dieta. Se estima que la ingesta promedio diaria de fitoesteroles se encuentra en un rango que va desde los 160 mg/día hasta los 500 mg/día. Los fitoesteroles químicamente identificados suman más de 25 estructuras diferentes, pero son sólo tres los que están en mayor proporción: el β -sitosterol (C29), el campesterol (C28) y el estigmasterol (C29), quienes en su conjunto constituyen el 95%-98% de los fitoesteroles identificables en extractos vegetales. Los fitoesteroles comparten con el colesterol el núcleo central de la molécula, la estructura ciclopentano perhidrofenantreno (D-5 insaturado, conservando el grupo -OH que sustituye el carbono 3 de la estructura cíclica). La diferencia estructural de los fitoesteroles con el colesterol radica en la cadena hidrocarbonada lateral. En el colesterol esta cadena está formada por ocho carbonos y es saturada. En los fitoesteroles, la cadena lateral es más larga (9 o 10 carbonos) y en algunos de ellos presenta un doble enlace (estigmasterol). Los fitoestanoles están en menor proporción que los fitoesteroles en el reino vegetal, se forman por la reducción del doble enlace de la posición D-5 de la estructura cíclica. Se ha propuesto que la diferencia estructural en la cadena lateral de los fitoesteroles y de los fitoestanoles con el colesterol es responsable de los particulares efectos hipocolesterolémicos.

20 Numerosas evidencias experimentales han demostrado que los esteroides vegetales tienen un importante efecto hipocolesterolémico, reduciendo tanto los niveles de colesterol total como los de colesterol ligado a proteínas de baja densidad (LDL) (Varady y cols., 2007. *Transl Res* 149: 22-30.). El efecto más y mejor estudiado de los esteroides vegetales es la inhibición de la absorción intestinal de colesterol, tanto el procedente de la dieta (300 mg/día) como el colesterol endógeno circulante en la bilis (100 mg/día) que, al ser parcialmente pero extensamente reabsorbido en el intestino, constituye la principal forma de captación. Los esteroides vegetales, al ser más hidrofóbicos que el colesterol, pueden competir con él y desplazarlo de las micelas de absorción, habiéndose demostrado, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, que se produce una disminución de la incorporación del colesterol en las micelas lo que se traduce en una disminución de la absorción intestinal de colesterol. A dosis elevadas de esteroides vegetales la absorción de colesterol disminuye un 30-50% (Ostlund & Lin, 2006. *Curr Atheroscler rep* 8: 487-491). Además, los esteroides vegetales podrían reducir la tasa de esterificación del colesterol en el enterocito (afectando a la actividad de las enzimas implicadas) y consecuentemente, de esta forma se reduciría la cantidad de colesterol exportado a la sangre en forma de quilomicrones. También se ha sugerido que, en presencia de esteroides vegetales, el colesterol que ya de por sí es poco soluble, puede aumentar la tasa de precipitación y por tanto desplazarse a una forma no- absorbible o menos absorbible.

25 Actualmente, se sabe que los fitoesteroles y fitoestanoles poseen propiedades inmunomoduladoras que podrían ser beneficiosas para la prevención del cáncer de colon (McCann y cols., 2003. *J Nutr.* 133:1937-1942), cáncer de mama (Awad y cols., 2000. *Anticancer Res.* 20(2A):821-824.), control de la hiperplasia prostática benigna (Awad y cols., 2001. *Eur J Cáncer Prev* 10(6):507-513) y daño tisular asociado a inflamación (Lowe & Ku, 1996. *Urology* 1996; 48:12-20).

30 Estudios recientes sugieren que una dieta rica en fitoesteroles puede ser fuertemente protectora contra estos tipos de cáncer, desencadenando respuestas como, aumento de la respuesta antitumoral, la inhibición del crecimiento tumoral; también afectan al ciclo celular y promueven la apoptosis a través de la inducción del metabolismo de esfingolípidos y la estimulación de la formación de ceramidas (Awad y cols., 2000. *Anticancer Res.* 20(2A):821-824). Además, los esteroides aumentan la respuesta celular de los linfocitos T tanto *in vivo* como *in vitro* (Bouic y cols., 1996. *Int J Immunopharmacol.* 18:693-700) y promueven la expresión o actividad de factores endógenos inhibidores de la angiogénesis, proceso necesario para el crecimiento de tumores y desarrollo de la metástasis (Quesada y cols., 2006. *Med. Res. Rev.* 26:483-530). Asimismo, los fitoesteroles también presentan acción antimicrobiana, antifúngica y antibacteriana (Ling & Jones, 1995. *Life Sci.* 57:195-206).

35 Los fitoesteroles más importantes, desde el punto de vista económico, son el β -sitosterol, el campesterol y el estigmasterol. En la actualidad, estos compuestos se obtienen mediante un proceso extractivo de la materia prima vegetal. Este proceso de extracción es de bajo rendimiento ya que a partir de 1.6 kg de hoja seca de *Pandanus tectorius* se obtienen 26.8 mg de una mezcla de estigmasterol y el β -sitosterol en una proporción 2:1 (Mario y cols., 2008. *J Nat*

Med. 62:232-235). Asimismo, a partir de 5 kg de fruto de banana se obtuvieron 325, 76, y 65 mg/kg de β -sitosterol, campesterol y estigmasterol respectivamente (Oliveira y cols., 2008. *J Agric Food Chem.* 56(20):9520-9524).

El cultivo *in vitro* constituye una alternativa a los métodos clásicos de extracción convencional a partir de materia prima vegetal y se trata de un área emergente y de gran potencial de crecimiento para la síntesis de compuestos bioactivos. El cultivo de células vegetales *in vitro* ha abierto nuevos caminos como fuente de obtención de compuestos bioactivos de gran valor añadido debido a las ventajas que presenta su utilización ya que estos cultivos son independientes de factores geográficos, estacionales y ambientales, reconocidos como sistemas de producción estables ya que aseguran la obtención continua de compuestos con calidad y productividad uniformes y los requerimientos de espacio para el desarrollo de la producción son reducidos. Además, el proceso de purificación del compuesto de interés es más fácil y se optimiza cuando éste se libera al medio de cultivo, la producción del compuesto se puede realizar a gran escala y, existe la posibilidad de obtener productos nuevos que no son sintetizados por las plantas de forma natural. La optimización de la producción de metabolitos incluye el establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo y el ajuste de los parámetros de crecimiento celular. Cuando además se quiere comercializar el producto a nivel industrial, es necesario realizar un escalado en sistemas que garanticen la producción elevada del metabolito de interés (en biorreactores) para alcanzar niveles económicamente rentables. Además, existen otros factores que incrementan la productividad entre los que destaca la elicitación del cultivo celular. Mientras que la planta responde a la presencia de elicitores sintetizando metabolitos de forma localizada allá donde se produce la interacción, el cultivo celular responde globalmente, ya que el *elicitor* entra en contacto con toda la biomasa. Por lo tanto, la cantidad total de metabolitos sintetizados es mucho mayor que en la planta y está en función de la biomasa de células *elicitada* (Bru y cols., 2006. *J Agr Food Chem.* 54(1):65-71).

Debido a las propiedades beneficiosas anteriormente descritas, desde 1997 se venden margarinas enriquecidas con fitoesteroles en Finlandia, y actualmente en varios países de Europa existen productos lácteos enriquecidos con los mismos. Además, desde septiembre del año 2000, la FDA ha autorizado declarar en los envases de los alimentos ricos en fitoesteroles, el beneficio que para la salud presenta su consumo en relación a un menor riesgo de enfermedades coronarias. Sin embargo, el coste de estos productos es elevado, y se estima que debido a la gran cantidad de materia vegetal necesaria para extraer una cantidad significativa de fitoesteroles con las fuentes naturales mundiales actuales sólo se podría abastecer a un 10% de la población occidental (Law 2000. *BMJ* 320:861-864).

Existe por tanto la necesidad de encontrar un método que mejore el rendimiento de extracción de fitoesteroles a partir de los recursos naturales, permitiendo que un mayor porcentaje de la población se beneficie de los efectos positivos que tienen dichos fitoesteroles sobre la salud.

35 Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción y extracción de fitoesteroles con rendimientos elevados. Los autores de la presente invención han observado que estableciendo cultivos de células vegetales y adicionando al medio ciclodextrinas y, opcionalmente, jasmonato de metilo, se incrementa el rendimiento de producción y extracción de fitoesteroles.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para incrementar la producción y/o extracción de fitoesteroles que comprende:

- 45 a) añadir ciclodextrinas a un medio de cultivo,
- b) poner en contacto células potencialmente productoras de fitoesteroles con el medio de cultivo de a),
- c) incubar las células del paso b) en el medio de cultivo del paso a),
- 50 d) separar los fitoesteroles obtenidos tras el paso c) del medio de cultivo.

Medios de cultivo adecuados son conocidos en el estado de la técnica. Así, y sin limitar el alcance de la invención, un medio de cultivo adecuado para células vegetales se describe para cada especie utilizada en los ejemplos de la invención. A este medio se le pueden adicionar otros componentes dependiendo de la especie a la que pertenezcan las células vegetales. Las ciclodextrinas se incorporan en el medio de cultivo en el momento de su preparación.

Las células potencialmente productoras de fitoesteroles pueden provenir de hojas, tejidos u órganos que han sido establecidas previamente o no, en cultivos *in vitro*. Por tanto, se entiende por células potencialmente productoras de fitoesteroles, cualquier línea celular capaz de producir fitoesteroles, bien de forma natural o tras modificación genética.

Cualquier órgano, tejido o célula vegetal capaz de producir fitoesteroles puede ser empleado en la invención. Esto incluye aquellas células procedentes de un organismo que, aunque no posea de forma natural la capacidad de sintetizar fitoesteroles, ha adquirido dicha capacidad mediante procesos de manipulación genética. En una realización preferida, son tejidos o células vegetales procedentes de plantas de los géneros que se seleccionan de la lista que comprende: *Rosa*, *Daucus*, *Capsicum*, *Lactuca*, *Catharanthus*, *Lycopersicon*, *Taxus* y *Vitis*.

ES 2 344 775 A1

El término “planta” u “organismo” incluye partes, tejidos, células o protoplastos procedentes de la planta o del organismo, cultivos de células, cultivos de tejidos, callos, óvulos, embriones y semillas procedentes en última instancia de la planta o el organismo

5 Taxonómicamente los organismos del género *Rosa* se definen como organismos celulares, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Rosales*, familia *Rosaceae*, Subfamilia *Rosoideae*.

10 Taxonómicamente los organismos del género *Daucus* se definen como organismos celulares, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Apiales*, familia *Apiaceae*, Subfamilia *Apioideae*.

15 Taxonómicamente los organismos del género *Daucus* se definen como organismos celulares, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Apiales*, familia *Apiaceae*, Subfamilia *Apioideae*.

20 Taxonómicamente los organismos del género *Capsicum* se definen como organismos celulares, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Solanales*, familia *Solanaceae*, Subfamilia *Solanoideae*.

25 Taxonómicamente los organismos del género *Lactuca* se definen como organismos celulares, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Asterales*, familia *Asteraceae*, Subfamilia *Cichorioideae*.

30 Taxonómicamente los organismos del género *Catharanthus* se definen como organismos celulares, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Gentianales*, familia *Apocynaceae*, Subfamilia *Rauvolfioideae*.

35 Taxonómicamente los organismos del género *Lycopersicon* se definen como organismos celulares, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Solanales*, familia *Solanaceae*, Subfamilia *Solanoideae*.

40 Taxonómicamente los organismos del género *Taxus* se definen como organismos celulares, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Coniferales*, familia *Taxaceae*.

45 Taxonómicamente los organismos del género *Vitis* se definen como organismos celulares, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Vitales*, familia *Vitaceae*.

50 De esta manera, se establecen cultivos de células potencialmente productoras de fitoesteroles en medios de cultivo adecuados que han sido enriquecidos con ciclodextrinas. El término “cultivo de células” en esta memoria, hace referencia a un cultivo de células aisladas del mismo o diferente tipo de tejido, preferiblemente de una planta, o una colección de tales células organizadas en partes de una planta o en tejidos (cultivos tisulares). Tipos de cultivos de este tipo son, por ejemplo, cultivos de protoplastos, callos (grupo de células vegetales indiferenciadas capaces de regenerar una planta completa) y células vegetales que están aisladas de plantas o partes de las plantas, tales como embriones, protoplastos, células meristemáticas, polen, hojas, raíces, raíz inclina, antera, pistilo, flor, semilla, vaina o vástago de la planta.

55 También se entienden como células potencialmente productoras de fitoesteroles aquellas que provienen de vitroplantas, órganos o tejidos de dichas vitroplantas, y específicamente, de vitroplantas, órganos o tejidos de vitroplantas de los géneros que se seleccionan de la lista que comprende: *Rosa*, *Daucus*, *Capsicum*, *Lactuca*, *Catharanthus*, *Lycopersicon*, *Taxus* y *Vitis*.

60 Así, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, las células potencialmente productoras de fitoesteroles proceden de vitroplantas.

65 Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que se forman en algunos procesos de degradación del almidón. A veces también son llamadas cicloamilosas. Presentan un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica donde pueden atrapar moléculas orgánicas no polares. Para cambiar las propiedades físicas y químicas de las ciclodextrinas se han desarrollado diversos derivados. Unos de los más utilizados son los derivados parcialmente metilados que tienen una solubilidad en agua hasta 150 veces superior a la del producto de partida.

70 Así, en otra realización preferida, las ciclodextrinas que se añaden en el paso a) del procedimiento de la invención se eligen del grupo que comprende ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA) o ciclodextrina hidroxipropilada (CDHA). Preferiblemente, el grado de sustitución de los metilos por unidad de glucosa (anhidra) de la CDMA es de entre 1 y 3, y más preferiblemente, el grado de sustitución por metilos por unidad de glucosa (anhidra) de la CDMA es de 2.

75 En otra realización preferida de la invención, la ciclodextrina hidroxipropilada aleatoriamente tiene un grado de sustitución por hidroxipropilos de entre 0,6 y 0,9.

ES 2 344 775 A1

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la ciclodextrina es un maltooligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de tipo α (1→4) (β -ciclodextrinas).

En otra realización preferida la concentración de ciclodextrinas en el medio de cultivo del paso (a) del procedimiento de la invención es de entre 6.5 y 130 g/L de medio de cultivo. Más preferiblemente la concentración de ciclodextrinas es de entre 10 y 100 g/L medio de cultivo y aún más preferiblemente es de entre 50 y 75 g/L medio de cultivo.

El jasmonato de metilo es un regulador del crecimiento, modulando múltiples aspectos del desarrollo de las plantas (maduración de frutos, viabilidad del polen, crecimiento de la raíz, curvatura de los zarcillos) y que promueve el envejecimiento foliar, produciendo senescencia. Parece actuar de forma específica sobre la expresión de genes implicados en la defensa de las plantas a ataques de insectos y patógenos y genes que codifican para proteínas de reserva.

En otra realización preferida, además de añadir ciclodextrinas, se añade jasmonato de metilo al medio de cultivo del paso a) del procedimiento de la invención. En otra realización más preferida de la presente invención la concentración de jasmonato de metilo en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 5 y 500 micromoles por litro de medio de cultivo. Más preferiblemente la concentración de jasmonato de metilo es de entre 25 y 150 micromoles/L de medio de cultivo y aun más preferiblemente de entre 75 y 125 micromoles/L de medio de cultivo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende ciclodextrinas para incrementar la producción y/o extracción de fitoesteroles en células potencialmente productoras de los mismos. En una realización preferida, la composición de la invención comprende, además de ciclodextrinas, jasmonato de metilo. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un medio de cultivo, de ahora en adelante medio de cultivo de la invención, que comprende ciclodextrinas para incrementar la producción y/o extracción de fitoesteroles en células potencialmente productoras de los mismos. En una realización preferida, el medio de cultivo de la invención comprende, además de ciclodextrinas, jasmonato de metilo.

Tanto la densidad celular en el medio de cultivo como el fotoperiodo pueden variar en función de la procedencia de las células potencialmente productoras de fitoesteroles. El fotoperiodo se ajustará preferiblemente a un ciclo natural de entre 12-16 horas de luz y 8-12 horas de oscuridad.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto el efecto del uso de las ciclodextrinas y el jasmonato de metilo en la producción de fitoesteroles a partir de suspensiones celulares de diferentes especies vegetales.

Preparación y mantenimiento de material vegetal

➤ Línea celular: *Rosa sp.*

La línea celular de *Rosa mini (Rosa sp.)* se inició a partir de hojas de plantas cultivadas en los invernaderos de Viveros Bermejo S.L. Para ello las hojas se lavaron tres veces con agua jabonosa. Posteriormente se llevó a cabo la desinfección con etanol al 70% durante 1 minuto y a continuación se sumergieron durante 15-20 minutos en una disolución de hipoclorito sódico al 10% que contenía Tween 20 al 0.1%. Transcurrido este tiempo, las hojas se lavaron tres veces con agua destilada estéril trabajando a partir de este lavado y en las etapas siguientes en la cabina de flujo laminar.

Una vez desinfectadas se cortaron en fragmentos de 1.5-2.0 mm y se depositaron sobre placas petri que contenían un medio de cultivo óptimo para la inducción de callos basado en el descrito por Murashige & Skoog, 1962 (*Physiol. Plant.* 15:473-497), suplementado con pantotenato cálcico (1 mg/l), mioinositol (100 mg/l), biotina (0.01 mg/l), piridoxina (1 mg/l), tiamina (1 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l). Como fuente carbonada se utilizó sacarosa (30 g/l) y 2,4-diclorofenoxiacético (1.1 mg/l) y benciladenina (0.45 mg/l) como hormonas. Este medio se ajusta a pH 6 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm de presión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (8 g/l), cuando el medio se enfría.

Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de los callos friables obtenidos, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml del medio cultivo descrito sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C bajo un fotoperiodo 16 h de luz, 8 de oscuridad y se subcultivaron cada 14-16 días.

ES 2 344 775 A1

➤ Línea celular: *Daucus carota*

Línea celular: *Daucus carota* L. var. *sativus* (Hoffm.) Arcang PC-1106

5 Línea celular: *Daucus carota* L. cv. Chantenay.

La línea celular *Daucus carota* L. var. *sativus* (Hoffm.) Arcang PC-1106 fue obtenida de Germán Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ; Braunschweig, Alemania).

10

Para la inducción de callos de *Daucus carota* L. cv. Chantenay se utilizaron vitroplantas que se obtuvieron por germinación *in vitro* de semillas.

■ Germinación *in vitro* de semillas de *Daucus carota* variedad Chantenay

15

El objetivo fundamental de la germinación de semillas *in vitro* es la obtención de plantas estériles para su utilización en la inducción de líneas celulares de los diferentes órganos de la planta: raíz, tallo y hoja.

Para obtener la vitroplanta de zanahoria se utilizaron semillas suministradas por Viveros Bermejo S.L. Las semillas se sometieron a un proceso de desinfección con etanol al 70% durante 1 minuto y a continuación se sumergieron durante 15-20 minutos en una disolución de hipoclorito cálcico al 7% que contenía Tween 20 al 0.1%. Transcurrido este tiempo, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril trabajando a partir de este lavado y en las etapas siguientes en la cabina de flujo laminar.

20

Las semillas desinfectadas se transfirieron a tubos que contenían el medio de cultivo basado en el descrito por Murashige & Skoog, 1962 (*Physiol. Plant.* 15:473-497), suplementado con pantotenato cálcico (1 mg/l), mioinositol (100 mg/l), biotina (0.01 mg/l), piridoxina (1 mg/l), tiamina (1 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l) y hidrolizado de caseína (300 mg/L). Como fuente carbonada se utilizó sacarosa (25 g/l). Este medio se ajusta a pH 5.8 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm de presión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (8 g/l) cuando el medio se enfría.

25

30

■ Obtención de callos y mantenimiento de suspensiones celulares de *Daucus carota* variedad Chantenay

Los tallos de las vitroplantas se utilizaron como fuente de explantos. Las placas petri con los explantos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a una irradiancia de 4.6 w/m² a 25°C, observándose al cabo de 2-3 semanas la aparición de microcallos que se transfirieron a matraces de 250 ml de capacidad que contenían 100 ml del medio de cultivo anteriormente descrito suplementado con ácido naftalenacético (2 mg/l) y benciladenina (0.2 mg/l).

35

A partir de la línea celular generada bajo las condiciones descritas se originó una línea celular en oscuridad con el fin de comparar la producción de fitoesteroles en luz y oscuridad.

40

Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de callos friables, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml de medio cultivo sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, en las mismas condiciones de luz y T^a y se subcultivaron cada 20 días.

45

➤ Línea celular: *Capsicum annuum* y *Capsicum chinense*

Para la inducción de callos de *Capsicum* se utilizaron vitroplantas obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro*.

50

■ Germinación *in vitro* de semillas de *Capsicum*

Para obtener la vitroplanta de *Capsicum* se utilizaron semillas que se sometieron a un proceso de desinfección con etanol al 70% durante 2 minutos y a continuación, se sumergieron durante 20 minutos en una disolución de hipoclorito sódico al 20% que contenía Tween 20 al 0.1%. Transcurrido este tiempo, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril, trabajando a partir de este lavado y en las etapas siguientes en la cabina de flujo laminar.

55

Las semillas desinfectadas se transfirieron a tubos que contenían el medio de cultivo basado en el descrito por Murashige & Skoog, 1962 (*Physiol. Plant.* 15:473-497), suplementado con pantotenato cálcico (1 mg/l), mioinositol (100 mg/l), biotina (0.01 mg/l), piridoxina (1 mg/l), tiamina (1 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l) e hidrolizado de caseína (300 mg/L). Como fuente carbonada se utilizó sacarosa (25 g/l). Este medio se ajusta a pH 5.8 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm de presión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (8 g/l), cuando el medio se enfría. Los tubos de cultivo *in vitro* se mantienen en una cámara de germinación durante 15 días, a 25°C bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

65

ES 2 344 775 A1

■ *Obtención de callos y mantenimiento de suspensiones celulares de Capsicum*

Una vez crecidas las plántulas se utilizarán hipocotilos como fuente de explanto, para la obtención de los microcallos en el medio de cultivo descrito anteriormente suplementado con ácido naftalenacético (2 mg/l) y benciladenina (0.2 mg/l). Los explantos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a una irradiancia de 4.6 w/m² a 25°C, observándose al cabo de 2 semanas la aparición de estos microcallos que se transfirieron a matraces de 250 ml de capacidad que contenían 100 ml del mismo medio de cultivo.

Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de callos friables, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml de medio cultivo sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm en las mismas condiciones de luz y T^a y se subcultivaron cada 20 días.

➤ *Línea celular: Lactuca sativa*

Para la inducción de callos de *Lactuca sativa* se utilizaron hojas de vitroplantas obtenidas por germinación *in vitro*.

■ *Germinación in vitro de semillas de Lactuca sativa*

Para obtener las vitroplantas de *Lactuca sativa* se utilizaron semillas suministradas por Ramiro Arnedo S.L. Las semillas se sometieron a un proceso de desinfección con etanol al 70% durante 1 minuto y a continuación se sumergieron durante 15 minutos en una disolución de hipoclorito cálcico al 7% que contenía Tween 20 al 0.1%. Transcurrido este tiempo, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril trabajando a partir de este lavado y en las etapas siguientes en la cabina de flujo laminar.

Las semillas desinfectadas se transfirieron a tubos que contenían el medio de cultivo basado en el descrito por Murashige & Skoog, 1962 (*Physiol. Plant.* 15:473-497), suplementado con pantotenato cálcico (1 mg/l), mioinositol (100 mg/l), biotina (0.01 mg/l), piridoxina (1 mg/l), tiamina (1 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l) e hidrolizado de caseína (300 mg/L). Como fuente carbonada se utilizó sacarosa (25 g/l). Este medio se ajusta a pH 6 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm de presión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (8 g/l), cuando el medio se enfría.

■ *Obtención de callos y mantenimiento de suspensiones celulares de Lactuca sativa*

Una vez crecidas las plántulas se utilizaron las hojas y la raíz como fuente de explantos para la obtención de los microcallos en placa petri. Las placas petri con los explantos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a una irradiancia de 4.6 w/m² a 25°C, observándose al cabo de 2-3 semanas la aparición de microcallos que se transfirieron a matraces de 250 mL de capacidad que contenían 100 ml del medio de cultivo anteriormente descrito suplementado con ácido naftalenacético (1 mg/l) y quinetina (1 mg/l).

Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de porciones de callos friables, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml de medio cultivo sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C en las condiciones descritas anteriormente y se subcultivaron cada 16 días.

➤ *Línea celular: Catharanthus roseus*

La línea celular de *C. roseus* (L.) G.Don fue obtenida de Germán Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ; Braunschweig, Alemania, número PC-1101).

Los callos se mantuvieron a 25°C en oscuridad, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 100 ml de un medio que contenía medio basal LS (Linsmaier & Skoog, F. 1965 *Physiol. Plant.* 18, 100-127) suplementado con tiamina (0,4 mg/l) y mio-inositol (100 mg/l) y sacarosa (30 g/l) como fuente carbonada, ácido alfa-naftalenacético (0.19 mg/l) y 2.4-diclorofenoxiacético (0.22 mg/l) como hormonas. Este medio se ajusta a pH 6 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm de presión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (8 g/l) cuando el medio se enfría.

Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de callos friables, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml del medio LS sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C en la oscuridad.

➤ *Línea celular: Lycopersicon esculentum*

Línea celular: *Lycopersicon esculentum* variedad Micro-Tom

Línea celular: *Lycopersicon esculentum* variedad Durinta

65

Las líneas celulares derivadas del tomate Durinta suministrado por la Wester Seed (Holanda) fueron obtenidas a partir de diferentes tejidos (epidermis y pericarpo) del fruto.

ES 2 344 775 A1

Para ello los frutos se lavaron tres veces con agua jabonosa. Posteriormente se llevó a cabo la desinfección con etanol al 70% durante 1 minuto e hipoclorito cálcico al 7% durante 20 minutos. Tras la desinfección, se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Una vez desinfectadas se seleccionaron explantos de 1.5-2.0 mm y se depositaron sobre placas petri que contenían un medio de cultivo óptimo para la inducción de callos basado en el descrito por Murashige y Skoog (1962), suplementado con pantotenato cálcico (1 mg/l), mioinositol (100 mg/l), biotina (0.01 mg/l), piridoxina (1 mg/l), tiamina (1 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l) e hidrolizado de caseína (250 mg/l); como fuente carbonada se utilizó sacarosa (30 g/l) y 2.4-diclorofenoxiacético (1 mg/l) como hormona. Este medio se ajusta a pH 6 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm de presión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (7.5 g/l) cuando el medio se enfría.

Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de callos friables, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml de medio cultivo sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C bajo un fotoperiodo 16 h de luz, 8 de oscuridad y se subcultivaron cada 14-16 días.

Línea celular: *Lycopersicon esculentum* variedad Micro-Tom

Para la inducción de callos de *Lycopersicon esculentum* variedad Micro-Tom se utilizaron vitroplantas obtenidas por germinación *in vitro*.

■ Germinación *in vitro* de semillas de *Lycopersicon esculentum* variedad Micro-Tom

Para obtener las vitroplantas de *Lycopersicon esculentum* se utilizaron semillas suministradas por Ramiro Arnedo S.L. Las semillas se sometieron a un proceso de desinfección con etanol al 70% durante 1 minuto y a continuación se sumergieron durante 15 minutos en una disolución de hipoclorito cálcico al 7% que contenía Tween 20 al 0.1%. Transcurrido este tiempo, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril trabajando a partir de este lavado y en las etapas siguientes en la cabina de flujo laminar.

Las semillas desinfectadas se transfirieron a tubos que contenían el medio de cultivo basado en el descrito por Murashige & Skoog, 1962 (*Physiol. Plant.* 15:473-497), suplementado con pantotenato cálcico (1 mg/l), mioinositol (100 mg/l), biotina (0.01 mg/l), piridoxina (1 mg/l), tiamina (1 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l) e hidrolizado de caseína (250 mg/l). Como fuente carbonada se utilizó sacarosa (30 g/l). Este medio se ajusta a pH 6 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm de presión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (8 g/l) cuando el medio se enfría.

■ Obtención de callos y mantenimiento de suspensiones celulares de *Lycopersicon esculentum* variedad Micro-Tom

Una vez crecidas las plántulas se utilizaron las yemas axilares como fuente de explanto, para la obtención de los microcallos en el medio de cultivo descrito anteriormente suplementado con ácido naftalenacético (2 mg/l) y benciladenina (2 mg/l). Los explantos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a una irradiancia de 4.6 w/m² a 25°C, observándose al cabo de 2 semanas la aparición de estos microcallos que se transfirieron a matraces de 250 ml de capacidad que contenían 100 ml del mismo medio de cultivo.

Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de porciones de callos friables, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml del medio cultivo sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C en las condiciones descritas anteriormente y se subcultivaron cada 16 días.

➤ Línea celular: *Taxus sp.*

La línea celular de *Taxus sp.* se inició a partir de hojas de plantas cultivadas en los invernaderos de Viveros Bermejo S.L. Para ello las hojas se lavaron tres veces con agua jabonosa. Posteriormente se llevó a cabo la desinfección con etanol al 70% durante 1 minuto y a continuación se sumergieron durante 20 minutos en una disolución de hipoclorito cálcico al 8% que contenía Tween 20 al 0.1%. Transcurrido este tiempo, las hojas se lavaron tres veces con agua destilada estéril trabajando a partir de este lavado y en las etapas siguientes en la cabina de flujo laminar.

Una vez desinfectadas las hojas se cortaron en fragmentos de 1.5-2.0 mm y se depositaron sobre placas petri que contenían un medio de cultivo óptimo para la inducción de callos que contiene sales Gamborg (3.05 g/l) suplementado con pantotenato cálcico (1 mg/l), mioinositol (100 mg/l), biotina (0.01 mg/l), piridoxina (1 mg/l), tiamina (1 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l) e hidrolizado de caseína (500 mg/l). Como fuente carbonada se utilizó sacarosa (30 g/l) y 2.4-diclorofenoxiacético (2 mg/l) y quinetina (0.2 mg/l) como hormonas. Este medio se ajusta a pH 5.8 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 1.2 atm de presión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (8 g/l) cuando el medio se enfría.

Las suspensiones celulares se iniciaron a partir de callos friables, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml del medio cultivo sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C bajo un fotoperiodo 16 h de luz, 8 de oscuridad y se subcultivaron cada 20 días.

ES 2 344 775 A1

➤ Línea celular: *Vitis vinifera* cv. Monastrell

La línea celular de *Vitis vinifera* cv. Monastrell se obtuvieron a partir de frutos inmaduros de este cultivar de vid. Para ello, los frutos inmaduros, de aproximadamente 5 mm de diámetro, se esterilizaron superficialmente por inmersión en una disolución de hipoclorito cálcico al 7% durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, y siempre bajo condiciones estériles, las bayas se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se eliminaron las semillas y se dividieron en cuatro porciones. Cada una de estas porciones se depositaron en una placa petri que contenía un medio de cultivo basado en el descrito por Murashige & Skoog, 1962 (*Physiol. Plant.* 15:473-497), suplementado con vitaminas, hormonas, hidrolizado de caseína, sacarosa y agar, ajustándose el pH a 6.0.

Las placas con los explantos se mantuvieron en oscuridad a 25°C, observándose al cabo de 2-3 semanas la aparición de microcallos, que se transfirieron a matraces de 250 ml de capacidad que contenían 100 ml del medio anteriormente descrito. Los callos friables obtenidos se subcultivaron cada tres semanas.

Posteriormente, estos callos se transfirieron a medio de cultivo Gamborg B5, suplementado con quinetina (0.2 mg/l), ácido naftalenacético (0.1 mg/l), hidrolizado de caseína (250 mg/l) y sacarosa (20 g/l). Los callos se mantuvieron friables en este estado en condiciones para la obtención de suspensiones celulares, en oscuridad a 25°C.

Las suspensiones celulares se iniciaron mediante la transferencia de porciones de callo friable en matraces de 250 ml de capacidad, que contenían 100 ml de medio de cultivo líquido Gamborg descrito anteriormente. Después de varios subcultivos de las suspensiones en este volumen se procedió al escalado en matraces de 500 ml de capacidad que contenían 200 ml de medio de cultivo. Se mantuvieron en agitación a 105 rpm, en iguales condiciones de oscuridad y temperatura que las descritas para las anteriores y se subcultivaron cada 14-16 días.

Elicitación de las células

En cada experiencia de elicitación se tomaron, en condiciones de esterilidad, entre 420 y 110 gramos de peso fresco de células por litro, que habían sido previamente lavadas con medio fresco y filtradas. Utilizando esta densidad celular, las células se repartieron en matraces de 250 ml que contenían 100 ml de medio fresco:

- sólo con una β -ciclodextrina metilada aleatoriamente con un grado de sustitución por metilos de entre 1,6 y 1,9 (CDMA) a una concentración de 62,5 g/l.
- hidroxipropilada aleatoriamente con un grado de sustitución por hidroxipropilos de entre 0,6 y 0,9 (CDHA), a una concentración de 62,5 g/l.
- con una de las ciclodextrinas anteriormente mencionadas (CDMA) o (CDHA) a una concentración 62,5 g/l y con jasmonato de metilo a una concentración 100 micromolar.

El jasmonato de metilo se esteriliza por filtración, disuelto en etanol, y posteriormente se mezcla con el resto del medio estéril. La concentración final de etanol en el medio de cultivo es de 0.043 moles por litro.

Los matraces se incubaron en las mismas condiciones descritas anteriormente para su mantenimiento en medio líquido durante 96 horas.

Muestreo y preparación de muestras para análisis

Los cultivos celulares incubados con elicitores se recogieron a las 96 horas de tratamiento para su análisis.

En el caso de las suspensiones celulares, las células fueron separadas del medio por filtración realizando un ligero vacío, recogiendo por separado las células y el filtrado. El filtrado se utilizó para la extracción de los compuestos y posterior análisis por cromatografía de gases/masas.

Análisis de fitoesteroides en el medio extracelular

Una vez realizados los experimentos de elicitación, la extracción de los compuestos secretados al medio de cultivo de las diferentes líneas celulares, se llevó a cabo mediante partición de fases entre acetato de etilo y agua que contenía, NaHCO₃ al 3% (p/v) y NaCl al 10% (p/v). La fase orgánica se recogió y se evaporó en un rotavapor a 40°C a vacío; el residuo seco se resuspendió en 1 ml de metanol y se procedió a su análisis en el cromatógrafo de gases/masas.

Los ensayos se realizaron utilizando un sistema cromatográfico Agilent Technologies 6890 Network GS System equipado con un detector de masas Agilent 5973. La separación de los compuestos se llevó a cabo sobre una columna capilar Agilent 19091 S-433 HP-5MS, con un flujo de 1.0 ml/min de helio como gas portador. La temperatura del inyector se ajustó a 250°C y el volumen de inyección fue de 1 μ l. El programa de análisis es el siguiente: inicio a 60°C con subida hasta 310°C alcanzando una temperatura máxima de 350°C. La identificación de los diferentes compuestos se llevó a cabo mediante la combinación del análisis del espectro de masas y los tiempos de retención.

ES 2 344 775 A1

El tiempo de retención de los diferentes fitosteroles y la respuesta del detector a la concentración de los mismos (curva de calibrado para cuantificación) se determinó usando patrones externos.

5 Ejemplo 1

Elicitación de células de Lycopersicon esculentum variedad Durinta obtenidas a partir de epidermis del fruto con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (260 g pfl, 9.2 g ps/l)

10 Las suspensiones de *Lycopersicon esculentum* se trataron con:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- 15 • con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- 20 • con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

25 Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitosteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla A.

30 Los cultivos elicitados sólo con CDs o en combinación con MeJA, inducen una mayor acumulación extracelular de estigmasterol siendo el tratamiento con CDHA+MeJA el que produjo un mayor incremento de la producción respecto al control. Asimismo el tratamiento que produjo un mayor incremento en la biosíntesis de fucosterol fue CDHA con MeJA.

35 Por otro lado se observó que no existían diferencias significativas en la producción de β -sitosterol en los cultivos tratados con MeJA, CDMA y la combinación de ambos tras 96 horas de elicitación. Sólo los tratamientos con CDHA y la combinación de CDHA con MeJA se tradujo en un incremento en la producción de β -sitosterol.

40 Estos resultados indican que el tratamiento que origina mayor producción de fitosteroles en esta línea celular es la combinación de CDHA y MeJA.

TABLA A

45 *Producción de fitosteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de Lycopersicon esculentum tras 96 horas de tratamiento. Densidad celular: 9.2 g ps/l*

50 Compuesto	Control	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+ MeJA
estigmasterol	0	3	6	5	14	28
55 β-sitosterol	3	3	4	3	6	11
fucosterol	4	5	26	11	38	67

60 Control: medio de cultivo sin elicitores

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

65 CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

ES 2 344 775 A1

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

5

Ejemplo 2

10 *Elicitación de células de Lycopersicon esculentum variedad Durinta obtenidas a partir del pericarpio del fruto con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (260 g pf/l, 6 g ps/l)*

Las suspensiones de *Lycopersicon esculentum* se trataron con:

15

- controles sin CDMA ni MeJA
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

20

25 Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo utilizando una densidad celular elevada (260 g/pf/l). Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitosteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla B.

30

De todos los ensayos realizados la utilización de CDHA sola o en combinación con MeJA resulto ser el tratamiento que indujo un mayor incremento en la acumulación extracelular de estigmasterol, β -sitosterol y fucosterol.

35

En cuanto a la producción de taraxasterol no se observaron diferencias significativas con respecto al control.

TABLA B

40

Producción de fitosteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de Lycopersicon esculentum tras 96 horas de incubación. Densidad celular: 6 g ps/l

45

Compuestos	Control	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
estigmasterol	3	3	7	9	16	19
β -sitosterol	0	4	6	7	12	10
fucosterol	3	4	15	20	39	31
taraxasterol	9	9	4	6	5	5

55

Control: medio de cultivo sin elicitores.

60

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

65

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

ES 2 344 775 A1

Ejemplo 3

Elicitación de células de *Lycopersicon esculentum* variedad Micro-Tom con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular baja (130 g pf/l, 7 g ps/l)

Las suspensiones de *Lycopersicon esculentum* se trataron:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo utilizando una densidad celular baja (130 g/pf/l). Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla C.

Los cultivos elicitados solamente con CDs o en combinación con MeJA originan los mayores incrementos de la producción de fitoesteroles respecto a los controles o incluso los tratados solamente con MeJA.

En relación a la producción de fucosterol y taraxasterol se observó que aquellos cultivos tratados con CDMA solo o combinado con MeJA son los que producen una mayor acumulación extracelular.

TABLA C

Producción de fitoesteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de *Lycopersicon esculentum* tras 96 horas de incubación. Densidad celular: (7 g ps/l)

Compuesto	Control	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
estigmasterol	0	3	14	13	13	12
β -sitosterol	0	3	9	9	7	8
fucosterol	4	0	19	34	19	10
taraxasterol	4	8	263	234	6	64

Control: medio de cultivo sin elicitores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

ES 2 344 775 A1

Ejemplo 4

Elicitación de células de *Rosa sp* con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasonafo de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (420 g pf/l, 12.6 g ps/l)

Las suspensiones de *Rosa sp* se trataron:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitosteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla D.

Tras analizar los resultados se observó que la inducción de la biosíntesis de fitosteroles en cultivos celulares de *Rosa sp* elicitados sólo con CDs resultó ser mayor que en los elicitados sólo con MeJA o en combinación con CDs, siendo el tratamiento con CDMA el que produjo un mayor incremento.

Este hecho sugiere que el verdadero inductor de la biosíntesis de β -sitosterol y fucosterol en los cultivos de *Rosa sp* son las CDs.

TABLA D

Producción de fitosteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de *Rosa sp* tras 96 horas de tratamiento. Densidad celular: 12.6 g ps/l

Compuesto	Control	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
β -sitosterol	0	4.6	167	62.5	143	98.3
fucosterol	0	5.1	123	58	150	72.8

Control: medio de cultivo sin elicitores

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

Ejemplo 5

Elicitación de células de *Rosa sp* con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular baja (196 g pf/l, 8.4 g ps/l)

Las suspensiones de *Rosa sp* se trataron:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)

ES 2 344 775 A1

- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- 5 • con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

10 Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla E.

15 El tratamiento que produjo un mayor incremento de la producción de fitoesteroles es CDMA al igual que los cultivos celulares de *Rosa sp* elicitados utilizando una alta densidad celular (Tabla D). Sin embargo, en estos ensayos la producción de β -sitosterol y fucosterol resultó ser del orden de 2 y 3 veces menor que en los ensayos realizados utilizando una densidad celular elevada.

20

TABLA E

25 *Producción de fitoesteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de *Rosa sp* tras 96 horas de tratamiento. Densidad celular: 8.4 g ps/l*

25

30 Compuesto	Control	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
β-sitosterol	0	5.5	52.5	27	39.37	38.25
fucosterol	0	9.8	62.5	37.12	42.62	31.62

35

40

Control: medio de cultivo sin elicitores

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA

45

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA

50

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

Ejemplo 6

55

*Elicitación de células de *Capsicum annuum* con ciclodextrinas (CDMA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (367 g pfl, 40 g ps/l)*

Las suspensiones de *Capsicum annuum* se trataron con:

60

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- 65 • con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

ES 2 344 775 A1

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo utilizando una densidad celular elevada (367 g/pf/l). Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla F.

La inducción de la biosíntesis de fitoesteroles en cultivos elicitados sólo con CDs resultó ser menor que en los elicitados sólo con MeJA. Sin embargo, la abundancia de fitoesteroles es mayor utilizando la combinación de CDs y MeJA que individualmente por lo se observa un efecto aditivo.

TABLA F

Producción de fitoesteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de Capsicum annuum tras 96 horas de incubación. Densidad celular: 40 g ps/l

Compuesto	Control	MeJA	CDMA	CDMA+ MeJA
campesterol	0	16.2	9	31
β -sitosterol	0	81.5	67	163.8

Control: medio de cultivo sin elicitors.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

Ejemplo 7

Elicitación de células de Capsicum chinense con ciclodextrinas (CDMA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (367 g pf/l, 40 g ps/l)

Las suspensiones de *Capsicum chinense* se trataron:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo utilizando una densidad celular elevada (367 g/pf/l). Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla G.

Como se observa en la tabla G la biosíntesis de β -sitosterol se incrementa al realizar los ensayos con CDs sola o en combinación con MeJA mientras que la elicitación en presencia de MeJA individualmente produce niveles inferiores. No se detectó producción de campesterol, fucosterol y estigmasterol en presencia de MeJA pero si con CDs y la combinación de ambos.

ES 2 344 775 A1

TABLA G

*Producción de fitoesteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de Capsicum chinense tras 96 horas de incubación.
Densidad celular: 40 g ps/l*

COMPUESTO	CONTROL	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA
estigmasterol	0	0	22	20
β-sitosterol	0	8.4	137	141.1
campesterol	0	0	46	33.25
fucosterol	0	0	51.6	25.6

Control: medio de cultivo sin elicitores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

Ejemplo 8

Elicitación de células de Daucus carota L. sativus (Hoffm.) Arcang PC-1106 con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular baja (165 g pf/l, 5 g ps/l)

Las suspensiones de *Daucus carota* L. sativus (Hoffm.) Arcang PC-1106 se trataron con:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo utilizando una densidad celular baja (11.2 g pf/l). Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla H.

Tras analizar los resultados se observó que tanto estigmasterol como campesterol y β -sitosterol se identificaron en aquellos cultivos tratados sólo con CDs o en combinación con MeJA.

La inducción de la biosíntesis de fitoesteroles en cultivos elicitados con CDMA+MeJA resultó ser similar que en los realizados en presencia sólo de CDMA.

ES 2 344 775 A1

TABLA H

*Producción de fitoesteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de *Daucus carota* L. sativus (Hoffm.) Arcang PC-1106 tras 96 horas de incubación. Densidad celular: 5 g ps/l*

COMPUESTO	CONTROL	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
estigmasterol	0	0	3.6	4.3	3.7	4.9
β -sitosterol	0	0	3.3	3.8	3.6	2.7
campesterol	0	0	3.2	3.6	3.5	3.4

Control: medio de cultivo sin elicitores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

Ejemplo 9

*Elicitación de células de *Daucus carota* L. sativus (Hoffm.) Arcang PC-1106 con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (330 g pf/l, 11.2 g ps/l)*

Las suspensiones se trataron:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo utilizando una densidad celular baja (11.2 g pf/l). Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla I.

Al igual que ocurría en los experimentos de elicitación de células de *Daucus carota* L. sativus utilizando una densidad celular baja (Tabla H), estigmasterol, campesterol y β -sitosterol solamente se identificaron en aquellos cultivos tratados con CDs individualmente o en combinación con MeJA, siendo los niveles de producción de fitoesteroles similares en todos los tratamientos.

ES 2 344 775 A1

TABLA I

*Producción de fitoesteroides expresados en mg/l de β -sitosterol de *Daucus carota* L. sativus (Hoffm.) Arcang PC-1106 tras 96 horas de incubación. Densidad celular: 11.2 g ps/l*

COMPUESTO	CONTROL	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
estigmasterol	0	0	6.4	5.7	4.7	5.4
β-sitosterol	0	0	6.1	5.0	4.7	5.0
campesterol	0	0	5.5	4.4	4.5	4.7

Control: medio de cultivo sin elicitores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

Ejemplo 10

*Elicitación de células de *Daucus carota* variedad Chantenay con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (270 g pfl, 16.5 g ps/l)*

Las suspensiones de *Daucus carota* variedad Chantenay se trataron:

- controles sin CDMA ni MeJA
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroides en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla J.

Estos resultados indican que la producción de fitoesteroides en esta línea celular es similar en todos los tratamientos con CDs sólo o en combinación con MeJA.

TABLA J

*Producción de fitoesteroides expresados en mg/l de β -sitosterol de *Daucus carota* variedad Chantenay tras 96 horas de tratamiento. Densidad celular: 16.5 g ps/l*

Compuesto	Control	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
estigmasterol	0	0	3.46	4.16	3.22	3.87
β-sitosterol	0	0	3.41	3.55	3.22	3.27

ES 2 344 775 A1

Control: medio de cultivo sin elicitores

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

5 CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

10 CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

Ejemplo 11

15

Elicitación de células de Vitis vinifera cv Monastrell con ciclodextrinas (CDMA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (300 g pf/l, 2.5 g ps/l)

Las suspensiones de *Vitis vinifera* se trataron:

20

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- 25 • con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- 30 • con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

35

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo utilizando una densidad celular elevada (300 g/pf/l). Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla K.

40

La biosíntesis de fitoesteroles se produjo al realizar los ensayos con CDs mientras que en los cultivos celulares tratados sólo con MeJA no se produjo acumulación extracelular.

TABLA K

45

Producción de fitoesteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de Vitis vinifera cv Monastrell tras 96 horas de incubación. Densidad celular: 2.5 g ps/l

50

COMPUESTO	CONTROL	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA
β -sitosterol	0	0	37.4	31.6
fucosterol	0	0	7.5	0

55

Control: medio de cultivo sin elicitores

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l

60

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

65

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

ES 2 344 775 A1

Ejemplo 12

Elicitación de células de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (232 g pfl, 9.2 g ps/l)

Las suspensiones de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don se trataron con:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo utilizando una densidad celular baja (11.2 g pfl/l). Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla L.

Los cultivos elicitados solamente con CDs o en combinación con MeJA originaron producción de fitoesteroles. Los ensayos realizados en presencia de CDs originaron un aumento de la acumulación extracelular de fitoesteroles. En todos los casos se observa una producción baja de fitoesteroles por lo que el efecto o el agente inductor son las CDs.

TABLA L

Producción de fitoesteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don tras 96 horas de incubación. Densidad celular: 9.2 g ps/l

COMPUESTO	CONTROL	MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
campesterol	0	0	3.3	3.4
β -sitosterol	0	0	2.8	0

Control: medio de cultivo sin elicitores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

Ejemplo 13

Elicitación de células de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular baja (110 g pfl, 6 g ps/l)

Las suspensiones de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don se trataron con:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- con CDMA (62.5 g/l)

ES 2 344 775 A1

- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- 5 • con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo utilizando una densidad celular baja (110 g pf/l). Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla M.

Solamente los cultivos celulares elicitados con CDs incrementaron la producción de campesterol y β -sitosterol respecto al resto de tratamientos. Por lo cual en *Catharanthus roseus* (L.) G.Don las CDs producen un aumento de la biosíntesis de fitoesteroles.

TABLA M

20 *Producción de fitoesteroles expresados en mg/l de β -sitosterol I de *Catharanthus roseus* (L.) G.Don tras 96 horas de incubación. Densidad celular: 6 g ps/l*

COMPUESTO	CONTROL	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
β-sitosterol	0	0	4.7	0	3.29	0
campesterol	0	0	3.86	0	2.78	0

30

Control: medio de cultivo sin elicitores.

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA.

35

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA.

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

40

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA.

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA.

45 Ejemplo 14

*Elicitación de células de *Lactuca sativa* obtenidas a partir de hojas con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (250 g pf/l, 3 g ps/l)*

50

Las suspensiones de *Lactuca sativa* se trataron:

- sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- 55 • con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- 60 • con CDHA (62.5 g/l)
- con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

65

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroles en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla N.

ES 2 344 775 A1

Los cultivos elicitados sólo con CDs o en combinación con MeJA, inducen una mayor acumulación extracelular de fitoesteroides siendo el tratamiento con CDMA el que produjo un mayor incremento de la producción respecto al control y los cultivos tratados sólo con MeJA.

5 Por otro lado se observó que no existían diferencias significativas en la producción de fitoesteroides en los ensayos realizados con CDMA+MeJA, CDHA y CDHA+MeJA.

TABLA N

10 *Producción de fitoesteroides expresados en mg/l de β -sitosterol de Lactuca sativa tras 96 horas de tratamiento.
Densidad celular: 2.8 g ps/l*

15	Compuesto	Control	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
	campesterol	0	0	5.36	3.18	3.17	3.11
20	estigmasterol	0	0	6.05	3.63	4.31	4.4
	β -sitosterol	0	0	5.63	3.66	3.43	3.33

25 Control: medio de cultivo sin elicitores

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

30 CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA

35 CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

Ejemplo 15

40 *Elicitación de células de Lactuca sativa obtenidas a partir de raíz con ciclodextrinas (CDMA y CDHA) y jasmonato de metilo (MeJA) utilizando una densidad celular elevada (250 g pf/l, 3 g ps/l)*

Las suspensiones de *Lactuca sativa* se trataron:

- 45 • sin CDMA ni MeJA (controles)
- con MeJA (100 micromoles/l)
- 50 • con CDMA (62.5 g/l)
- con CDMA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)
- con CDHA (62.5 g/l)
- 55 • con CDHA (62.5 g/l) y MeJA (100 micromoles/l)

60 Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo. Al cabo de 96 horas, se recolectaron las células y el medio de cada matraz por separado, las células se pesaron y se determinó la cantidad total de fitoesteroides en el medio extracelular. El resultado del experimento se muestra en la Tabla N.

65 Al igual que ocurría en los experimentos de elicitación de células de *Lactuca sativa* obtenidas a partir de hoja (Tabla N), estigmasterol, campesterol y β -sitosterol solamente se identificaron en aquellos cultivos tratados con CDs individualmente o en combinación con MeJA, siendo los niveles de producción de fitoesteroides similares en todos los tratamientos.

ES 2 344 775 A1

TABLA Ñ

*Producción de fitoesteroles expresados en mg/l de β -sitosterol de Lactuca sativa tras 96 horas de tratamiento.
Densidad celular: 3 g ps/l*

5

10

15

Compuesto	Control	MeJA	CDMA	CDMA+MeJA	CDHA	CDHA+MeJA
campesterol	0	0	5.53	4.41	4.51	2.17
estigmasterol	0	0	6.45	5.70	4.72	5.13
β-sitosterol	0	0	6.12	4.96	4.71	5.02

20

Control: medio de cultivo sin elicitores

MeJA: tratamiento con 100 micromoles/l de MeJA

CDMA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA

25

CDMA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

CDHA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA

30

CDHA+MeJA: tratamiento con 62.5 g/l de CDHA combinado con 100 micromoles/l de MeJA

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 344 775 A1

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para incrementar la producción y/o extracción de fitoesteroles que comprende:

- a. añadir ciclodextrinas a un medio de cultivo,
- b. poner en contacto células potencialmente productoras de fitoesteroles con el medio de cultivo de (a),
- c. incubar las células del paso b) en el medio de cultivo del paso a),
- d. separar los fitoesteroles obtenidos tras el paso c) del medio de cultivo.

2. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde las células potencialmente productoras de fitoesteroles del paso (a) proceden de plantas de los géneros que se seleccionan de la lista que comprende: *Rosa*, *Daucus*, *Capsicum*, *Lactuca*, *Catharanthus*, *Lycopersicon*, *Taxus* y *Vitis*.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células potencialmente productoras de fitoesteroles proceden de vitroplantas.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las ciclodextrinas se seleccionan del grupo que comprende cliclodextrina metilada aleatoriamente o ciclodextrina hidroxipropilada.

5. Procedimiento según la reivindicación 4 donde la ciclodextrina metilada aleatoriamente tiene un grado de sustitución por metilos de entre 1 y 3.

6. Procedimiento según la reivindicación 5 donde la ciclodextrina metilada aleatoriamente es dimetilada.

7. Procedimiento según la reivindicación 4 donde la ciclodextrina hidroxipropilada aleatoriamente tiene un grado de sustitución por hidroxipropilos de entre 0,6 y 0,9.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la ciclodextrina es una β -ciclodextrina.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la concentración de ciclodextrinas en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 6,5 y 130 g/l.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la concentración de ciclodextrinas en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 10 y 100 g/l.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde la concentración de ciclodextrinas en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 50 y 75 g/l.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde además de añadir ciclodextrinas al medio de cultivo del paso (a) se añade jasmonato de metilo.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde la concentración de jasmonato de metilo en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 5 y 500 micromoles/litro.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, donde la concentración de jasmonato de metilo en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 25 y 150 micromoles/litro.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, donde la concentración de jasmonato de metilo en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 75 y 125 micromoles/litro.

16. Uso de una composición que comprende ciclodextrinas para incrementar la producción y/o extracción de fitoesteroles en células potencialmente productoras de los mismos.

17. Uso de un medio de cultivo que comprende ciclodextrinas para incrementar la producción y/o extracción de fitoesteroles en células potencialmente productoras de los mismos.

18. Uso de una composición según la reivindicación 16 o de un medio de cultivo según la reivindicación 17, donde la composición o el medio de cultivo además comprende jasmonato de metilo.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 775

② N° de solicitud: 200803107

③ Fecha de presentación de la solicitud: **31.10.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12P 7/22** (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 03062406 A1 (UNIVERSIDAD DE ALICANTE) 31.07.2003	
A	MANGAS, S. et al.: "The Effect of Methyl-Jasmonate on Triterpene and Sterol Metabolisms of Centel the asiatica, Ruscus aculeatus and Galphimia glauca Cultured Plants", Phytochemistry (2006), vol. 67 pp.: 2041-2049.	
A	LEE, M.H. et al.: "Enhanced Triterpene and Phytosterol Biosynthesis in Panax ginseng Overexpressing Squalene Synthase Gene", Plant Cell Physiol. (2004) vol. 45 (8), pp.: 976-984.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

23.08.2010

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.08.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 03062406 A1	31-07-2003
D02	MANGAS, S. et al., Phytochemistry, vol. 67, pp.: 2041-2049	2006
D03	LEE, M.H. et al., Plant Cell Physiol. vol. 45 (8), pp.: 976-984.	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un procedimiento para incrementar la producción y extracción de fitosteroles a partir de cultivos de células vegetales mediante la adición al medio de cultivo de ciclodextrinas y, opcionalmente, jasmonato de metilo.

D01 describe la utilización de beta-ciclodextrina para estimular la síntesis de resveratrol en células cultivadas de vid.

D02 describe el efecto que tiene la adición de metil-jasmonato sobre el metabolismo de los esteroides y los triterpenos en cultivos de plantas.

D03 estudia la biosíntesis de fitosteroides en *Panax ginseng* (una especie vegetal) y la influencia que sobre ésta tiene la sobre-expresión del gen responsable de la síntesis de la escualeno sintasa. Se describen los efectos producidos sobre los niveles de fitosteroides por la adición de distintas sustancias. Una de ellas es el metil-jasmonato.

Del estado de la técnica anterior no se infiere que la adición de ciclodextrina a un medio de cultivo de células vegetales, pueda conllevar un aumento en la concentración de fitosteroides. En D02 y D03 se vislumbra un posible efecto estimulador del metil-jasmonato sobre la concentración intracelular de fitosteroides, pero no asociado a una ciclodextrina (tal y como se describe en la invención). Además, el objeto de la invención se refiere a la ciclodextrina, sola o en combinación con metil-jasmonato.

Por lo dicho anteriormente, se considera que la invención cumple los requisitos de novedad y de actividad inventiva.