NUEVO BIORREACTOR PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN

TECNOLOGÍA PATENTADA

DATOS DE CONTACTO:

Relaciones con la Empresa
Oficina de Transferencia de Resultados de la Investigación-OTRI
Universidad de Alicante
Tel.: +34 96 590 99 59
Email: areaempresas@ua.es
http://innoua.ua.es

RESUMEN

El grupo de investigación de Proteómica y Genómica funcional de plantas de la Universidad de Alicante ha diseñado y fabricado un biorreactor tipo columna de burbujeo para realizar, en condiciones asépticas, el cultivo en suspensión de cualquier tipo de célula vegetal. Su novedoso diseño permite, además, recuperar el medio de cultivo, sustituirlo por otro y reutilizar la biomasa remanente para una siguiente operación de cultivo. Este novedoso biorreactor se caracteriza por su bajo coste y porque permite una aireación y agitación homogénea y eficiente del cultivo. Se buscan empresas interesadas en adquirir esta tecnología para su explotación comercial.



INTRODUCCIÓN

El uso de biorreactores está ampliamente extendido para el cultivo de microorganismos (bacterias, hongos, etc.), tanto a escala de laboratorio como a escala industrial. Su diseño, normalmente de tanque agitado mediante dispositivos mecánicos, no siempre es adecuado para el cultivo de células vegetales en suspensión, ya que éstas son muy sensibles al estrés por cizalla, presentan baja demanda de oxígeno, baja tasa de crecimiento y normalmente se presentan como agregados grandes.

Con el objetivo de diseñar un biorreactor apropiado para un determinado bioproceso, es necesario conocer tanto su patrón de crecimiento celular, como su metabolismo y otros factores. Además, es necesario optimizar y controlar los parámetros de operación del biorreactor (concentración de oxígeno disuelto, pH, temperatura, mezclado, suplemento de nutrientes, etc.) para

favorecer las funciones tanto de mantenimiento de las células, como de producción de los metabolitos de interés.

Los actuales biorreactores para el cultivo de células y tejidos vegetales, normalmente de agitación neumática tipo columna de burbujeo o tipo airlift, presentan como principal problema la necesidad de aireación homogénea y constante.

En cuanto a los materiales utilizados en los biorreactores, existe una tendencia a utilizar plásticos de un solo uso, sin embargo, los altos costes en consumibles sólo se justifican si el producto obtenido tiene un alto valor en el mercado (por ejemplo: anticuerpos, vacunas, proteínas terapéuticas, etc. obtenidas mediante el cultivo de células de mamíferos e insectos).

Las células vegetales se cultivan tanto para producir biomasa como para obtener compuestos naturales. En ambos casos, puede ser necesario sustituir el medio de cultivo, lo que supone un problema, ya que la propia manipulación del cultivo implica un riesgo de contaminación y pérdida del cultivo.

DESCRIPCIÓN TÉCNICA

La presente invención soluciona los problemas técnicos descritos anteriormente, y su novedoso diseño permite el cultivo óptimo de cualquier célula vegetal en suspensión, superando así las limitaciones tanto en la producción de biomasa, como de compuestos bioactivos en los que el cambio de medio de cultivo es un requisito.

La invención se refiere a un **nuevo biorreactor** que permite el crecimiento de **células vegetales en suspensión**, en **condiciones asépticas**, en un medio líquido cuya composición satisface los requerimientos nutricionales y fisiológicos de las células en unas condiciones físico-químicas apropiadas.

El biorreactor se compone de las siguientes **tres partes** ensambladas y esterilizadas *(Figura 5)*:

1) Cuerpo *(Figura 1)*: es un recipiente hueco de una sola pieza, de sección circular, con paredes rectas y fondo curvo. El cuerpo comprende una parte esférica y otra cilíndrica de doble pared (con orificios entubados de entrada y salida) por donde puede circular líquido atemperado para regular y mantener constante la temperatura del cultivo. Ambas partes están separadas internamente por una base porosa (de vidrio o acero) cuya porosidad permite el flujo constante y uniforme de fluidos entre ambas, pero no de partículas de tamaño mayor al poro. La parte superior del cuerpo está rematada con un reborde horizontal que permite el apoyo de éste en el soporte, y de la tapa sobre el cuerpo para conseguir un cierre hermético. La parte esférica posee, al menos, dos orificios entubados para la conexión de tubos flexibles y la entrada/salida de fluidos: uno de ellos conectado a una línea de aire estéril (libre de aceite) con flujo regulable, y otro para que circulen líquidos o gases, consiguiendo así un suministro homogéneo de aire al cultivo celular, y una eficaz transferencia de masa. El cuerpo puede ser transparente u opaco, y de vidrio o acero.

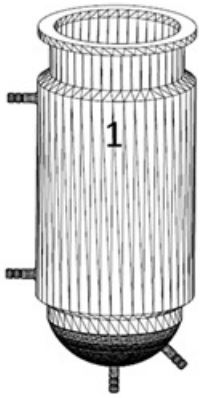


Figura 1: Diseño del cuerpo del biorreactor.

2) Tapa *(Figura 2)*: es una pieza de acero inoxidable de forma cilíndrica maciza con varios orificios para poder atornillarla al soporte y para poder acoplar otros accesorios (tapones, tubos asépticos de muestreo, tubos de llenado, sensores etc.). Se utiliza para cerrar la parte superior abierta del cuerpo. Tiene unas portillas cortas para conectar tubos flexibles para la adición de fluidos y para la entrada/salida de gases. En su cara interna, hay un surco periférico para poder acoplar una junta tórica de caucho o silicona que permita el cierre hermético del biorreactor.

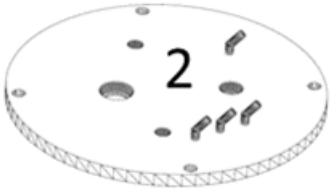


Figura 2: Diseño de la tapa del biorreactor.

3) Soporte *(Figura 3)*: es una pieza de acero inoxidable con al menos cuatro tubos en disposición paralela equidistante, soldados en el extremo de apoyo al suelo a un tubo que forma una circunferencia incompleta, y por el otro, a un aro macizo que tiene varios orificios que coinciden con los de la tapa para que puedan ser acoplados mediante tornillos que atraviesan ambas piezas. El aro tiene unas asas soldadas para facilitar el transporte del biorreactor, y tres piezas de material flexible

atornilladas donde apoya el cuerpo para evitar la fractura del vidrio a causa de las tensiones. El soporte permite la sujeción del cuerpo y de la tapa.

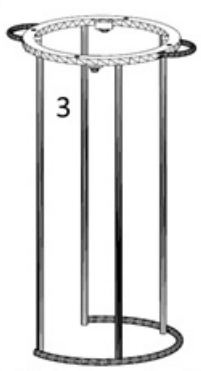


Figura 3: Diseño del soporte del biorreactor.

Adicionalmente, el biorreactor se puede conectar a unos reservorios *(Figura 4)* para el intercambio de líquido. Estos reservorios se conectan mediante tubos flexibles de silicona autoclavables a las entradas y salidas del biorreactor.



Figura 4: Reservorio para el intercambio de líquidos con el biorreactor.

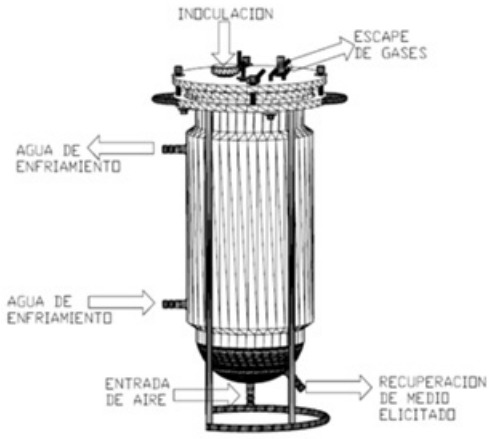


Figura 5: Partes del biorreactor ensambladas.

El flujo de aire puede entrar por la base del cuerpo para airear el cultivo, o por la tapa para el vaciado del líquido hacia un reservorio vacío. También se puede reconfigurar la línea para que, el medio contenido en un reservorio lleno, entrando por la base, pueda ser empujado por presión hacia el biorreactor.

El **funcionamiento** del biorreactor se puede resumir en:

1. Se llevan a cabo las operaciones preparatorias de esterilización.

2. Se procede a llenar o vaciar el biorreactor ensamblado esterilizado: el ciclo de vaciado/llenado en condiciones asépticas se puede repetir tantas veces como se desee *(Figura 6)*.

3. El siguiente paso es el aireado y agitación neumática del biorreactor lleno: el paso del aire se lleva a cabo a través de la base porosa, lo que provoca un efecto difusor en el que el aire difundido en forma de pequeñas burbujas asciende libremente produciendo un efecto de aireación y agitación efectiva.

4. Inoculación del biorreactor en un entorno aséptico: las células vegetales proceden de una suspensión celular obtenida a partir de un callo de células desdiferenciadas a partir de tejido vegetal cultivado *in vitro*.

5. Crecimiento de las células vegetales en modo “lote” a partir del inóculo de suspensión celular anterior. La aireación favorece la homogeneidad y el crecimiento del cultivo hasta que se alcanza la fase estacionaria de crecimiento, o la cantidad de biomasa deseada.

6. Recuperación del cultivo desensamblando la tapa y trasvasándolo a otro recipiente.



Figura 6: Operación de vaciado del biorreactor.

Además, es posible cultivar las células vegetales en modo "lote alimentado" a partir de un cultivo previo in situ. Tras el cultivo en "lote", el medio agotado de nutrientes es desplazado a un reservorio. La biomasa queda retenida en el biorreactor, y éste se llena con medio nuevo rico en nutrientes. Esta operación se puede repetir tantas veces como se desee. Cuando finaliza el último ciclo, el cultivo se recupera como se describe en el punto 6. para el modo "lote".

A continuación se detallan algunos ejemplos de cultivos celulares utilizando el biorreactor aquí descrito (prototipo de 7 litros):

Ejemplo 1: cultivo de una suspensión celular de *Vitis vinifera* en modo "lote" --> la temperatura del cultivo se mantuvo constante a 24ºC y la aireación se ajustó entre 0.3 y 0.6 $l.l^{-1}.min^{-1}$. El cultivo alcanzó la fase estacionaria a los 28 días, incrementándose la biomasa inicial en 7 veces.

Ejemplo 2: producción extracelular del compuesto *trans-resveratrol* en modo "lote" y "lote alimentado" por una suspensión celular de *Vitis vinifera* a 24ºC y aireación 0.43 $l.l^{-1}.min^{-1}$ --> se consiguió obtener una concentración extracelular de trans-resveratrol superior a 3 g/L, pudiendo reutilizar la biomasa obtenida hasta 3 ciclos de producción sin pérdida en el rendimiento. La duración media de cada ciclo fue de 4 días, con una producción media de resveratrol de 15 g/ciclo.

Ejemplo 3: producción extracelular del compuesto *trans-resveratrol* en modo "lote alimentado" acoplado a un cultivo en modo "lote" de una suspensión celular de Vitis vinifera --> se ha realizado un ciclo de cultivo de 8 días a 24ºC y aireación entre 0.47 y 0.54 $l.l^{-1}.min^{-1}$, seguida de 3 ciclos de producción a 24ºC y aireación 0.58 $l.l^{-1}.min^{-1}$, con una duración media de 5 días/ciclo, y con una producción media de *resveratrol* de 12 g/ciclo.

VENTAJAS Y ASPECTOS INNOVADORES

ASPECTOS INNOVADORES Y VENTAJAS DE LA TECNOLOGÍA

El biorreactor aquí descrito posee las siguientes ventajas respecto a los biorreactores comerciales actuales de tanque agitado o airlift de tamaño similar:

1) Se trata de un biorreactor de **bajo coste**.

2) Permite una **aireación** y **agitación** neumática **homogénea** y **eficiente** (incluso a altas densidades celulares).

3) Su diseño permite trabajar en un **entorno aséptico** de forma permanente durante todo el proceso.

4) Su diseño permite, sin necesidad de un entorno aséptico:

- **Recuperar** el medio de cultivo.
- **Sustituir** el medio de cultivo.
- **Reutilizar la biomasa** para una siguiente operación de cultivo.

5) Los materiales utilizados en la construcción del biorreactor son **reutilizables**.

6) El diseño está adaptado a las necesidades de cultivo de **cualquier tipo de célula vegetal** en suspensión.

7) **Reducción del coste** operacional frente a los modelos de un solo uso.

8) Especialmente apto para obtener productos (biomasa y/o metabolitos) cuyo valor comercial en el mercado es bajo o moderado.

9) Diseño adaptado a las necesidades de cultivo de células vegetales en suspensión.

ESTADO ACTUAL

Se ha diseñado y construido un **prototipo** de este novedoso biorreactor, de **7 litros** de capacidad (Figura 7), para las pruebas a **escala de laboratorio** que se han llevado a cabo. En su construcción, se han utilizado **materiales reutilizables** (vidrio y metal). La siguiente tabla muestra las características de transferencia de oxigeno y tiempo de mezclado a diferentes volúmenes de aireación.

Tasas de transferencia de oxígeno y tiempo de mezclado del líquido a diferentes volúmenes de aireación en el BAL2-7L.

Aireación (vvm)	KLa (h^{-1})	Tasa de transferencia de oxígeno(OTR) ($kgO_2.m^{-3}h^{-1}$)	Tiempo de mezclado líquido (t_m, s)	Velocidad de flujo media del líquido (m^3h^{-1})
0,31	42,87	0,3725	28,75	0,8139
0,46	49,21	0,4276	25,15	0,9304
0,62	55,80	0,4847	22,87	1,0231
0,77	71,31	0,6197	21,25	1,1013



Figura 7: Prototipo del biorreactor.

El análisis de capacidad antioxidante mediante ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) del **trans-resveratrol** obtenido a partir de cultivos celulares de Vitis vinifera utilizando este prototipo, tiene un valor relativo ORAC=4,4, mientras que el trans-resveratrol comercial de pureza >98% tiene un ORAC=4,68, por tanto, el **poder antioxidante** del producto obtenido es de un **94%** comparado con el producto puro.

Tras haber realizado un análisis de costes, se ha llegado a la conclusión que la **producción comercial** de trans-resveratrol utilizando cultivos celulares de Vitis vinifera con este biorreactor, se sitúa en torno a **500 €/Kg**.

APLICACIONES DE LA OFERTA

La presente invención se enmarca en el campo de la **Biotecnología**, y en particular, se refiere a un biorreactor para llevar a cabo, en condiciones asépticas, el cultivo de células vegetales en suspensión con el objetivo de obtener biomasa o metabolitos de interés comercial para los siguientes sectores:

- Cosmético.
- Farmacéutico.
- Limpieza e higiene personal.
- Alimentario.
- Agrícola.

COLABORACIÓN BUSCADA

Se buscan empresas interesadas en adquirir esta invención para su explotación comercial mediante:

- Acuerdos de licencia de la patente.
- Acuerdos en materia de transferencia de tecnología y de conocimiento.
- Ofrecer apoyo tecnológico en aquellas técnicas que requieren una alta capacitación o instrumental sofisticado que no esté al alcance de la empresa solicitante.

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

La presente invención se encuentra protegida mediante **patente concedida con examen previo**:

- *Título de la patente: "Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión".*
- *Número de solicitud: P201730479.*
- *Fecha de solicitud: 30 de marzo de 2017.*

SECTORES DE APLICACIÓN (6)

Agroalimentación y Pesca
Biología
Biología Molecular y Biotecnología
Farmacéutica, Cosmética y Oftalmológica
Ingeniería, Robótica y Automática
Medicina y Salud