

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 706**

21 Número de solicitud: 201730836

51 Int. Cl.:

C12N 5/04

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.06.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.12.2018

71 Solicitantes:

AGRÍCOLA SANTA EULALIA, S.L. (50.0%)
DIP. LEBOR ALTO S/N
30850 TOTANA (Murcia) ES y
UNIVERSIDAD DE MURCIA (50.0%)

72 Inventor/es:

SABATER JARA, Ana Belén;
SÁNCHEZ PUJANTE, Pedro Joaquín;
BORJA MARTÍNEZ, María y
PEDREÑO GARCÍA, María Ángeles

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSINOLATOS EN CULTIVOS CELULARES**

57 Resumen:

Procedimiento para incrementar la producción de glucosinolatos en cultivos celulares.

La presente invención se refiere a un procedimiento para incrementar la producción de glucosinolatos en cultivos celulares adicionando al medio de cultivo coronatina (análogo estructural y funcional del precursor octadecanoide del jasmonato de metilo) o jasmonato de metilo. También se refiere al uso de un medio de cultivo que comprende coronatina o jasmonato de metilo para incrementar la producción de glucosinolatos en células vegetales potencialmente productoras de los mismos.

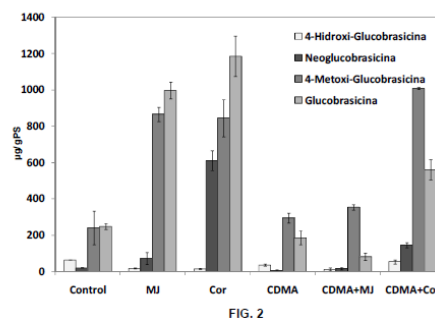


FIG. 2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para incrementar la producción de glucosinolatos 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 de glucosinolatos a partir de cultivos de células vegetales mediante la adición al medio de cultivo de coronatina (un análogo estructural y funcional del precursor octadecanoide del jasmonato de metilo) o jasmonato de metilo y, opcionalmente, ciclodextrinas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) también conocido como brécol, o bróculi, es una planta comestible que pertenece a la familia de las brasicáceas o crucíferas, al igual que la col, las coles de Bruselas, la coliflor, el rábano, el repollo y la rúcula.

20

Las plantas pertenecientes a la familia *Brassicaceae* (crucíferas) se caracterizan por poseer una gran cantidad de compuestos fitoquímicos, apareciendo la mayor concentración de estos en un estado fisiológico juvenil (en forma de brote), a diferencia del estado fisiológico adulto con menor contenido fitoquímico, debido a la dilución de estos compuestos provocada por el crecimiento de los diferentes tejidos. Dentro de esta familia de plantas, el brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) se caracteriza por ser una hortaliza con efectos beneficiosos para la salud, cuya producción mundial (junto con la coliflor) ha ido incrementando en las últimas décadas alcanzando una producción mundial de 24.175.000 de toneladas.

25

30

Durante las últimas décadas, se ha prestado especial atención a los compuestos bioactivos naturales con potencial para el tratamiento y la prevención de enfermedades humanas. Los compuestos bioactivos presentes en frutas y hortalizas, son productos del metabolismo secundario de los vegetales, que se encuentran en cantidades pequeñas en las plantas, con respecto a otros macronutrientes, pero que contribuyen significativamente a la regulación de los mecanismos de protección frente a situaciones de estrés y tienen propiedades biológicas de interés para la prevención de algunas enfermedades en los humanos que los consumen. Además, contribuyen al

35

mantenimiento de los tejidos corporales, aumentan la resistencia a las infecciones, regulan el correcto desarrollo del sistema nervioso e intervienen en el crecimiento, y resultan beneficiosos para la síntesis de enzimas en el hígado (Hooper, L., & Cassidy, A. (2006). A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12), 1805-1813) .

Entre los compuestos bioactivos del brócoli, cabe destacar los glucosinolatos y los compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos hidroxicinámicos), además de otros nutrientes como carotenoides, esteroides, vitamina C, contenido en fibra y elementos minerales esenciales para la salud. Los glucosinolatos, también llamados tioglucósidos, son metabolitos secundarios aniónicos nitrógeno-azufrados que se encuentran casi exclusivamente en plantas de la familia *Brassicaceae* (crucíferas), entre ellas el brócoli, donde alcanzan la mayor concentración, es decir, son los compuestos bioactivos por excelencia del brócoli. El esqueleto básico de los glucosinolatos (β -D-tioglucósido-N-hidroxisulfato) consiste en un grupo β -D-tioglucosa, una oxima sulfonada y una cadena lateral derivada de los aminoácidos metionina, fenilalanina, o triptófano con una cadena lateral variable. La estructura química de los glucosinolatos y su contenido pueden variar entre especies y entre variedades dentro de la misma especie. En la actualidad se conocen más de 120 tipos de glucosinolatos en las crucíferas, siendo los más abundantes en brócoli la glucorafanina (80%), la glucobrasicina (8%), la 4-metoxi-glucobrasicina (4%) y la 1-metoxi-glucobrasicina (4%). Entre los compuestos de degradación de los glucosinolatos se encuentran los isotiocianatos comúnmente denominados “aceites de mostaza”, siendo el sulforafano el principal isotiocianato encontrado en el brócoli.

Los glucosinolatos son compuestos beneficiosos para la salud humana (ya que en algunos casos pueden ofrecer protección frente a algunos tipos de cáncer como el de pulmón, mama, colon y próstata Jeffery EH, Araya M. 2009. Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry Reviews* 8 (1): 283-298.). Sin embargo, estos metabolitos no son bioactivos en el animal que los consume hasta que han sido hidrolizados a isotiocianatos por la enzima mirosinasa. De hecho, los isotiocianatos son agentes preventivos del cáncer debido a su capacidad para inducir enzimas de fase II de desintoxicación tales como las quinonareductasas y las glutathione-S-transferasas. El sulforafano, que es el producto de hidrólisis del glucosinolato glucorafanina es un mono-inductor muy potente del metabolismo de la fase II. Induce

la apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral durante las fases de iniciación, promoción y progresión (Mi LX, Wang XT, Govind S, Hood BL, Veenstra TD, Conrads TP, Saha DT, Goldman R, Chung FL. 2007. The role of protein binding in induction of apoptosis by phenethylisothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells.

- 5 Cancer Research 67: 6409-6416). También, recientemente se ha descrito el tratamiento con sulforafano en varios tipos de autismo con resultados positivos, observándose una mejoría significativa en pacientes que consumían brócoli de manera regular frente a aquellos que no lo consumían (Singh K, L. Connors S, A. Macklin E, D. Smith K, W. Fahey J, Talalay P, W. Zimmerman A. 2014. Sulforaphane treatment of
10 autism spectrum disorder (ASD). PNAS. vol. 111 no. 43, 15550-15555).

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios que van a ser sintetizados y almacenados por las células vegetales para responder a diferentes estreses a los que se ven sometidas, de modo que su producción en células vegetales es aumentada por
15 moléculas señalizadoras o elicitores que actúan como mensajeros químicos en la planta para contrarrestar el estrés biótico o abiótico al que se ve sometido la planta.

El cultivo de células vegetales constituye una prometedora alternativa para la producción de compuestos naturales difíciles o poco rentables de preparar por síntesis química o que suponen graves agresiones al medio ambiente al recurrir a la fuente
20 natural.

En este sentido, el cultivo *in vitro* de células vegetales ha abierto nuevos caminos como fuente renovable de compuestos bioactivos de gran valor añadido debido a las ventajas que presenta su utilización:

- 25 - son independientes de factores geográficos, estacionales y ambientales.
- constituyen sistemas de producción estables ya que aseguran la obtención continua de compuestos con calidad y productividad uniformes
- los requerimientos de espacio para el desarrollo de la producción son reducidos.
- el proceso de purificación de los compuestos de interés es más fácil y se optimiza
30 cuando éste se libera al medio de cultivo y se puede realizar a gran escala.
- permite obtener nuevos compuestos que no son sintetizados por las plantas de forma natural.

Hasta la fecha, no existen estudios previos donde se utilicen los cultivos celulares de
35 brócoli para la producción de metabolitos de interés. Sin embargo, la adición exógena

de diversos elicitores (ácido salicílico o jasmonato de metilo (MJ)) a pellas de brócoli se ha usado con anterioridad para mejorar su composición fitoquímica. En este sentido Baenas et al., 2014 (Baenas, N.; García-Viguera, C.; Moreno, D.A. Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in brassicaceae sprouts. J. Agric. Food Chem. 2014, 62, 1881–1889) mostraron que MJ provocó un aumento de la cantidad total de glucosinolatos en brotes de *Brassica oleracea* var. italica, correspondiendo la mayor producción a los glucosinolatos indólicos y glucorafanina, mientras que ácido salicílico produjo un menor aumento de la cantidad de glucosinolatos totales en estos brotes. Además, se ha descrito que una concentración de 250 μ M de MJ aplicada a pellas de brócoli produjo un aumento tanto de glucosinolatos como de sus productos de degradación entre un 10 y un 300% (Ku KM, Jeffery EH, Juvik JA (2013) Influence of seasonal variation and methyl jasmonate mediated induction of glucosinolate biosynthesis on quinone reductase activity in broccoli florets. J Agric Food Chem 61: 9623-9631). Sin embargo, concentraciones menores de MJ (5-100 μ M) no parecieron tener efecto en el contenido de glucosinolatos, a excepción de un incremento del 10% de indol-glucosinolatos cuando se aplicaba MJ a una concentración de 10 μ M (Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C (2011) Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. Food Chem 129: 35-44).

Por otra parte, Álvarez et al. (2008) (Alvarez, S., He, Y., Chen, S. (2008). Comparative Investigations of the Glucosinolate–Myrosinase System in Arabidopsis Suspension Cells and Hypocotyls. Plant Cell Physiol. 49(3), 324-333) mostraron que suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* derivadas de hipocótilo sintetizaron 7 glucosinolatos diferentes, entre los que se encontraron glucosinolatos indólicos o glucorafanina, algunos de los cuales estuvieron presentes en mayor cantidad que en el tejido de vegetal que dio origen a la suspensión celular. En conjunción a esto, este grupo mostró que la elicitación del cultivo celular con MJ provocó un considerable aumento de la producción de glucosinolatos, demostrando también un aumento de la actividad mirosinasa en suspensiones celulares *A. thaliana* tratadas con MJ.

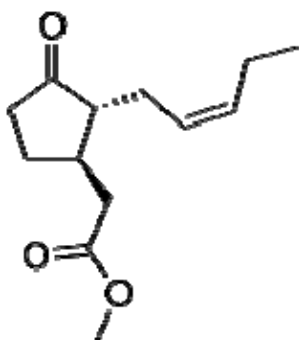
Sin embargo, en ningún caso se describe el uso de coronatina o MJ como estimulador de la producción de glucosinolatos en cultivos celulares de brócoli. En ese sentido, se ha observado que la coronatina, una toxina producida por *Pseudomonas syringae* (Weiler, E. W., Kutchan, T. M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., & Bublitz, F. (1994). The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling

molecules of higher plants. *FEBS letters*, 345(1), 9-13), es un análogo estructural de la forma activa el jasmonato de metilo (JA-Ile) y ha resultado ser un potente elicitor para la producción de taxanos y *trans*-resveratrol en cultivos celulares de *Taxus* sp y *Vitis vinífera*, respectivamente (Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusidó, R. M.,
 5 Goossens, A., & Palazón, J. (2013). Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *Journal of plant physiology*, 170(2), 211-219; Almagro, L., Belchí-Navarro, S., Martínez-Márquez, A., Bru, R., & Pedreño, M. A. (2015). Enhanced extracellular production of *trans*-resveratrol in *Vitis vinífera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and coronatine. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 361-367).

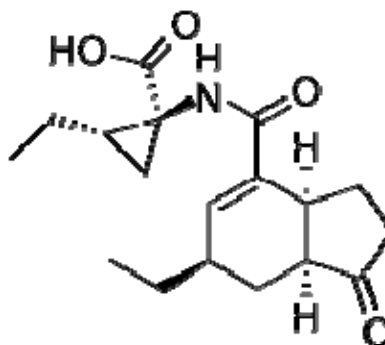
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El incremento de la síntesis de glucosinolatos se ejemplifica en cultivos celulares de *Brassica oleracea* variedad italiana cv Chronos, una de las especies productoras de
 15 glucosinolatos más importantes. Los autores de la presente invención han observado que estableciendo cultivos de células vegetales y adicionando al medio de cultivo coronatina o jasmonato de metilo, se incrementa el rendimiento de producción y extracción de glucosinolatos.

20



25



Jasmonato de metilo

Coronatina

30

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención es el incremento de la producción de glucosinolatos, que comprende:

- la adición de coronatina o jasmonato de metilo a un medio de cultivo,
- poner en contacto células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos
 35 con el medio de cultivo de (a),

- c. la incubación de las células vegetales del paso b) en el medio de cultivo del paso a),
- d. la separación de los glucosinolatos obtenidos tras el paso c) del cultivo celular.

Se entiende por células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos, cualquier línea celular capaz de producir glucosinolatos, bien de forma natural o tras modificación genética.

Cualquier tejido o célula vegetal capaz de producir glucosinolatos puede ser empleado en la invención. Esto incluye aquellas células procedentes de un organismo que, aunque no posean de forma natural la capacidad de sintetizar glucosinolatos, ha adquirido dicha capacidad mediante procesos de manipulación genética.

En una realización preferida de la invención, son tejidos o células vegetales procedentes de plantas de especies del orden *Brassicales*. En otra realización más preferida pertenecen a la familia *Brassicaceae*. En otra realización aún más preferida, pertenecen al género *Brassica*, en otra realización particular de la invención, pertenecen a la especie *Brassica oleracea* L. var. *italica* cv Chronos.

También se entienden como células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos aquellas que provienen de vitroplantas, órganos o tejidos de dichas vitroplantas, preferiblemente hojas de vitroplantas.

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.

Taxonómicamente *Brassica oleracea* L. var. *italica* cv Chronos se define como un organismo celular, que pertenece al supereino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, phylum *Streptophyta*, orden *Brassicales*, familia *Brassicaceae*, tribu *Brassiceae*, género *Brassica*.

El término "cultivo de células" en esta memoria, hace referencia a un cultivo de células aisladas del mismo o diferente tipo de tejido, 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 (grupos 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, anteras, pistilos,
5 flores, semillas, vainas o vástagos de las plantas.

En otra realización preferida de la presente invención, la concentración de jasmonato de metilo 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
10 micromoles/L medio de cultivo y aún más preferiblemente de entre 75 y 125 micromoles/L medio de cultivo.

En otra realización preferida de la presente invención, la concentración de coronatina es de entre 0.1 y 100 micromoles/por litro de medio de cultivo. Más preferiblemente la
15 concentración de coronatina es de entre 0.5 y 50 micromoles/L medio de cultivo y aún más preferiblemente de entre 0.75 y 10 micromoles/L medio de cultivo.

Opcionalmente, en la etapa a) se pueden adicionar, además del coronatina o jasmonato de metilo, ciclodextrinas al medio de cultivo.

20 Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos y se obtienen a partir de la 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
25 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.

Así, en otra realización preferida de la invención, las ciclodextrinas se eligen del grupo
30 que comprende ciclodextrina metilada aleatoriamente (CDMA).

Preferiblemente, el grado de sustitución por metilos por unidad de glucosa (anhidra) de la CDMA es de entre 1 y 3. En particular, el grado de sustitución por metilos por unidad de glucosa (anhidra) de la CDMA es de 2. En otra realización preferida de este

aspecto de la invención un maltooligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de tipo $\alpha(1 \rightarrow 4)$ (β -ciclodextrinas).

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención la concentración de ciclodextrinas es de entre 6,5 y 130 g/L 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.

10 En otra realización preferida de la invención, la concentración celular es de entre 10 g peso fresco (pf)/l, 1g peso seco (ps)/l y 300 gpf/l, 15 gps/l. Más preferiblemente, la concentración celular es de entre 100 gpf/l, 5 gps/l y 250g pf/l, 10 gps/l.

15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende coronatina o jasmonato de metilo para incrementar la producción de glucosinolatos en células vegetales con el potencial de producir glucosinolatos.

20 En una realización preferida, la composición de la invención comprende, además de coronatina o jasmonato de metilo, ciclodextrinas.

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 coronatina o jasmonato de metilo para incrementar la producción de glucosinolatos y en células vegetales con el potencial de producir glucosinolatos.

25 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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y
30 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: Gráfica que muestra la producción total de glucosinolatos en cultivos celulares de *B. oleracea* var. *italica* cv Chronos en respuesta a los diferentes elicitores tras 168 h de incubación.

5 **FIG. 2:** Gráfica que muestra la producción de 4-hidroxi-glucobrasicina, glucobrasicina, 4-metoxi-glucobrasicina y neoglucobrasicina por suspensiones celulares de *B. oleracea* var. *italica* cv Chronos en respuesta a diferentes elicitores tras 168 h de incubación.

10 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto el efecto del uso de coronatina o jasmonato de metilo y opcionalmente, ciclodextrinas en la producción de glucosinolatos mediante la
15 utilización de suspensiones celulares de *B. oleracea* L. var *italica*. cv Chronos.

Preparación y mantenimiento de material vegetal

Línea celular: *Brassica oleracea* L. var. *italica* cv Chronos

Para la inducción de callos de brócoli se utilizaron vitroplantas que se obtuvieron por
20 germinación *in vitro* de semillas.

Germinación *in vitro* de semillas de brócoli

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
25 diferentes órganos de la planta: raíz, tallo y hoja.

Para obtener las vitroplantas de brócoli se utilizaron semillas que 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
30 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 y Skoog (1962) (Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497), suplementado con pantotenato cálcico (1mg/l),
35

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 6,0 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 minutos a 1.2 atmósferas de
5 sobrepresión, adquiriendo la consistencia sólida mediante la adición de agar purificado (6,2 g/l) cuando el medio se enfría.

Obtención de callos y mantenimiento de suspensiones celulares de brócoli

Los hipocótilos de las vitroplantas se utilizaron como fuente de explanto. Las placas
10 Petri con los explantos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a una irradiancia de 17,4 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 benciladenina (10 mg/l).

15 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 17 días.

20 Elicitación de las células

En cada experiencia de elicitación se tomaron, en condiciones de esterilidad, entre 90 y 240 g 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 que contenían el medio fresco suplementado

25 - solo con jasmonato de metilo (en adelante, MJ) a una concentración 100 micromolar.
- solo con coronatina (en adelante, Cor) a una concentración 1 micromolar
- sólo con una β-ciclodextrina metilada aleatoriamente con un grado de sustitución por metilos de entre 1,6 y 1,9 (en adelante, CDMA) a una concentración de 62,4 g/l.
- con ciclodextrinas anteriormente mencionadas (CDMA) a una concentración 62,5 g/l
30 y con jasmonato de metilo (MJ) a una concentración 100 micromolar.
- con ciclodextrinas anteriormente mencionadas (CDMA) a una concentración 62,5 g/l y con coronatina (Cor) a una concentración 1 micromolar.

El jasmonato de metilo se esteriliza aparte del medio por filtración, disuelto en etanol, y posteriormente se mezcla con el resto del medio estéril. La concentración final de
35 etanol en el medio de cultivo es de 0,2% en volumen.

Los matraces se incubaron en las mismas condiciones descritas anteriormente para su mantenimiento en medio líquido durante 168 horas.

Muestreo y preparación de muestras para análisis

- 5 Los cultivos incubados con elicitores se recogieron cada cierto tiempo para su análisis. Las células fueron separadas del medio por filtración realizando un ligero vacío, y se utilizaron para la extracción de los compuestos y posterior análisis por HPLC acoplado a un espectrómetro de masas.

10 Análisis de glucosinolatos

- Una vez realizados los experimentos de elicitación, la extracción de los compuestos presentes en las células de brócoli, se realizó añadiendo 4,5 mL de metanol al 70% a 0,2 g de material vegetal previamente liofilizado. A continuación, las muestras se incubaron en un baño a 73°C durante 20 minutos. Durante el tiempo de incubación las muestras se agitan vigorosamente cada 5 minutos, con el fin de favorecer la eficiencia del proceso de extracción. Transcurrido ese tiempo las muestras se dejaron enfriar en hielo. Posteriormente las muestras se centrifugaron 15 minutos a 10000 rpm y 4°C. Se guardó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 3 ml de metanol al 70%, para después agitar y volver a centrifugar 15 min, a 10000 rpm y 4°C. Tras la centrifugación, se mezclaron ambos sobrenadantes y se concentraron en un rotavapor. El residuo seco se resuspendió en 2 ml de agua ultrapura y se filtró a través de membranas inorgánicas de 0,22 µm de poro para su análisis por HPLC-MS.

- La identificación y cuantificación de los glucosinolatos se realizó en un cromatógrafo (Agilent Series 1200, Agilent Technologies) acoplado a un detector espectrómetro de masas triple cuadrupolo (MS/MS), con fuente de ionización por electrospray (ESI) operando en modo negativo. Para ello, se utilizó nitrógeno como gas nebulizador a una presión de 60 psi y ajustándose el flujo a 13 L/ min. La temperatura y el voltaje del capilar se mantuvieron a 350 °C y 4 kV, respectivamente. La separación cromatográfica se realizó en una columna Luna C18 (250 mm × 46 mm, tamaño de partícula de 5 µm; con precolumna C18-ODS (4 × 30 mm)).

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

EJEMPLO 1: Elicitación de células de brócoli (*Brassica oleracea* L. variedad italiana cv Chronos) con coronatina (Cor), jasmonato de metilo (MJ) y/o ciclodextrinas (CDMA)

- 5 Las suspensiones de *Brassica oleracea* L. variedad italiana cv Chronos se trataron con:
- controles sin CDMA, MJ ni Cor
 - con MJ (100 micromoles/l)
 - con Cor (1 micromol/l)
 - con CDMA (62,5 g/l)
- 10 - con CDMA (62,5 g/l) y MJ (100 micromoles/l)
- con CDMA (62,5 g/l) y Cor (1 micromol/l)

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en matraces de 250 ml de capacidad conteniendo 100 ml de medio de cultivo. Al cabo de 168 horas, se recolectaron las células, se pesaron y se determinó la cantidad total de glucosinolatos en el interior celular. El resultado del experimento se muestra en la Tablas A y B y Figura 1 y 2.

20 Cuando el cultivo se elicitó solo con MJ o Cor, se observó una acumulación de glucosinolatos por unidad de biomasa superior a cualquiera de los tratamientos realizados.

Por otro lado se observó que no existían diferencias significativas con los distintos tratamientos tras 168 horas de elicitación en la producción de glucosinolatos.

25 Además, la producción de glucobrasicina y 4-metoxi-glucobrasicina representó más del 85% del total de los glucosinolatos producidos alcanzando valores máximos de 996.68 ± 46.30 y 865.70 ± 39.16 $\mu\text{g/g}$ ps, respectivamente en el tratamiento sólo con MJ siendo los valores alcanzados tras el tratamiento con coronatina de 1185.96 ± 111.06 y 843.35 ± 101.28 $\mu\text{g/g}$ ps de glucobrasicina y 4-metoxi-glucobrasicina,

30 respectivamente

TABLA A: Producción de glucosinolatos en $\mu\text{g/gps}$ de *B. oleracea* var italiana cv Chronos tras 168 horas de incubación.

35 Densidad celular: 12 g ps/l

Control: medio de cultivo sin elicitores

MJ: tratamiento con 100 micromoles/l

Cor: tratamiento con 1 micromol/l

CDMA: tratamiento con 62,5 g/l

- 5 CDMA+MJ: tratamiento con 62,5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MJ
CDMA+Cor: tratamiento con 62,5 g/l de CDMA combinado con 1 micromol/l de Cor

	Total glucosinolatos µg/g PS
Control	571.51 ± 118.24
MJ	1950.82 ± 515.36
Cor	2653.34 ± 608.92
CDMA	522.59 ± 75.46
CDMA+MJ	462.03 ± 50.71
CDMA+Cor	1767.82 ± 85.48

10

TABLA B: Producción de glucobrasicina, 4-metoxi-glucobrasicina, 4-hidroxiglucobrasicina y neoglucobrasicina en µg/g PS de *B. oleracea* var *italica* cv Chronos tras 168 horas de incubación.

- 15 Densidad celular: 12 g ps/l

Control: medio de cultivo sin elicitores

MJ: tratamiento con 100 micromoles/l

Cor: tratamiento con 1 micromol/l

CDMA: tratamiento con 62,5 g/l

- 20 CDMA+MJ: tratamiento con 62,5 g/l de CDMA combinado con 100 micromoles/l de MJ
CDMA+Cor: tratamiento con 62,5 g/l de CDMA combinado con 1micromol/l de Cor

25

µg/gPS	4-Hidroxi- Glucobrasicina	Glucobrasicina	4-Metoxi- Glucobrasicina	Neoglucobrasici- cina
Control	63.39±0.14	247.31±16.27	240.87±92.61	19.93±1.54
MJ	16.67±2.10	996.67±46.30	865.69±39.16	71.768±32.46
Cor	13.92±2.64	1185.96±111.07	843.34±101.28	610.11±53.93
CDMA	36.36±5.62	186.54±38.53	294.24±27.44	5.44±3.87
CDMA + MJ	10.88±7.97	81.15±21.39	354.12±15.18	15.87±6.17
CDMA+ Cor	53.26±11.16	560.79±56.69	1008.70±4.64	145.05±12.99

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para incrementar la producción de glucosinolatos en cultivos celulares, que comprende:
 - 5 a. la adición de coronatina o jasmonato de metilo a un medio de cultivo,
 - b. poner en contacto células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos con el medio de cultivo del paso (a),
 - c. la incubación de las células del paso (b) en el medio de cultivo del paso (a), y
 - d. la separación de los glucosinolatos obtenidos tras el paso (c) del cultivo celular.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde las células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos del paso (b) son células vegetales procedentes de plantas del orden *Brassicales*.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde las células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos son células vegetales procedentes de plantas que se seleccionan de la familia *Brassicaceae*.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos son células vegetales procedentes de plantas del género *Brassica*.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos son células vegetales procedentes de *B. oleracea* var *italica*.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde las células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos proceden de vitroplantas.
- 30 7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde las células vegetales potencialmente productoras de glucosinolatos proceden de hojas de vitroplantas.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la etapa a) comprende la adición de jasmonato de metilo al medio de cultivo y donde la

concentración de jasmonato de metilo en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 5 y 500 micromoles/ litro.

5 9. Procedimiento según reivindicación 8, donde la concentración de jasmonato de metilo en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 25 y 150 micromoles/ litro.

10. Procedimiento según reivindicación 9, donde la concentración de jasmonato de metilo en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 75 y 125 micromoles/ litro.

10 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la etapa a) comprende la adición de coronatina al medio de cultivo y donde la concentración de coronatina en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 0.1 y 100 micromoles/ litro.

15 12. Procedimiento según reivindicación 11, donde la concentración de coronatina en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 0.5 y 50 micromoles/ litro.

13. Procedimiento según reivindicación 12, donde la concentración de coronatina en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 0.75 y 10 micromoles/ litro.

20 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde además se añaden ciclodextrinas al medio de cultivo en el paso (a).

15. Procedimiento según reivindicación 14, donde las ciclodextrinas se seleccionan del grupo que comprende ciclodextrina metilada aleatoriamente.

25

16. Procedimiento según la reivindicación 15 donde la ciclodextrina metilada aleatoriamente tiene un grado de sustitución por metilos de entre 1 y 3.

17. Procedimiento según la reivindicación 16 donde la ciclodextrina metilada aleatoriamente es dimetilada.

30

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 donde la ciclodextrina es una β -ciclodextrina.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18 donde la concentración de ciclodextrinas en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 6,5 g/l y 130 g/l.
- 5 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19 donde la concentración de ciclodextrinas en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 10 g/l y 100 g/l.
21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20 donde la
10 concentración de ciclodextrinas en el medio de cultivo del paso (a) es de entre 50 g/l y 75 g/l.
22. Uso de un medio de cultivo que comprende coronatina o jasmonato de metilo para incrementar la producción de glucosinolatos en células vegetales potencialmente
15 productoras de los mismos.
23. Uso de una composición según la reivindicación 22 donde la composición o el medio de cultivo además comprende ciclodextrinas.

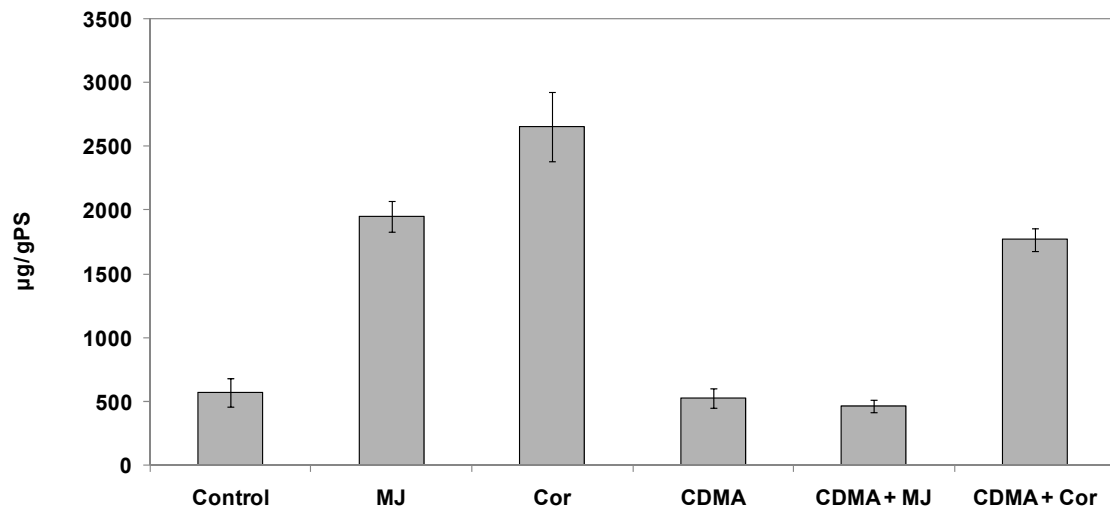


FIG. 1

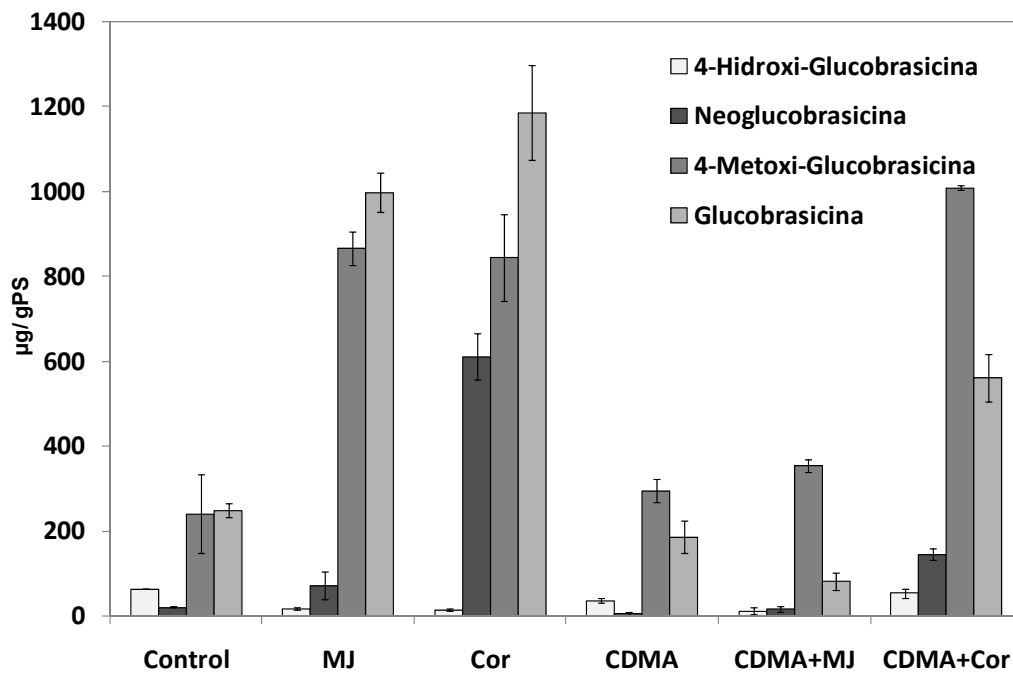


FIG. 2



- ②① N.º solicitud: 201730836
②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.06.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N5/04** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Alvarez Sophie, et al. Comparative investigations of the glucosinolate-myrosinase system in <i>Arabidopsis</i> suspension cells and hypocotyls. <i>Plant and Cell Physiology</i> .2008. Vol. 49(3), páginas 324-333, páginas 324 y 331.	1, 6, 8, 9 y 22
A	Kastell A, et al. Effects of Phytohormones and Jasmonic Acid on Glucosinolate Content in Hairy Root Cultures of <i>Sinapis alba</i> and <i>Brassica rapa</i> . <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> . 2013. Vol. 169, páginas 624 – 635, resumen.	1-23
A	Sánchez-Pujante Pedro Joaquín, et al.Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant <i>in vitro</i> cultures. <i>Planta</i> . 10/05/2017. Vol. 246, páginas 19 – 32, table 1.	1-23

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
30.10.2017

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/2

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

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, XPESP, INTERNET