



## Design of bioprocesses and bioproducts in plant cell engineering

### Diseño de bioprocessos y bioproductos en ingeniería de células vegetales

\*<sup>1</sup>Hebert Jair Barrales-Cureño, <sup>2</sup>César Reyes-Reyes, <sup>1</sup>Maximino Díaz-Bautista, <sup>1</sup>Alejandro Pérez-Rosales, <sup>1</sup>Arturo Castañeda-Mendoza, <sup>2</sup>Jesús Eduardo Zaragoza-Ruiz, <sup>1</sup>Petra Andrade-Hoyos, <sup>3</sup>Alfonso Luna-Cruz, <sup>2</sup>Jordi Orlando Osuna-González, <sup>4</sup>Luis Germán López-Valdez, <sup>2</sup>Salvador Chávez-Salinas

<sup>1</sup>División de Procesos Naturales. Ingeniería Forestal Comunitaria. Universidad Intercultural del Estado de Puebla. Calle Principal a Lipuntahuaca S/N., Lipuntahuaca, Huehuetla, Puebla, C.P. 73475

<sup>2</sup>División de Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Valle de Toluca, Almoloya de Juárez, México.

<sup>3</sup>Catedrático CONACYT-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

<sup>4</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola. AP74 Oficina de correos Chapingo, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco Estado de México, 56230.

\*Corresponding author.

E-mail address: [hebert.jair@uiep.edu.mx](mailto:hebert.jair@uiep.edu.mx) (H. J. Barrales-Cureño).

#### Article history:

Received: 24 March 2017 / Received in revised form: 11 May 2017 / Accepted: 1 June 2017 / Published online: 1 July 2017

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.2.11>

## ABSTRACT

Currently, the effective application of bioprocesses in plant and cell systems has proved to be successful in the production of secondary metabolites. The *in vitro* plant cell culture is an alternative used in their biotechnological production. However, synthesis is a complex factor observed at laboratory tests. The wide range of metabolites that are synthesized by plant cells include drugs, flavors, scents, cosmetics, natural pigments and pesticides. Rheology, aggregation, light, pH, and temperature, are factors considered in the design of bioprocesses and bioproducts, including agitation, blending, aeration, oxygen concentrations and hydrodynamic shear force. Other important elements are the mode of cultivation and the type of bioreactor used. This work presents the advantages and disadvantages observed in the use of bioreactors for plant cell culture. Similarly, it considers the optimal development of secondary metabolites for future investigations when the biosynthesis occurs. Other relevant aspects are also included in this work, such as biosecurity and economy.

**Keywords:** Bioreactors, Drugs, Hydrodynamic Stress, Recombinant Proteins, Rheology, Secondary Metabolites.

## RESUMEN

La aplicación eficaz de bioprocessos en sistemas de células y órganos vegetales presenta actualmente un elevado número de casos exitosos con respecto a la producción de metabolitos secundarios. El cultivo *in vitro* de células vegetales es una alternativa biotecnológica útil en la producción de los mismos siendo que debido a la complejidad que muestran aún no es posible sintetizarlos en laboratorio. La amplia gama de metabolitos que son sintetizados por las células vegetales incluye fármacos, sabores, fragancias, cosméticos, pigmentos naturales y pesticidas. En particular, los factores considerados en el diseño de bioprocessos y bioproductos incluyen a la reología, agregación, luz, pH, temperatura, agitación, mezclado, la aireación y las concentraciones de oxígeno, así como la sensibilidad al estrés hidrodinámico. Otros elementos importantes son el modo de cultivo y el tipo de biorreactor a utilizar. El objetivo de este trabajo es presentar las ventajas y desventajas del uso de biorreactores para el cultivo de células vegetales. De manera similar, se indican las consideraciones necesarias que facilitan el desarrollo óptimo de metabolitos secundarios para futuras investigaciones en el área de la biosíntesis metabólica secundaria. Asimismo, otros aspectos relevantes tales como la bioseguridad y la economía del bioprocreso son incluidos dentro del presente trabajo.

Palabras clave: Biorreactores, Estrés Hidrodinámico, Fármacos, Metabolitos Secundarios, Proteínas Recombinantes, Reología.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las células vegetales son entre diez a cien veces de mayor tamaño que las células microbianas, pero tienen mayor sensibilidad a los esfuerzos de corte, su metabolismo es lento, con tiempos de duplicación de 20 a 100 h y la producción de principios activos tiende a ser reducida. El cultivo *in vitro* de células vegetales se lleva a cabo para producir fármacos, saborizantes, perfumes, cosméticos, pigmentos naturales, pesticidas y metabolitos secundarios de alto valor agregado. Los cultivos *in vitro* pueden generar callos (agregados celulares no diferenciados de tejidos vegetales) que pueden crecer en un medio sólido o en un medio de cultivo en suspensión. El cultivo *in vitro* de células vegetales tiene muchas ventajas, entre ellas, son que se pueden inducir los cultivos independientemente de la localización geográfica o estación, se pueden cultivar meristemos apicales libres de plagas y enfermedades, y se pueden cultivar especies en peligro de extinción. En un biorreactor se pueden estandarizar condiciones para obtener una cantidad y calidad de metabolitos deseada; algunos principios activos pueden alcanzar altos rendimientos en tiempo récord. Existen varios ejemplos de metabolitos secundarios producidos en cultivo sumergido. Por ejemplo, el colorante shikonina es producido comercialmente en Japón en cultivos tipo batch durante tres semanas (Shuler & Kargi, 2002). El fármaco anticancerígeno paclitaxel (taxol) (Barrales & Ramírez, 2013) se extrae originalmente de plantas, pero hoy en día se produce en tanques mecánicamente agitados de 30 m<sup>3</sup> de volumen (Tabata, 2004). Dentro de las aplicaciones industriales, las células vegetales tienen el potencial de utilizarse para producir proteínas recombinantes de alto valor agregado, por ejemplo, la producción de α-1-antitripsina. El objetivo de este trabajo es presentar el diseño

de bioprocesos y bioproductos en ingeniería de células vegetales; se presentan las ventajas y desventajas del uso de biorreactores para el cultivo de células vegetales. De manera similar, se indican las consideraciones necesarias que facilitan el desarrollo óptimo de metabolitos secundarios para futuras investigaciones en el área de la biosíntesis metabólica secundaria. Asimismo, otros aspectos relevantes tales como la bioseguridad y la economía del bioprocreso son incluidos dentro del presente trabajo.

## 2. DISEÑO DE BIOPROCESOS PARA CÉLULAS VEGETALES

### 2.1. Utilización de bioprocessos en cultivos *in vitro* de células vegetales

Las plantas forman parte de nuestra dieta y los componentes de éstas tienen un alto valor nutricional, además de los metabolitos primarios obtenidos, tales como azúcares, lípidos y aminoácidos. Por otro lado, las plantas también sintetizan una amplia variedad de metabolitos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios o productos naturales. Los metabolitos secundarios se definen como compuestos que no juegan un papel importante en el mantenimiento de la vida de la planta, pero son fundamentales en la interacción con el ambiente. En una planta, el rendimiento de estos compuestos es muy bajo (menos del 1 % en peso seco) y depende principalmente del estado fenológico de desarrollo de la planta (Oksman-Caldentey e Inze, 2004). Las plantas superiores contienen compuestos bioactivos o fitofarmacéuticos, los cuales son usados en la industria farmacéutica. Las plantas sintetizan productos naturales e incluyen drogas tales como: morfina, codeína, cocaína, quinina, entre otros; compuestos antileucémicos tales como vincristina y vinblastina, alcaloides aislados a partir de *Catharanthus roseus* (Barrales-Cureño, 2015; Barrales *et al.*, 2017); otros alcaloides que se han obtenido son la atropina a partir de la belladona, colchicina, fitostigminina, pilocarpina, reserpina y esteroides como la diosgenina, digoxina y digitoxina. Muchos de estos metabolitos secundarios están en uso hoy en día, aunque se ha intentado sintetizar químicamente sus sustitutos, pero, estos no poseen la misma eficacia y especificidad farmacológica, además que producen efectos secundarios en los pacientes. En el mercado uno de cada cuatro fármacos son metabolitos obtenidos a partir de plantas, pero también se obtienen compuestos que son semi-sintetizados. Además, el 11 % de los 252 grupos de drogas son básicas y esenciales en las plantas (Rates, 2001).

La prescripción médica de fármacos que contienen fitoquímicos tuvieron un valor en el mercado de más de 30 millones de dólares en el 2002, sólo en Estados Unidos (Raskin *et al.*, 2002). Las plantas cultivadas *in vitro* producen metabolitos secundarios de alto valor agregado y deben mantenerse bajo condiciones óptimas de crecimiento (Rates, 2001). Con respecto a la síntesis química de compuestos derivados de plantas, ésta presenta desventajas tales como que no es económicamente factible o viable debido a que las estructuras químicas son complejas y sus requerimientos son altamente específicos en cuanto a la estereoquímica. Por lo tanto, una estrategia o alternativa es la producción biotecnológica de metabolitos secundarios de alto valor agregado en cultivos sumergidos o en cultivo *in vitro* de órganos para extraer los principios activos de la planta. Sin embargo, el uso de células o cultivo de órganos ha tenido hoy en día avances comerciales limitados. Esto explica la naturaleza empírica de tener cultivos élite de alto rendimiento y estables, así como la falta

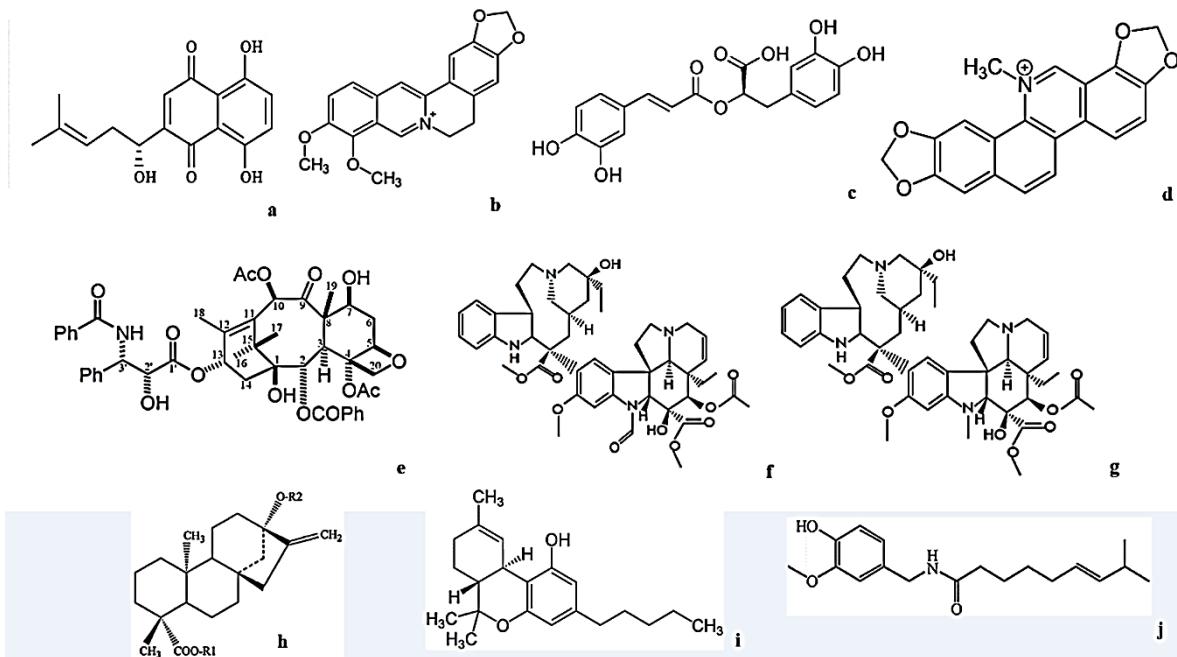
de comprensión de como los metabolitos se sintetizan en función del desconocimiento de las enzimas que interconvierten a los precursores o cómo se regula molecularmente su biosíntesis (Verpoorte & Memelink, 2002).

Se llevan a cabo muchas estrategias experimentales para incrementar la producción de metabolitos secundarios en plantas medicinales. Algunas de estas estrategias incluyen probar y experimentar con los altos rendimientos de una línea celular en particular, modificación del medio de cultivo, precursores de alimentación, retroalimentación, elicidores o inductores de tipo biótico o abiótico, cultivos celulares a gran escala en biorreactores, cultivo de raíces pilosas, inmovilización de células vegetales, biotransformaciones y algunas otras alternativas biotecnológicas (Vanishree *et al.*, 2004). Se han diseñado con éxito varios cultivos *in vitro* de especies de plantas cuya dificultad se basa en obtener concentraciones suficientes de metabolitos secundarios (Rao & Ravishankar, 2002). En muchos casos, la producción de metabolitos secundarios se puede incrementar realizando un tratamiento a las células no diferenciadas, especialmente mediante el uso de elicidores tales como: metiljasmonato, ácido salicílico, quitosano, o con algunos metales pesados (Poulev *et al.*, 2003; Ochoa-Villareal *et al.*, 2016).

En muchos otros casos, los metabolitos secundarios solamente se producen en cultivo *in vitro* de órganos, como las raíces pilosas o en cultivo de teratomas (tipo tumores). Por ejemplo, las raíces pilosas pueden producir altas concentraciones de alcaloides (Sevo'n & Oksman-Caldentey, 2002), mientras que los cultivos en teratomas producen monoterpenos (Spencer *et al.*, 1993). Sin embargo, existen pocos ejemplos donde se utilizan células vegetales como fábricas exitosas para producir metabolitos de alto valor agregado. Entre estos ejemplos, se incluye la producción de shikonina en cultivos sumergidos por *Lithospermum erythrorhizon* y producción de berberina por cultivos *in vitro* celulares de *Coptis japonica* (Yashiki *et al.*, 2010). La producción de ácido rosmarínico por células de *Coleus blumei* ha sido un éxito a escala industrial (Qian *et al.*, 2009), y la sanguinarina, la cual tiene un potencial interesante en la formulación de productos higiénicos y ésta se produce por cultivos de *Papaver somniferum* (Bilka *et al.*, 2012).

Un ejemplo de fármacos anticancerígenos producidos por árboles del tejo (*Taxus spp.*) es el taxol, un fármaco de alto valor agregado (Barrales *et al.*, 2016; Barrales *et al.*, 2015; Barrales & Soto, 2012). Metabolitos secundarios como la vincristina y la vinblastina funcionan como agentes terapéuticos contra la leucemia (Barrales, 2015), serpentina como antihipertensivo a partir de *Rauwolfia serpentina* (Barrales-Cureño *et al.*, 2015). Además, actualmente en cultivos *in vitro* se pueden producir metabolitos secundarios tipo esteviol, tetrahidrocannabinol y capsaicina (Barrales *et al.*, 2016) (Fig. 1).

Con el desarrollo de nuevos bioprocessos y cultivos *in vitro* de órganos, se espera que el número de casos exitosos de producción de metabolitos secundarios se incremente de forma considerable y representen un modelo icónico para futuras investigaciones en el área de la biosíntesis metabólica secundaria. Sin embargo, aún existen cuellos de botella a considerar, tales como mejorar la productividad de los principios activos, así como varias limitaciones técnicas (diseño de biorreactores, mejorar las condiciones de cultivo, por mencionar sólo algunas).



**Fig. 1.** Estructuras químicas de metabolitos secundarios con alto valor agregado. a) Shikonina (288.299 g/mol, C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>); b) Berberina (336.36 g/mol, C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>); c) Ácido rosmarínico (360.31 g/mol, C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>8</sub>); d) Sanguinarina (332.09 g/mol, C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>); e) Taxol (853.90 g/mol, C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub>); f) Vincristina (824.96 g/mol, C<sub>46</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>); g) Vinblastina (810.97 g/mol, C<sub>46</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>); h) Esteviol (318.45 g/mol, C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>); i) Tetrahidrocannabinol (314.46 g/mol, C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>) y j) Capsaicina (305.41 g/mol, C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub>).

## 2.2. Consideraciones de cultivos celulares de células vegetales

Además de los metabolitos secundarios mencionados anteriormente, las células vegetales son capaces de sintetizar sabores, fragancias, pigmentos naturales, pesticidas y farmacéuticos. Normalmente, estos metabolitos se extraen directamente de las plantas con solventes de tipo orgánico. Muchas especies pueden adquirir un estatus de “peligro de extinción” si se continúan dañando los ecosistemas y el medio ambiente en función del cambio climático. Por lo tanto, es necesario tener métodos de bioingeniería para la producción de estos metabolitos a través de cultivos celulares, especialmente aquellos con un valor médico, industrial o importancia socioeconómica. El desarrollo de tecnologías de cultivos *in vitro* celulares es una tecnología viable. De esta forma se está logrando un reemplazo de cultivos de plantas; a través del aislamiento de células, las cuales crecen bajo condiciones fisiológicas definidas y el producto deseado se extrae del cultivo. Los desarrollos recientes de técnicas de cultivo de tejidos reflejan resultados prometedores al incrementarse la productividad de los metabolitos secundarios.

La producción de compuestos farmacéuticos por cultivos *in vitro* celulares o de tejidos ofrece una gran cantidad de ventajas, entre ellas tenemos: control de la producción del metabolito deseado, independientemente de la disponibilidad de la planta en la naturaleza,

cultivo bajo condiciones controladas y optimizadas, mejoramiento de líneas celulares a través de ingeniería genética, que son técnicas similares que se utilizan en sistemas microbianos, no es necesario el uso de herbicidas ni pesticidas, es posible la síntesis de nuevos compuestos que no están presentes en la naturaleza, la producción de metabolitos no depende del clima o ubicación geográfica.

### 2.3. Cultivos sumergidos de células vegetales

El primer paso en un cultivo celular es el desarrollo del cultivo *in vitro* del callo, y éste se obtiene a partir de cualquier órgano vegetal. El callo es una proliferación de una masa de células sin ninguna diferenciación aparente y se obtiene a partir de células que están en división en la planta (Barrales-Cureño *et al.*, 2011).

Para maximizar la síntesis de un compuesto en particular se recomienda iniciar el callo a partir del explante de la planta que contenga el mayor porcentaje del metabolito secundario. El tejido del callo se extrae con solventes para aislar a los principios activos deseados. Sin embargo, desde un punto de vista de ingeniería, el cultivo de células suspendidas tiene un potencial eficaz para aplicaciones industriales a comparación de los tejidos vegetales o cultivo de órganos.

Mientras los cultivos de tejidos y de raíces pilosas ofrecen una estabilidad genética, así como mejores rendimientos metabólicos que un cultivo sumergido de alguna línea celular, el diseño de Biorreactores y las técnicas de operación para promover un mayor rendimiento involucra una alta inversión y experimentación exhaustiva a escala industrial (Flores & Curtis, 1992). Algunas investigaciones se dirigen hacia la comercialización de los metabolitos secundarios. La desventaja que presentan los cultivos en suspensión o callos se refiere a que inicialmente producen el metabolito deseado, pero después de los subcultivos, la capacidad de biosíntesis de los metabolitos disminuye considerablemente en la fase estacionaria. Sin embargo, esta pérdida de productividad se debe presuntivamente al medio de cultivo o a variaciones genéticas. Por lo tanto, es necesario seleccionar y preservar las líneas celulares con los mejores rendimientos.

Un cultivo *in vitro* en suspensión se desarrolla por la transferencia de una porción viable de células del callo al medio líquido (inóculo) y éste se mantiene bajo condiciones apropiadas de aireación, agitación, luz, pH, temperatura y algunos otros parámetros físicos. Sin embargo, existen varias estrategias que se adoptan para obtener una suspensión relativamente homogénea en el cultivo. Por ejemplo, los cultivos sumergidos de *Podophyllum hexandrum* son difíciles de cultivar en laboratorio, debido a la formación de agregados celulares, oscurecimiento del medio de cultivo (fenolización u oxidación) y disminución del pH. Estos problemas se pueden resolver agregando pectinasa, la cual reduce la formación de los agregados y diversas concentraciones de polivinilpirrolidona (PVP), la cual detiene el oscurecimiento del cultivo (Chattopadhyay *et al.*, 2001).

Se ha observado que el desarrollo eficaz para el crecimiento de una población de células vegetales en cultivos sumergidos depende de la fuente de donde se obtuvieron esas células en la planta, estabilidad genética, textura del callo (friable o compacto) y de la combinación de reguladores de crecimiento con el medio de cultivo. La empresa Petroquímica Mitsui en Japón, fue la primera en producir shikonina a escala comercial (Calva & Pérez, 2005). La

compañía también logró diseñar una tecnología de cultivos celulares para producir berberina. Un hito importante fue el cultivo *in vitro* de células vegetales en biorreactores de capacidad de 32,000 L, con el cual se obtuvieron 20 kg de paclitaxel en cada cultivo batch o cultivo discontinuo (Yeon-Sook *et al.*, 2006). Esto se logró por el Corporativo Samyang Genex en Korea. Aunque el cultivo a gran escala de células vegetales es deseable a nivel industrial, existen variables que requieren de supervisión constante. El equipo básico del proceso de un cultivo celular es muy similar a los cultivos microbianos, sin embargo estos sistemas no pueden ser operados de la misma manera, principalmente por la fisiología, metabolismo y patrones de crecimiento (Tabla 1).

**Tabla 1.** Comparación de las características de microorganismos (bacterias) y células vegetales. Adaptado de Chattopadhyay *et al.*, 2002.

Características	Células de levaduras	Células vegetales
Forma	Esféricas, cilíndricas	Esféricas, cilíndricas
Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	2-10	50-100
Patrón de crecimiento	Células individuales	Principalmente agregadas
Tiempo de duplicación (h)	1-2	20-100
Oxígeno (VVM's)	1-2	< 0.5
Tiempo de fermentación	2-10 días	2-4 semanas
Contenido de agua (%)	80	> 90
Sensibilidad a esfuerzos de corte	Insensibles	Muy sensibles
Mecanismos de regulación	Complejo, pero conocido	Muy complejo y desconocido
Estabilidad genética	Estable	Puede ser altamente variable
Acumulación de producto	A veces extracelular	Principalmente intracelular

Las implicaciones de estas diferencias de este cultivo se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Diferencias entre las características de células vegetales y microbianas y sus implicaciones en el diseño de biorreactores. Adaptado de Payne *et al.*, 1987.

Características de una célula vegetal	Características de una célula microbiana
Bajas velocidades de respiración	Se requieren bajas velocidades de transferencia de oxígeno.
Más sensibles al esfuerzo de corte	Requieren de operaciones de bajos esfuerzos de corte; por ejemplo se emplean impulsores con bajos gradientes de deformación y velocidad de Corte o se utilizan biorreactores tipo airlift.
Crecen como agregados celulares	Pueden existir limitaciones de transferencia de masa que a su vez limitan la Transferencia de nutrientes dentro de las células de los agregados.
La agregación estimula la síntesis de metabolitos secundarios	Se requiere de un tamaño de agregado óptimo para la síntesis y se logra mediante la manipulación de los componentes del medio de cultivo y Condiciones ambientales.
Los compuestos volátiles son importantes para el metabolismo ( $\text{CO}_2$ y etileno).	Se necesita un difusor de aire que permita la mezcla de gases.
La síntesis del producto puede o no estar asociada al crecimiento.	Puede requerir de dos etapas de cultivo para maximizar la biosíntesis.

Como se observa, se requieren de ciertas condiciones biológicas y de ingeniería que tienen que ser implementadas antes de escalar el proceso a nivel industrial. Las células vegetales sufren variación genética espontánea en términos de la acumulación de metabolitos secundarios, lo cual conduce a una heterogeneidad en la población celular en un cultivo suspendido. Estas variaciones se conocen como variaciones somacloniales, las cuales modifican a la producción de metabolitos secundarios a gran escala. Las bases genéticas de las variaciones somacloniales no se han estudiado completamente, sin embargo, se ha visto que tienen la ventaja de mejorar las cosechas en ciertos cultivos. Una vez que se establecen las líneas celulares genéticamente estables, se puede comenzar la producción de metabolitos a gran escala. Los mecanismos de regulación de metabolitos secundarios son desconocidos. Los rendimientos de metabolitos se mejorarían si esos mecanismos regulatorios se comprendieran, así como la diferenciación celular, organización intracelular, enzimología y características fisiológicas de las células. Todos estos mecanismos están ligados al metabolismo secundario de células vegetales. Si se tuviera mayor conocimiento de la ingeniería genética de varias rutas metabólicas se podría eventualmente mejorar la producción metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de células vegetales (Memelink *et al.*, 2001).

### 3. CONSIDERACIONES DE INGENIERÍA

Las células vegetales pueden cultivarse de forma exitosa en biorreactores de varias configuraciones a pequeña escala. Sin embargo, la mayoría de las células son sensibles a los esfuerzos de corte, tienen velocidades de crecimiento lentas, requieren poco oxígeno y despliegan rutas metabólicas complejas en cultivos a gran escala. Conforme la escala de operación se incrementa, el mezclado dentro del biorreactor se vuelve difícil; resultando en concentraciones no homogéneas de nutrientes y limitaciones en la transferencia de oxígeno sobre todo a las células que están dentro de los agregados. Los cambios en la reología del fluido, crecimiento de la pared celular y la agregación de las células resultan en una sedimentación, lo cual puede conducir a una subóptima utilización del biorreactor. Esos problemas necesitan un análisis más riguroso, sobre todo para determinar el tipo de biorreactor a usar en cultivos a gran escala para la producción de metabolitos secundarios. (Reyes *et al.*, 2015).

#### 3.1. Reología

En un cultivo de células vegetales, éstas exhiben una amplia variación de formas y tamaños, además de que muchas de ellas forman agregados celulares. Estas propiedades y la alta densidad celular hacen que los cultivos sean altamente viscosos. Esto hace que los tiempos de mezclado y circulación en el cultivo sean mayores provocando la aparición de zonas muertas en el biorreactor; además de que la turbulencia disminuye en cultivos viscosos, existe un efecto en la transferencia de oxígeno y en la distribución de las burbujas de aire. Kieran *et al.*, 1997 reportó que la mayoría de los medios de cultivo muestran un comportamiento no-Newtoniano, básicamente de comportamiento pseudoplástico y este comportamiento está en función de la concentración de biomasa, agregación celular y morfología de las células (Curtis & Emery, 1993). Por otra parte, la acumulación de compuestos extracelulares y proteínas afecta de forma importante la reología del medio de cultivo. Por ejemplo, los cultivos de *Nicotiana tabacum* crecidos en fermentadores de 30 litros acumulan glicoproteínas extracelulares y la viscosidad del medio de cultivo se incrementa de 0.9 a 2.2 cP durante el cultivo (Kato *et al.*, 1978). Si la biomasa se filtra, el valor de la viscosidad de las células se incrementa por un factor de 27.5. Kato *et al.*, (1978) demostraron que la viscosidad se debe principalmente a la concentración de sólidos.

Los modelos de Bingham y de Ostwald de Weale (Ley de la Potencia) se utilizan para describir el comportamiento no Newtoniano de suspensiones celulares. El esfuerzo de corte ( $\tau$ ) se determina mediante la ecuación:

$$\tau = K\gamma^n \quad (1)$$

Donde  $\tau$  es el esfuerzo de corte en Pa,  $\gamma$  es la velocidad de corte ( $s^{-1}$ ), K es el índice de consistencia (Pa  $s^n$ ) y n es el índice de flujo (-). Para el modelo de Bingham; se tiene:

$$\tau = \tau_o + K\gamma^n \quad (2)$$

Donde  $\tau_o$  es el punto de cedencia.

Por analogía a la Ley de Newton de la viscosidad, la viscosidad aparente  $\mu_{ap}$ , se define a partir de la ecuación (1) de la Ley de la Potencia como:

$$\mu_{ap} = K\gamma^{n-1} \quad (3)$$

Por lo tanto:

$$\tau = \mu_{ap}\gamma \quad (4)$$

Recordando que en un fluido no Newtoniano, el valor de la viscosidad depende de la velocidad de corte ( $s^{-1}$ ) con que se mide la viscosidad en un viscosímetro. Pero para determinar los valores de n, K y  $\tau_0$  es necesario el uso de un Reómetro.

El  $\tau_0$  solo se ha determinado en cultivos con *Morinda citrifolia* (Wagner & Vogelmann, 1977), y *Catharanthus roseus* (Vogelmann, 1981), sin embargo Scragg *et al* (1986) reporta que existe evidencia que el punto de cedencia es dependiente de la técnica de medición empleada.

El “*adelgazamiento*” o disminución de la viscosidad aparente debido al esfuerzo de corte aplicado, permite determinar la viscosidad aparente en cualquier punto del biorreactor, así que podríamos esperar que en las zonas muertas del fermentador exista una mayor viscosidad aparente. Si se desarrolla punto de cedencia (yield stress) en un cultivo de células vegetales, esto tiene implicaciones en la aireación del cultivo, es decir, cuando las burbujas se originan desde el difusor, estas pueden permanecer fijas en un lugar por largos períodos de tiempo. Entonces las burbujas circulan con el fluido en lugar de ascender y en un determinado momento se podrían quedar sin oxígeno, pero también los valores de Gas Hold Up en un fermentador podrían ser engañosos si se relacionan con la transferencia de oxígeno.

Las ecuaciones 1 y 2 son válidas bajo condiciones limitadas. Los valores de K y n varían de acuerdo a los cambios de los esfuerzos de corte en un fermentador. En este caso, la conducta reológica de los cultivos de células vegetales es crítico en el diseño de biorreactores, así que conocer estos parámetros es esencial. En el modelo de la Ley de la Potencia, n permanece independiente de la agregación y concentración celular; mientras que el índice de consistencia si dependen de estos. Tanaka (1982) reporta que los valores de K dependen de varias especies es proporcional a la concentración de las células, esta relación es similar al comportamiento del hongo filamento *Paecilomyces varioti* (Laine & Kuoppamäki, 1979). Pocos investigadores reportan las viscosidades aparentes presentes en los cultivos celulares, pero Scragg *et al.*, (1986) estimó la viscosidad aparente de *Catharanthus roseus* en 3 mPas a una velocidad de corte de  $609 s^{-1}$ , para este mismo cultivo Rodríguez-Monroy y Galindo (1999) reportan viscosidades mayores en fermentadores mecánicamente agitados que en cultivos de matraces agitados. Por otro lado, una alternativa biotecnología, podrían ser el uso de hongos endófitos aislados de la corteza de *Taxus spp.* para la producción del fármaco taxol en fermentadores (Barrales-Cureño & de la Rosa, 2014).

### 3.2. Agregación

Las células vegetales son significativamente más grandes y de lento crecimiento que muchas células microbianas. Debido a su tamaño, es necesario encontrar técnicas de cultivo para disminuir su sensibilidad a los esfuerzos de corte. La agregación es un fenómeno

común ya que las células no se pueden separar después de la división celular, aunque en algunos cultivos se ha reportado la secreción de polisacáridos extracelulares en la etapa final del crecimiento, esto puede contribuir a la adhesión entre células (Taticek *et al.*, 1991). La tendencia hacia la agregación celular y crecimiento en la pared del fermentador depende de la especie; para disminuir la agregación celular se adiciona calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Takayama *et al.*, 1977; Sahahi & Shuler, 1982), sorbitol, pectinasa y celulasa (Street, 1973), estas últimas tienen la capacidad de degradar la pared celular y por lo tanto reducen el tamaño de los agregados celulares. En biorreactores el tamaño del agregado celular también depende de la dimensión de los esfuerzos de corte imperantes (Biscaro *et al.*, 2009). El tamaño de la agregación celular se puede controlar cambiando la geometría del biorreactor, así como las condiciones de operación.

### 3.3. Mezclado

El mezclado promueve un mejor crecimiento ya que incrementa la transferencia de nutrientes, en la fase líquida. También promueve la transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa a las células. El mezclado promueve la dispersión de burbujas de aire para una oxigenación óptima. Aunque las células vegetales soportan altos esfuerzos de tensión en comparación con las células microbianas, su sensibilidad al estrés hidrodinámico restringe que sean cultivadas a altas velocidades de agitación. Los altos esfuerzos y velocidades de corte en un cultivo es significado de una buena agitación y de esta manera se reduce el tamaño de los agregados celulares, pero con un efecto adverso en la viabilidad celular, principalmente a la susceptibilidad al estrés hidrodinámico de las células vegetales. Las células vegetales a veces se pueden crecer en fermentadores mecánicamente agitados a muy bajas velocidades de agitación. El mezclado en cultivos de células vegetales a gran escala también es afectado por las características reológicas del medio de cultivo (Bedoya & Hoyos, 2010).

Las suspensiones de células vegetales son viscosas a altas concentraciones celulares y se comportan como fluidos no Newtonianos. Las características del comportamiento no Newtoniano se ha observado en suspensiones de células de *Morinda citrifolia* (Wagner & Vogelman, 1977), *Catharanthus roseus* (Tanaka, 2000), y *Cudrania tricuspidata* (Tanaka, 1982). El comportamiento no Newtoniano de un medio de cultivo afecta a la transferencia de masa y remoción efectiva del calor dentro del biorreactor, conduciendo a una concentración de nutrientes y temperatura no homogéneas, desarrollando así zonas muertas dentro del cultivo. La excreción de polisacáridos en las etapas tardías del crecimiento dependen del tipo de células vegetales y de la fuente de carbono usado para su crecimiento, esto también conduce a un rápido aumento en la viscosidad. Tanaka (2000) estudio el efecto de las altas concentraciones de oxígeno en cultivos de alta densidad celular de *Cudriana tricuspidata*, la cual es una línea altamente sensible a los esfuerzos de corte. En estos cultivos se observan agregados de más de 2 mm de tamaño, los cuales fueron dañados y esto impidió su crecimiento. Se propuso un coeficiente de transferencia de masa ( $K$ ) para un sistema sólido-líquido; para ello se utilizaron nano partículas de naftol y agua, este sistema se propuso como un índice de los efectos del estrés hidrodinámico en suspensiones de células vegetales. Se observó que las células crecen con normalidad a valores de  $K$  menores a  $4.4 \times 10^{-3}$  cm/seg. En este mismo estudio, la intensidad del mezclado en el medio de cultivo y la dispersión de las burbujas de aire fue medido por el  $k_{LA}$  en la presencia de

células vegetales (Tanaka, 2000). Se encontró una relación lineal entre los valores de  $K$  y  $k_{LA}$  para las condiciones usadas en todos los biorreactores, el valor del  $k_{LA}$  fue proporcional a la  $\alpha^{\text{th}}$  potencia de  $K$ , donde  $\alpha$  varía con el tipo de biorreactor. El estudio concluyó que la jarra de biorreactor equipado con impulsor tipo paleta y sin bafles es el diseño más apropiado para cultivar células vegetales a alta densidad. Por otra parte, un mezclado deficiente podría conducir a la formación de agregados celulares, por lo tanto se complica la naturaleza de reacción del sistema, donde las células del interior de los agregados tendrían limitación de nutrientes, lo cual podría tener un efecto adverso o positivo en el crecimiento celular y en la formación del producto (Panda *et al.*, 1989).

Un mezclado homogéneo se alcanza con un diseño adecuado de los impulsores; tal es el caso de los impulsores helicoidales, los cuales se reporta que incrementan la eficiencia del mezclado a altas densidades en cultivos de células vegetales (Jolicoeur *et al.*, 1992). Los impulsores que generan bajos esfuerzos de corte, tal como los impulsores tipo *Setric*, muestran ser efectivos para cultivos muy sensibles al estrés hidrodinámico, tal es el caso del cultivo de *Podophyllum hexandrum* en fermentadores mecánicamente agitados y usados para la producción de podofilotoxina (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

### 3.4. Oxígeno y aireación

Los requerimientos de oxígeno de las células vegetales son comparativamente menores que las de las células microbianas, principalmente por sus bajas velocidades de crecimiento. En algunos casos, las altas concentraciones de oxígeno en el cultivo son tóxicas afectando su metabolismo debido a que el CO<sub>2</sub> es uno de los nutrientes más importantes. Aunque el CO<sub>2</sub> es a veces considerado como nutriente esencial en el cultivo, este también tiene un efecto positivo en la velocidad específica de crecimiento. Los factores que afectan la transferencia de oxígeno en un cultivo dependen del diseño del biorreactor; la intensidad del mezclado, el grado de la dispersión de las burbujas, de las características del medio de cultivo (viscosidad, densidad), y el estrés hidrodinámico dentro del fermentador. Los efectos de la aireación en un cultivo de células vegetales se enfoca principalmente en los valores del  $k_{LA}$  (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno), y su valor depende de la velocidad de agitación y aireación de cualquier sistema. Los valores de  $k_{LA}$  son un reflejo de la capacidad de un fermentador para suministrar oxígeno a un cultivo dado, de ahí la importancia conocer su valor para elegir un biorreactor adecuado para crecer a células vegetales. Por ejemplo, al incrementar la viscosidad del cultivo se disminuyen los valores de  $k_{LA}$ , y cuando esto sucede se recomienda incrementar la velocidad de agitación para un mejor mezclado y transferencia de oxígeno; pero lo anterior requiere de un análisis entre el valor de  $k_{LA}$ , el estrés hidrodinámico causado a las células y el rendimiento obtenido (Leckie *et al.*, 1991). El efecto del  $k_{LA}$  inicial en el crecimiento y la producción de alcaloides por *Catharanthus roseus* se estudió en un biorreactor mecánicamente agitado de 12.5 L, usando dos configuraciones de difusores e impulsores tipo Rushton de 6 paletas planas (Leckie *et al.*, 1991). Por otra parte, se ha observado que los valores altos de  $k_{LA}$ , la síntesis de serentina se produce en la fase exponencial de crecimiento, y la producción de serentina y ajmalicina fue máxima cuando los valores de  $k_{LA}$  alcanzaron valores de 16 h<sup>-1</sup> y 4.5 h<sup>-1</sup>, respectivamente (Leckie *et al.*, 1991). Los valores de  $k_{LA}$  también son importantes para seleccionar el tipo de biorreactor así como su operación en cultivos vegetales de *Cudrania tricuspidata* (Tanaka, 2000).

Una aireación muy alta puede provocar la formación excesiva de espuma, la cual influencia de forma muy importante a la velocidad específica de crecimiento y a la producción de metabolitos secundarios (Zhong *et al.*, 1992). La formación de espuma en cultivos sumergidos de células vegetales se correlaciona con las velocidades de aireación y con la concentración de proteínas extracelulares (Wongasmuth & Doran, 1994). Los antiespumantes más usados en cultivos de células vegetales son: polipropilenglicol 1025 y 2025, un polímero llamado plurónico PE 6100 y antiespumante C, pero en algunos casos reducen la velocidad específica de crecimiento y la formación de producto (Wongasmuth & Doran, 1994).

### 3.5. Sensibilidad al estrés hidrodinámico

La sensibilidad al estrés hidrodinámico de las células vegetales en un cultivo sumergido se asocian al mezclado (aireación y agitación) y esto se atribuye a las características físicas de las células: tamaño, presencia de una pared gruesa de celulosa, y de vacuolas grandes. Los fermentadores mecánicamente agitados a veces pueden sobreairear a los cultivos, además de que inducen daño mecánico y rompimiento de las células a través del estrés mecánico generado por los impulsores, aireación, y otras operaciones (Reyes *et al.*, 2016).

Las velocidades de agitación bajas y altas velocidades de aireación son una estrategia usada en fermentadores mecánicamente agitados para suministrar suficiente oxígeno y obtener un mezclado adecuado (Drapeau *et al.*, 1986). Los biorreactores tipo airlift (levantamiento por aire) se usan para alcanzar altas velocidades de transferencia de oxígeno y crecimiento celular, para disminuir el daño celular y se sabe que generan menor estrés hidrodinámico en cultivos de células vegetales. El estrés hidrodinámico puede ser cuantificado a través de la medición de varias respuestas fisiológicas por parte de las células, tales como la reducción de la viabilidad celular (Scragg *et al.*, 1988), liberación de compuestos intracelulares (Meijer *et al.*, 1993), cambios en la morfología y/o patrones de agregación (Kieran *et al.*, 1995), y cambios en el metabolismo (Zhong *et al.*, 1994). Los efectos del estrés hidrodinámico se han cuantificado en cultivos en matraces y en biorreactores mecánicamente agitados (Kieran *et al.*, 2000). Wagner & Vogelmann (1977) reportaron que las células de *Catharanthus roseus* se destruyen por completo a los 5 días de cultivo si se exponen a una turbina Rushton a una velocidad de 28 rpm, esto corresponde a una velocidad de corte de  $5\text{ s}^{-1}$ . Hooker *et al.*, (1990) demostraron que existe un daño extremo en cultivos de *Nicotiana tabacum* en fermentadores de 3 litros con impulsores de paleta plana, operados a 200 rpm. Por otra parte, Scragg *et al* (1988) crecieron a *C. roseus* en un fermentador mecánicamente agitado de 3 L operado a 500 rpm ( $167\text{ s}^{-1}$  de velocidad de corte promedio), en 5 h el 30 % de las células fueron destruidas, el resto permaneció viable durante todo el cultivo (Scragg *et al.*, 1986).

Existen otros efectos subletales reportados en cultivos de células vegetales. Por ejemplo, en cultivos de *C. roseus* la cantidad de hemicelulosa, celulosa y pectina secretada dependen del estrés hidrodinámico impuesto al cultivo (Tanaka *et al.*, 1988), además de que la pared celular muestra un mayor diámetro. Las células vegetales son más susceptibles al estrés hidrodinámico en la fase tardía y temprana de la fase exponencial, donde estas son más grandes, al igual que sus vacuolas (Hooker *et al.*, 1989). La variación en la resistencia a los esfuerzos de corte depende de la línea celular. Allan *et al* (1988) mencionan que una línea celular desarrolla tolerancia al esfuerzo de corte después de 2 a 5 años de cultivo *in vitro*.

La sensibilidad al esfuerzo de corte se determina cuando se cambia la velocidad de corte, pero en muchos cultivos, el esfuerzo de corte parece ser más importante que la velocidad de corte para estimar la sensibilidad de una determinada línea celular. En cultivos celulares llevados a cabo en fermentadores mecánicamente agitados, los gradientes de velocidades que se encuentran en la punta del impulsor, el daño mecánico es causado por el máximo esfuerzo de corte, más que el promedio, por ejemplo, se reporta que las células vegetales sensibles sufren un esfuerzo de corte a velocidades de agitación de 250 a 1000 rpm (Meijer, 1990).

El estrés hidrodinámico generado en un cultivo celular depende de la hidrodinámica local. De acuerdo a la Teoría de microescala de Kolmogorov, si el tamaño de las eddies es menor al tamaño de una célula, estas causarían un daño importante ya que estas disipan su energía contra las células causándoles daño. El tamaño de las eddies en un flujo turbulento se puede determinar mediante la escala de Kolmogorov:

$$\lambda = \left( \frac{v^3}{\epsilon} \right)^{1/4} \quad (5)$$

En fermentadores industriales, el tamaño de la eddie se encuentra entre 30-100  $\mu\text{m}$ , las eddies pequeñas usualmente se producen en fermentadores de laboratorio. Croughan *et al.*, (1989) demostraron que al incrementar la viscosidad del medio de cultivo, la escala de Kolmogorov se incrementa, reduciendo el daño mecánico. El problema es que las células tienen un tamaño promedio de 30 a 100  $\mu\text{m}$  y pueden formar agregados celulares de varios órdenes de magnitud mayor, lo que al interactuar con la eddie en un flujo turbulento causa daño o estrés hidrodinámico.

Por otra parte, el estrés hidrodinámico también puede ocurrir en la superficie del medio de cultivo como resultado del rompimiento de las burbujas (Jöbses *et al.*, 1991). En cultivos vegetales el estrés hidrodinámico se ha concentrado en analizar los efectos de la agitación, obviamente en diferentes especies de células vegetales se esperan diferentes sensibilidades. El análisis del estrés hidrodinámico es escalamientos descendientes ofrece un gran potencial para el escalamiento exitoso en el cultivo de células vegetales. Finalmente, el ambiente hidrodinámico puede ser regulado cambiando la velocidad de agitación y/o aireación, pero el problema podría ser resuelto directamente si se desarrollan líneas celulares resistentes a los esfuerzos de corte generados dentro de un biorreactor (Kieran *et al.*, 1997).

### **3.6. Optimización de parámetros del Bioprocreso**

El tipo de nutrientes y su concentración, así como los factores ambientales incrementan los rendimientos y productividad de metabolitos en cultivos sumergidos de células vegetales. Sin embargo, es necesario estudiar y cuantificar los efectos de los componentes claves del medio de cultivo en el crecimiento celular, así como en la acumulación de producto (rendimiento y productividad). Esto es particularmente importante en la producción de metabolitos secundarios, así como las condiciones apropiadas para el crecimiento de las células vegetales ya que puede afectar la formación de producto o viceversa.

Se pueden aplicar varias metodologías para optimizar los componentes de un medio de cultivo para la producción de metabolitos secundarios. El primer paso en cualquier bioprocreso es la optimización y cuantificación de los componentes del medio de cultivo y se refiere a la identificación de nutrientes esenciales, tales como la fuente de sustrato (azúcares), fuente de nitrógeno, minerales y factores de crecimiento, así como las condiciones de cultivo. Una técnica para diseñar un nuevo medio de cultivo consiste en cambiar un componente mientras los otros se mantienen a la misma concentración. Este procedimiento es simple pero tardado, especialmente cuando el medio de cultivo tiene muchos componentes. Otra técnica consiste en detectar si existen interacciones entre los componentes del medio de cultivo, para saberlo a veces se usan técnicas estadísticas para resolver los problemas asociados con los medios de cultivo convencionales. Las técnicas estadísticas, tal como el diseño Plackett-Burman (Nikel *et al.*, 2005), son de gran ayuda en eliminar los problemas asociados con la optimización de medios de cultivo convencionales, pero para ello se requiere llevar a cabo una gran cantidad de experimentos. Este diseño es utilizado por los investigadores para enlistar apropiadamente algunos parámetros para su posterior optimización. En las tecnologías de la fermentación microbiana, los métodos estadísticos se utilizan para optimizar medios de cultivos, los cuales se usan para producir alcoholes, polisacáridos y enzimas. Una vez que los factores que influencian al Bioprocreso se identifican, es necesario determinar sus concentraciones óptimas. Algunos investigadores aplican las mismas técnicas para optimizar las condiciones de cultivo y parámetros del proceso tales como el pH, temperatura, aireación y velocidad de alimentación (Harris *et al.*, 1990). Aunque el diseño estadístico para la optimización de medios de cultivo es ampliamente usado en fermentaciones microbianas (producto y crecimiento), éstos raramente se reportan para cultivos de células vegetales. Existen dos diseños experimentales estadísticos para optimizar medios de cultivo de células vegetales: el método de diseño ortogonal y el método de respuesta superficial. El diseño del método ortogonal se usó para optimizar el crecimiento de *Cassia didymobotrya*, así como su producción de metabolitos secundarios (Botta *et al.*, 1989). El método de respuesta superficial se adaptó para optimizar el crecimiento y producción de metabolitos secundarios de *Digitalis lanata* (Tuominen *et al.*, 1989) y para la optimización de alcaloides indol producidos por *Catharanthus roseus* (Schlatman *et al.*, 1992). Los métodos de Plackett-Burman y el método de respuesta superficial se usan para optimizar el cultivo (glucosa y ácido acético-3-indol) y parámetros ambientales (tamaño del inoculo y pH) para el crecimiento de *Podophyllum hexandrum* y producción de podofilotoxina, de esta forma se incrementó la producción de este metabolito pasando de 4.6 mg/L a 13.8 mg/L en fermentadores mecánicamente agitados (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

#### **4. TIPO DE BIORREACTORES PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES**

El cultivo de células vegetales *in vitro* es una alternativa viable para producir metabolitos de alto valor agregado pero la concentración de los metabolitos obtenidos es muy baja. Por lo tanto, se ha puesto énfasis en el diseño de biorreactores para el cultivo de células vegetales a gran escala. El principal problema es la agregación de las células, el mezclado, la transferencia de oxígeno, la sensibilidad a los esfuerzos de corte y crecimiento en la

pared del fermentador, por ello es necesario un análisis riguroso para el diseño de Biorreactores (Reyes *et al.*, 2014).

La Tabla 3 resume las ventajas y desventajas de los fermentadores usados para el cultivo de células vegetales:

**Tabla 3.** Comparación de las características de un biorreactor para el cultivo de células vegetales. (Adaptado de Huang & McDonald, 2009).

Tipo de fermentador	Ventajas	Desventajas
Fermentador mecánicamente agitado	Fermentador más común Fácil de escalar Útil para cultivos que generan alta viscosidad Capaces de trasferir demandas altas de oxígeno Se pueden colocar diversos tipos de impulsores	Altos esfuerzos de corte en la zona del impulsor Altos costos de operación y equipo costoso Generación de calor debido al mezclado mecánico Consumo alto de energía debido a la agitación mecánica Riesgo de contaminación debido al tipo de sello mecánico
Columna de burbujas	Apropiados para cultivos de células vegetales Fácil de construir y escalar Bajo costo de operación Bajo riesgo de contaminación Bajos esfuerzos de corte No hay generación de calor debido a la agitación mecánica	Pobre capacidad de transferencia de masa Mezclado del fluido pobre en cultivos altamente viscosos en comparación con los fermentadores mecánicamente agitados Alta generación de espuma debido a las altas condiciones de aireación
Fermentadores tipo airlift	Fáciles de construir y escalar Bajos costos de operación Bajo riesgo de contaminación Bajos esfuerzos de corte No hay generación de calor debido a la agitación mecánica Elección del tubo interno Mejor transferencia de oxígeno que las columnas de burbujas Se generan patrones de flujo circundante	Mezclado pobre a altas viscosidades del cultivo comparado con los fermentadores mecánicamente agitados Generación de espuma a altas condiciones de aireación

Biorreactor de membranas	Equipo desecharable Capacidad de concentrar biomasa y producto en el compartimento de la membrana Fácil de extraer el producto extracelular Bajo costo de operación	Difícil de escalar Requiere de oxigenación Bajas velocidades de transferencia de calor Difícil de monitorear condiciones de cultivo en línea
--------------------------	--	---

#### 4.1. Fermentadores mecánicamente agitados

Varias configuraciones de biorreactores se utilizan para cultivar a células vegetales. Los fermentadores mecánicamente agitados se utilizan para optimizar parámetros del bioprocreso. A pesar de que este tipo de biorreactores generan mayor nivel de estrés hidrodinámico en células vegetales, tienen un gran potencial cuando se usan a bajas velocidades de agitación y con modificación de los impulsores. Las primeras aplicaciones comerciales de cultivos de células vegetales de *Lithospermum erythrorhizon* se llevaron a cabo en fermentadores mecánicamente agitados de 200 y 500 L de capacidad y se usan para producir shikonina (Payne *et al.*, 1987). Pero también se cultivan células de *Catharanthus roseus*, *Dioscorea deltoidea*, *Digitalis lanata*, *Panax notogineng*, *Taxus baccata* y *Podophyllum hexandrun*; donde a los fermentadores se les realizaron adecuaciones para la formación de producto.

#### 4.2. Fermentadores tipo airlift

Otro tipo de biorreactor usado para el cultivo de células vegetales se conoce como columna de burbujas (neumáticamente agitado o tipo airlift). Las ventajas de este tipo de biorreactor es la ausencia de partes móviles, mantiene un ambiente estéril y no se requieren sellos mecánicos. Por ejemplo, las células de *Cuadrania tricuspidata* son muy sensibles a los esfuerzos de corte, por lo tanto estas células se produjeron en una columna de burbujas (Tanaka, 2000). Una modificación de una columna de burbujas es el biorreactor tipo balón y se adaptó para la producción de taxol por *Taxus cuspidata* (Son *et al.*, 2000). La mayor desventaja de este tipo de biorreactores es el mezclado insuficiente. El biorreactor que tiene patrones de flujo más uniformes es una versión modificada de un biorreactor tipo airlift, que lo hacen parecer un poco a un fermentador mecánicamente agitado, ya que su diseño incluye un impulsor. Las células de *Catharanthus roseus*, *Digitalis lanata*, *Cudrania tricuspidata*, *Lithospermum eryhrorhizon* y *Taxus chinensis* se crecieron exitosamente en biorreactores tipo airlift para la producción de metabolitos secundarios, en la Tabla 4 se muestran los principales rendimientos relativos de un fermentador tipo airlift. Las mayores desventajas de este tipo de fermentadores es el desarrollo de zonas muertas dentro del fermentador, mezclado insuficiente a altas densidades celulares y rompimiento de las células debido al choque entre las burbujas de aire y entre células. Otro tipo de biorreactor para el cultivo de células vegetales es el fermentador tipo tambor rotatorio, el cual muestra altas capacidades de transferencia de oxígeno y relativamente bajos niveles de estrés hidrodinámico. Este consiste en un tambor horizontal rotando en poleas y conectado a un motor. Este diseño permite ser superior a otros biorreactores para el cultivo de *Vinca rosea* y *Lithospermum erythrorhizon*.

**Tabla 4.** Rendimientos relativos del *loop* externo e interno de un biorreactor tipo airlift (Chisti, 1989).

Parámetro	Loop interno	Loop externo
Coeficiente de transferencia de masa	Alto	Bajo
Gas Hold Up	Alto	Bajo
Gas Hold Up en el riser	Alto	Bajo
Gas Hold Up en el downcomer	Alto	Bajo
Velocidad superficial en el riser	Bajo	Alto
Tiempo de circulación	Alto	Bajo
Número de Reynolds (esfuerzo de corte)	Bajo	Alto
Transferencia de calor	Probablemente bajo	Probablemente alto

Para un cultivo de células vegetales es crucial que el fermentador provea de un buen mezclado y sea capaz de suspender sólidos, adecuada transferencia de oxígeno, que no existan altos esfuerzos de corte y que no se genere estrés hidrodinámico. Las altas densidades celulares y los rendimientos son limitadas en un biorreactor tipo airlift. El mezclado adecuado debido a las altas velocidades del aire, así como los altos flujos no son una solución práctica. Otro problema es la generación de espuma y para evitarla se recomienda evitar los altos flujos de aire. El uso de antiespumantes tóxicos es otro problema (Bond *et al.*, 1987), sin embargo el uso de antiespumantes abate los valores en el  $k_L$  (Kawase & Moo-Young, 1997). Otro problema con el cultivo de células vegetales es el uso de componentes volátiles en los medios de cultivo, estos se liberan a altas velocidades de ventilación en detrimento de la velocidad de crecimiento específico (Scragg *et al.*, 1989). El mezclado se aumenta al elevar la velocidad del flujo del aire, algunas veces la relación del área del downcomer y el riser (Ad/Ar) mejora la circulación, pero un loop más estrecho mejora la circulación del líquido. Otra estrategia es incrementar el número de difusores de aire. De acuerdo a Chisti (1989), se sugiere separar el difusor de aire en el downcomer, pero otros estudios identifican condiciones de inestabilidad teniendo efectos en la transferencia de oxígeno y en el flujo del medio de cultivo. Si se le coloca un impulsor dentro del loop interno mejora el mezclado y transferencia de oxígeno, pero en cultivos con *Beta vulgaris* demuestran que a 28 rpm se genera estrés hidrodinámico (Wagner & Vogelmann, 1977).

## 5. ESTRATEGIAS DEL BIOPROCESO

### 5.1. Selección de modos de cultivo

Existen varias formas de cultivar células vegetales las cuales se emplean en cultivos sumergidos para maximizar la formación del metabolito secundario. El modo de fedbatch (lote alimentado) se utiliza cuando existe inhibición por sustrato en el crecimiento. La técnica de cultivo de lotes repetidos (modo semi-continuo) refleja una aproximación hacia el cultivo continuo de células vegetales cuando la velocidad de síntesis de producto es proporcional a la velocidad específica de crecimiento. Para la síntesis del metabolito

secundario no asociado al crecimiento, se usan cultivos en dos etapas, en el cual las células se propagan en un medio de crecimiento y después se transfieren al medio de producción, esto es ideal para una máxima síntesis del metabolito secundario. Obviamente, es importante reconocer los mejores estados fisiológicos de las células para la acumulación de metabolitos. Una vez que un tipo de biorreactor se ha seleccionado para un bioprocreso específico, el modo de operación dependerá de la dinámica del cultivo (Sajc *et al.*, 2000).

Los cultivos tipo batch se caracterizan por cambiar sus condiciones ambientales constantemente y son capaces de producir metabolitos asociados con cualquier patrón cinético. Muchos cultivos de células vegetales se desarrollan en laboratorio en tipo batch, y éste se utiliza para el escalamiento del bioprocreso. Aunque el modo de cultivo batch adopta ampliamente para el escalamiento de bioprocisos de células vegetales, éste no siempre resulta exitoso para mejorar la producción de algún metabolito deseado. En muchos de los casos, la producción de metabolitos secundarios decrece cuando se escala. Los cultivos tipo batch son excelentes para determinar las condiciones en donde se alcanzan las máximas productividades y rendimientos. Los biorreactores mecánicamente agitados con impulsores modificados son capaces de mejorar el mezclado, mostrando condiciones de esfuerzos de corte relativamente bajos y estos se adoptan para cultivos de largos períodos de tiempo, sobre todo cuando se desea cultivar a células frágiles en cultivos sumergidos a gran escala. Aunque muchos estudios de este tipo se han llevado a cabo para medir el efecto de la agitación mecánica sobre el crecimiento celular, se ha estudiado también el efecto directo de varias condiciones de agitación en el crecimiento y metabolismo en cultivos tipo batch (Hooker *et al.*, 1990). También se ha investigado el efecto del suministro de potencia en los patrones de flujo y oxígeno en cultivos celulares desarrollados en matraces agitados (Reyes *et al.*, 2014).

El tipo de impulsor, la velocidad de agitación afectan los esfuerzos de corte dentro del fermentador y se ha estudiado su efecto en células de *Nicotiana tabacum*. Los impulsores tipo turbinas planas con diámetros más amplios imparten al cultivo gradientes de velocidad más graduales que las turbinas planas tipo disco, generando patrones de mezclado más distribuidos con zonas muertas a bajos esfuerzos de corte. Todos esos factores contribuyen hacia un crecimiento más eficiente de las células e incrementa la producción de los metabolitos. Existe evidencia de que los altos esfuerzos de corte contribuyen al daño celular y se ha demostrado a través del uso de impulsores de paletas planas que no generan altos esfuerzos de corte, resultó en velocidades de crecimiento altas ya que la viabilidad de las células se mantiene. En este mismo estudio (Hooker *et al.*, 1990), observó que las células fueron más susceptibles al daño celular durante la disminución de la fase de crecimiento. El uso de diferentes velocidades de agitación durante las etapas de crecimiento podría ser una aproximación para el cultivo exitoso de células vegetales en cultivo sumergido. Las células de *Panax ginseng* crecen exitosamente a gran escala (fermentadores mecánicamente agitados de 2,000 a 20,000 L), logrando producir de 500 a 700 mg L<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> de saponinas ginsénicas (Furuya, 1988). Las líneas celulares de *Panax ginseng* se han cultivado tanto en biorreactores mecánicamente agitados como en biorreactores tipo *arlift* para la producción de ginsenósidos. Se han probado diferentes tipos de impulsores (paleta plana, turbina tipo disco con paletas anguladas, del tipo ancla) a varias velocidades de agitación para el crecimiento de *Panax ginseng* y se ha observado que las turbinas tipo disco con paletas anguladas a velocidades de 100 a 150 rpm resultaron en altas velocidades de crecimiento,

indicando la sensibilidad a los esfuerzos de corte por parte de las células (Wu & Zhong, 1999). También se observó que las velocidades de agitación de los impulsores fue el parámetro más significativo que afectó la producción de ginsenósidos en los biorreactores. Con otra línea celular de *P. ginseng* cultivada en fermentadores mecánicamente agitados con propelas marinas, las células crecen bien a velocidades de agitación de 100 rpm (Wu y Zhong, 1999), indicando la resistencia a los altos esfuerzos de corte por parte de la línea celular. En otro estudio, los esfuerzos de corte ejercidos por efecto de la aireación y agitación en cultivos de *Coptis japonica* en fermentadores mecánicamente agitados fueron minimizados a través del uso de aire enriquecido con oxígeno y con impulsores tipo paleta perforados (Matzubara *et al.*, 1989; Hara, 1996).

Las condiciones obtenidas de los cultivos tipo batch, en base al tipo de inhibición de sustrato y/o producto, se usan para diseñar cultivos tipo fedbatch o cultivos continuos para evitar la inhibición por la adición controlada de algún nutriente limitante. El cultivo tipo fedbatch se ha usado para mejorar la productividad de ginseng a partir de *Panax ginseng* (Wei-Wei *et al.*, 2001), y del taxol producido por *Taxus chinensis* (Qian *et al.*, 2005).

Los cultivos tipo fedbatch de *Coptis japonica* incrementan significativamente la producción de berberina a altas densidades celulares, ya que en cultivos tipo batch, llevados a cabo en fermentadores mecánicamente agitados, las células sufren daños debido a las altas presiones osmóticas causadas por el medio de cultivo. Además, la concentración de biomasa disminuyó la acumulación de productos inhibidores durante el crecimiento celular. Este problema se resolvió con el diseño de cultivos tipo fedbatch para incrementar la producción de biomasa y berberina (Srivastava *et al.*, 2005).

También se reporta un incremento en la producción de cinamoil por *Nicotiana tabacum* en cultivos tipo fedbatch en fermentadores mecánicamente agitados (Chattopadhyay *et al.*, 2002). La producción de podofilotoxina también se incrementó hasta 43.2 mg/L usando el modo fedbatch en fermentadores mecánicamente agitados, comparados con los 13.8 mg/L en modo batch.

## 6. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES CON PLANTAS

### 6.1. Optimización de bioprocessos para producción de proteínas recombinantes

Actualmente, la mayoría de las proteínas recombinantes se producen por células de mamífero (45%); particularmente por las células de hámster chino (Células CHO), levaduras (15%) y células de insecto (sistema baculovirus) o en sistemas bacterianos (40%) (Rader, 2008). Recientemente, las células vegetales se utilizan como plataforma para la producción de proteínas recombinantes humanas, debido principalmente a que estas no propagan ningún virus, además de que los costos del bioprocreso se reducen (producción y downstream), debido a su medio de cultivo definido y composición libre de proteínas. Además, las células vegetales tienen la capacidad de producir modificaciones postraduccionales complejas tal y como lo hacen las células de mamífero (Twyman *et al.*, 2003; Gomord & Faye, 2004).

Los cultivos celulares transgénicos con células vegetales tienen varias ventajas: a) purificación simplificada, particularmente si el producto es extracelular, b) consistencia en la calidad y homogeneidad del producto, c) eliminación de la necesidad de invernaderos, viveros o terrenos, d) capacidad de inducir sistemas promotores inducibles, e) reducción de los riesgos de contaminación con micotoxinas o endotoxinas y f) mínima comunicación celular para genes silenciadores del sistema postraduccional, como ocurre en toda la planta (Doran, 2000).

Diversas variables de operación de un cultivo influyen en la calidad y productividad de proteínas terapéuticas, así como en la velocidad de crecimiento específica. Se pueden tener varios modos de cultivo: batch, cultivo de perfusión, fedbatch, cultivo continuo de simple etapa o de 2 etapas (Trexler *et al.*, 2002; Chattopadhyay, 2002). La elección de los modos de operación de un fermentador podría ser la base para obtener altos rendimientos de producto celular; estas son dependientes del tipo de célula huésped (velocidad específica de crecimiento, tendencia a formar agregados, generación de espuma, producción de metabolitos secundarios, etc.) y de las propiedades del sistema de producción de proteínas, lugar e inestabilidad innata. En la Tabla 5 se resumen las estrategias de operación para mejorar la producción de proteínas usando células vegetales recombinantes.

**Tabla 5.** Estrategias de operación de un biorreactor para mejorar la producción de proteínas recombinantes en cultivos suspendidos de células vegetales (Adaptado de Huang & McDonald, 2009).

Proteína recombinante	Mediado por el sistema de expresión constitutivo	Mediado por el sistema de expresión inducible
Producto intracelular	Incrementar la velocidad específica de crecimiento. Incrementar la concentración de biomasa Prolongar la fase exponencial Se puede usar batch, fedbatch Cultivo continuo semicontinuo se puede usar para evitar agregación severa y adhesión a la superficie.	Cultivo de doble etapa: el crecimiento celular y la fase de producción se pueden optimizar de forma independiente. El modo de operación del biorreactor y las condiciones dependen del tipo de sistema inducible utilizado. Cultivos semicontinuos o de perfusión a altas densidades celulares con una baja velocidad de crecimiento específica durante la fase de producción de proteínas.
Producto extracelular	Incrementar la velocidad específica de crecimiento Incrementar la concentración de biomasa Se puede aplicar batch, fed-batch y cultivos de perfusión de alta densidad celular. También se recomienda usar cultivos semicontinuos para	Utilizar cultivos de dos etapas: para crecimiento celular y para la fase de producción de la proteína para optimizarlos de forma independiente. El modo de operación del fermentador y condiciones dependen del tipo de sistema inducible utilizado.

<p>evitar agregación celular y adhesión de células a la superficie</p> <p>Las proteínas se pueden recuperar <i>in situ</i></p> <p>Se agregan aditivos en el medio de cultivo si se desea incrementar la estabilidad de las proteínas y evitar efectos proteolíticos derivados de los cultivos celulares</p>	<p>Los cultivos semi continuos o de perfusión a altas densidades con velocidades de crecimiento lentes durante la fase de producción de proteínas-</p> <p>Usar sistemas de recuperación de la proteína <i>in situ</i>.</p> <p>Se pueden agregar aditivos el medio de cultivo para incrementar la estabilidad de la proteína y evitar los efectos proteolíticos derivados de los cultivos celulares.</p>
---	---

Aunque en la actualidad, la producción de proteínas recombinantes prefiere el uso de células de mamífero o de insecto, las células vegetales son una plataforma excelente para su producción que muestra ventajas únicas en su producción, principalmente debido a bioseguridad y economía del bioprocreso. Las proteínas recombinantes secretadas por cultivos de células vegetales reducen los pasos y costos de recuperación y purificación. Pero aún falta mucho para poner en marcha la producción de proteínas terapéuticas, especialmente en lo que se refiere a: desarrollo de líneas celulares altamente productivas utilizando herramientas de biología molecular e ingeniería genética, incrementar la estabilidad de las proteínas recombinantes secretadas y evitar su degradación proteolítica, optimizar sistemas inducibles de células vegetales, así como las estrategias de operación para maximizar la productividad celular, investigar los genes supresores de genes silenciadores e incorporarlos a células vegetales y de esta forma incrementar la producción de la proteína recombinante, o bien, utilizar a las glicosilaciones de las proteínas traducidas por las células vegetales.

## 7. CONCLUSIONES

El cultivo de células vegetales es una alternativa para la producción de metabolitos secundarios, ya que debido a su complejidad aún no es posible sintetizarlos en laboratorio. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos de los cultivos de muchas líneas celulares ha sido necesario experimentar con diversas estrategias de cultivo para poder incrementar su rendimiento. La amplia gama de metabolitos que pueden producir las células vegetales incluyen sabores, fragancias, cosméticos, pigmentos naturales, pesticidas y farmacéuticos. Una opción es utilizar cultivos de tejidos, otra alternativa es el cultivo sumergido, el cual implica conocimiento de ingeniería bioquímica. Las células vegetales requieren de condiciones apropiadas de agitación, aireación, luz, pH, temperatura y algunos otros parámetros físicos. Algunas empresas han logrado el cultivo de células vegetales en biorreactores de hasta 32,000 litros. Las condiciones de ingeniería a considerar son el esfuerzo de corte, debido a las altas velocidades de agitación o causadas por el tipo de impulsor. La reología del medio de cultivo puede traer consecuencias a la productividad del sistema, donde la viscosidad del medio de cultivo es causado por la concentración de biomasa, agregación celular y morfología de las células. La agregación celular puede causar

su sedimentación, mezclado deficiente y limitaciones difusionales. Para disminuir la agregación celular es necesaria una mayor agitación, pero esta puede tener efecto adverso en la viabilidad celular, debido principalmente al estrés hidrodinámico. Por otra parte, las altas concentraciones de oxígeno pueden ser tóxicas para las células. Se recomienda la utilización de fermentadores tipo airlift para evitar el estrés hidrodinámico u operar fermentadores mecánicamente agitados con impulsores que generen bajos gradientes de deformación. Existen varias ventajas y desventajas al utilizar diferentes biorreactores para el cultivo de células vegetales, por ejemplo, el uso de columnas de burbujas el mezclado del medio de cultivo es pobre cuando se tienen cultivos altamente viscosos; mientras que en fermentadores mecánicamente agitados se generan altos esfuerzos de corte y generan calor debido al mezclado mecánico. Los modos de cultivo para el crecimiento de células vegetales puede ser el fed batch para cuando existe inhibición por sustrato en el crecimiento. El cultivo continuo multietapa es ideal cuando se requiere de mayor síntesis de producto. Pero en forma general, el modo de operación dependerá de la dinámica del cultivo. Recientemente se reporta el uso de células vegetales para la producción de proteínas recombinantes, debido a que no propagan virus y se reducen los costos de operación tanto en los sistemas operativos como en la purificación. Actualmente se prefiere el uso de células de mamífero, insecto, células vegetales, las cuales tienen la ventaja de la bioseguridad y economía del bioproceso.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad Intercultural del Estado de Puebla y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la candidatura del primer autor ante el Sistema Nacional de Investigadores (SNI-CONACYT), México.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- Balandrin, M. F. & Klocke J. A. 1988. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer Verlag, Berlin. pp 35.
- Barrales-Cureño H. J. 2015. Pharmacological applications and *in vitro* biotechnological production of anticancer alkaloids of *Catharanthus roseus*. Biotecnología Aplicada. 32(1): 1101-1110.
- Barrales-Cureño H. J., Soto H. M. 2012. Taxoides: metabolitos secundarios del árbol del tejo (*Taxus spp.*). Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 18(2): 207-218.
- Barrales C. H. J., Andrade H. P., Luna C. A., Reyes R., Chávez S. S. & López V. L. G. 2017. *Catharanthus roseus*. Current Research and Future Prospects. Ed. Naeem M., Aftab T., Masroor M. A. K. Springer. USA. pp 412.

Barrales-Cureño H. J., Castillo H. F. J. & Barros G. L. C. 2015. El Paclitaxel. Revista de Química. 29(1): 7-10.

Barrales-Cureño H. J., Castillo H. F. J. & Reyes R. C. 2016. Perfil Farmacológico de Metabolitos Secundarios de Importancia Médica: Química de Productos Naturales. Editorial Académica Española. 224 p. ISBN: 10: 3659702668, ISBN-13: 978-3659702662.

Barrales-Cureño H. J. & De la Rosa M. R. 2014. Uso de hongos endófitos para la producción del fármaco anti-cáncer taxol. Biotecnología Vegetal. 14(1): 3-13.

Barrales-Cureño H. J., Farrera R. A., Reyes R. C., Hernández F. I. Y., García A. E. & Chávez S. S. 2016. Revista Médica de la Universidad Veracruzana. 16(1): 75-91.

Barrales C. H. J. & Ramírez S. M. F. 2013. Una revisión sobre la producción de taxoides anticancerígenos en cultivos *in vitro* de callos y células de *Taxus* spp. Revista Colombiana de Biotecnología. 15(2): 167-177.

Barrales-Cureño H. J., Reyes Reyes, C., Chávez Salinas S. & Andrade Hoyos, P. 2015. Perfil farmacológico, bioquímico y biotecnológico del mejoramiento de los metabolitos secundarios de *Rauwolfia serpentina*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 46(3): 235 - 249.

Barrales-Cureño H. J., Soto H. M., Ramos V. A. C., Trejo T. L. I., Martínez V. M., Ramírez G. M. E., San Miguel C. R., Luna P. G. R. & López U. J. 2011. Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas *in situ* y en callos inducidos *in vitro* de *Taxus globosa* Schlecht. Spanish Journal of Rural Development. 2: 103-114.

Bedoya P. J. C. & Hoyos S. R. A. 2010. Efecto de la relación agitación-aireación sobre el crecimiento celular y la producción de Azadiractina en cultivos celulares de *Azadirachta indica* A. Juss, Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín, 63: 5293-5305.

Bilka F., Balazová A., Bilková A. & Holková I. 2012. Comparison of sanguinarine production in suspension cultures of the Papaveraceae plants. Ces. Slov. Farm. 61, 267-270.

Biscaro P. D., Costa M. A., Gomes E. & Cano C. E. 2009. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. The Open Biotechnology Journal. 3: 9-18.

Botta B., Dall’Olio G., Ferrari F., Monaceli B., Pasqua G., Scurria R. & Monache D.G. 1989. Cell suspension cultures of *Cassia didymobotrya*: optimization of growth and secondary metabolite production by application of orthogonal design method. Journal of Plant Physiology. 135: 290-294.

Calva C. G. & Pérez V. J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria. 6: 1-16.

Chattopadhyay S., Farkya S., Srivastava K. A. & Bisaria V. S. 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures Biotechnology and Bioprocess Engineering. 7: 138-149.

Chattopaddhyay S., Srivastava A. K., Bhojwani S. S. & Bisaria V. S. 2001. Development of suspension culture of *Podophyllum hexadrum* for the production of podophyllotoxin. Biotechnology Letters. 23: 2063-2066.

Chattopadhyay S., Srivastava A. K., Bhojwani S. S. & Bisaria V. S. 2002. Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor. Journal of Bioscience and Bioengineering. 93: 215-220.

Doran P. M. 2000. Foreing protein production in plant tissue cultures. Current Opinion in Biotechnology. 11: 199-204.

Drapeau D., Blanch H. W. & Wilke C. R. 1986. Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseaus* in batch culture. Biotechnology Bioengineering. 28: 1555-1563.

Flores H. E. & Curtis W. R. 1992. Approaches to understanding and manipulating the biosynthetical potential of plant roots. Ann. New York Acad. Sci. 665: 188-209.

Furuya T. 1988. Saponins (ginseng saponins). Academic Press. CA. USA. pp 213-234.

Gomord V., Faye L. 2004. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. Current Opinion in Plant Biology. 7: 171-181.

Hara Y. 1996. Research on the production of useful compounds by plant cell cultures in Japan. CRC Press, New York, USA. pp. 187-201.

Harris O. V., Cuppett S. L. & Bullerman L. B. 1990. Optimization of lipase synthesis by *Pseudomonas fluorescens* by response surface methodology. Journal Food Protection. 53: 481-483.

Hooker B. S., Lee J. M. & An G. 1989. Response of plant tissue to a high shear environment. Enzyme and Microbial Technology. 11: 484-490.

Hooker B. S., Lee J. M., & An G. 1990. Cultivation of plant cells in stirred vessel: effect of impeller designs. Biotechnology and Bioengineering. 35: 296-304.

Huang T-K. & McDonald K. A. 2009. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. Biochemical Engineering Journal. 45: 168-184.

Jolicoeur M., Chavarre C., Carreau P.J. & Arcahmbault L. 1992. Development of helical-ribbon impeller bioreactor for high density plant cell suspension culture. Biotechnology and Bioengineering. 39: 511-521.

Kato A., Kawazoe S. & Soh Y. 1978. Journal of Fermentation Technology. 2: 59

Kieran P. M., MacLoughlin P. F. & Malone D. M. 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. Journal of Biotechnology. 59: 39-52.

- Kieran P. M., O'Donell H. J., Malones D. M. & MacLoughlin P. F. 1995. Fluid shear effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Biotechnology and Bioengineering. 45: 415-425.
- Kieran P. M., MacLoughlin P. F. & Malone D. M. 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. Journal of Biotechnology 59: 39-52.
- Laine J. & Kuoppamäki R. 1979. Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development, 18: 501.
- Leckie F., Scragg A. H., & Cliffe C. 1991. An investigation into the role of initial kLa on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering. 37: 364-370.
- Meijer J. J., ten Hoopen H. J. G., Luyben K. C. A. M. & Libbenga K. R. 1993. Effects of hydrodynamic stress on cultures plant cells: a literature survey. Enzyme Microbial Technology. 15: 234-238.
- Memelink J., Kihne J.W., van der Heijden R. & Verpoorte R. 2001. Genetic modification of plant secondary metabolite pathways using transcriptional regulators. Advances in Biochemical and Engineering Biotechnology. 72: 103-125.
- Nikel P. I., Pettinari M. J., Méndez S. B. & Galvagno A. M. 2005. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial by products. International Microbiology. 8: 243-250.
- Ochoa-Villarreal M., Howat S., Mi H. S., Jang M. O., Young-Woo J., Eun-Kyong L. & Gary J. 2016. Loake Plant cell culture strategies for the production of natural products. BMB Rep. 49(3): 149-158.
- Oksman-Caldentey K. M. & Inze D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Science. 9: 9.
- Panda A. K., Mishra S., Bisaria S. & Bhojwani S. S. 1989. Plant cell reactors: A perspective. Enzyme Microbial Technology. 11: 386-397.
- Payne G. F., Shuler M. L. & Brodelius P. 1987. Plant cell culture. Pp 193-229. In: Lydensen (ed). Large Scale Cell Culture Technology. Hanser Publishers, New York, USA.
- Poulev A., O'Neal J. M., Logendra S., Pouleva R. B., Timeva V., Garvey A. S., Gleba D., Jenkins I. S., Halpern B. T., Kneer R., Cragg G. M. & Raskin I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. Journal of Medicinal Chemistry. 46(12): 2542-2547.
- Qian J., Guiping L., Xiujun L., Xincai H. & Hongmei L. 2009. Influence of growth regulators and sucrose concentrations on growth and rosmarinic acid production in calli and suspension cultures of *Coleus blumei*. Natural Products Research. 23(2): 127-37.

Qian Z. G., Zhao Z. J., Xu Y., Qian X. & Zhong J. J. 2005. Highly efficient strategy for enhancing taxoid production by repeated elicitation with a newly synthesized jasmonate in fed-batch cultivation of *Taxus chinensis* cells. *Biotechnol & Bioengineering*. 20:516-521.

Rader R. A. 2008. Expression systems for process and product improvement. *BioProcess*. 6: 4-9.

Rao S. R. & Ravishankar G. A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*. 20: 101-153.

Rates S. M. K. 2001. Plants as sources of drugs. *Toxicon*. 39: 603-613.

Raskin I., Ribnicky D. M., Komarnytsky S., Illic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D. A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J. M., Cornwell T., Pastor I. & Fridlander B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnology*. 20(12): 522-531.

Reyes C., Terrón K., Reynoso R., Rubí H., Chávez S., Barrales-Cureño H. J. & López-Valdez L. G. 2016. Desarrollo de un software para la caracterización de matraces y fermentadores agitados mecánicamente *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 3(5): 42-58.

Reyes R. C., Chávez S. S., Barrales C. H. J., Martínez M. M. & López V. L. G. 2015. Importancia del suministro de potencia y oxígeno en cultivos celulares desarrollados en matraces agitados. *Ideas en Ciencia*. 23(42): 23-36.

Rodriguez-Monroy M. & Galindo E. 1999. Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in stirred tank. *Enzyme and microbial Technology*. 24: 687-693.

Sahabi O. P. & Shuler M. L. 1982. *Canadian Journal of Botany*. 60: 692.

Sajc L. D., Grubisic D. & Novakovic G. V. 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*. 4: 89-99.

Scragg A. H. 1985. The problems associated with high biomass levels in plant cell suspensions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 43: 163-170.

Scragg A. H., Allan E. J. M., Bond P. A. & Smart N. J. 1986. Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge University Press, Cambridge, pp 178.

Scragg A. H., Allan E. J. & Leckie F. 1988. Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme and Microbial Technology*. 10: 361-367.

Schlatman J. E., ten Hoopen H. J. G. & Heijnen J. J. 1992. Optimization of the medium composition for alkaloid production by *Catharanthus roseus* using statistical experimental designs. *Med. Fac. Landbouw Univ. Gent*. 57: 1567-1569.

Sevón N. & Oksman-Caldentey K. M. 2002. Agrobacterium *rhizogenes*-mediated transformation: root as a source of alkaloids. *Planta Medica*. 68: 859-868.

Shuler M. & Kargi F. 2002. Bioprocess engineering-Basic concepts. Prentice Hall, New Jersey. pp 535.

Spencer A., Hami J. D. & Rhodes M. J. C. 1993. *In vitro* biosynthesis of monoterpenes by *Agrobacterium* transformed shoot cultures of two *Mentha* species. *Phytochemistry*. 32: 911-919.

Srivastava P. S., Narula A. & Srivastava S. Plant Biotechnology and Molecular Markers. 2005. Kluwer Academic Publishers. 400 p.

Street H.E. 1973. Biosynthesis and its control in plants. Academic Milborrow B.V. London, pp. 95.

Tabata H. 2004. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 87: 1-23.

Takayama S., Misawa M., Ko K. & Misato T. 1977. *Physiology Plant*. 41: 313.

Tanaka H., Semba H., Jitsufuchi T. & Harada H. 1988. *Biotechnology Letters*. 10: 485.

Tanaka H. 2000. Technological problems in cultivation of plant cells at high density. *Biotechnology Bioengineering*. 67: 1203-1218.

Tanaka H. 1982. Some properties of pseudocells of plant cells. *Biotechnology Bioengineering*. 24: 2591-2596.

Taticek R. A., Moo-Young M. & Legge R. L. 1991. The scale-up of plant cell cultures: engineering considerations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 24: 139-158.

Trexler M. M., McDonald K. A. & Jackman A. P. 2002. Bioreactor production of human alpha (1)-antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. *Biotechnology Progress*. 18: 501-508.

Tuominen U., Toivonen L., Kauppinen V., Markkanen P. & Bjork L. 1989. Studies on the growth and cardenolide production of *Digitalis lanata* tissue cultures. *Biotechnology Bioengineering*. 33: 558-562.

Twyman R. M., Stoger E., Schillberg S., Christou P. & Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*. 21: 570-578.

Vanishree M., Lee C. Y., Lo S. F., Nalawade M., Lin H. S. & Tsay H. S. 2004. Studies on the production of some important metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin- Academia Sinica*. 45: 1-22.

Verpoorte R. & Memelink J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 181-187.

Wagner F. & Vogelman H. 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. Springer-Verlag, Berlin, Germany. p. 245-252.

Wang H. Q., Yu J. T. & Zhong J. J. 1999. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by sucrose feeding strategy. Process Biochemistry. 35: 479-483.

Wei-Wei H., Hui Y. & Jian-Jiang Z. 2001. Improvement of *Panax notoginseng* cell culture for production of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation in pneumatically agitated bioreactors. Biotechnology Progress. 17: 838-846.

Wongasmuth M. & Doran, P. M. 1994. Foaming and cell flotation in suspended plant cell cultures and the effect of chemical antifoams. Biotechnology Bioengineering. 44: 481-488.

Wu J. & Ho H. P. 1999. Assesment of various carbon sources and nutrient strategies for *Panax ginseng* cell culture. Applied Biochemistry and Biotechnology. 82: 17-26.

Wu J. & Zhong J. J. 1999. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects. Journal of Biotechnology. 68: 89-99.

Yashiki K., Kiso A., Zhou Y. Y., Iwasaki D., Kambara T. & Mizutani K. 2010. Abstracts: The effects of *Coptis japonica* root extract and its key component, berberine, on human subcutaneous adipocytes. International Journal of Cosmetic Science. 32: 392.

Yeon-Sook Lee., Min H. J., Kang Taehee., In P. Y., Mook K. H., & Sunghoon K. 2006. Antitumor activity of the novel human cytokine AIMP1 in an *in vivo* tumor model. Molecules and Cells. 21: 213-217.

Zhong J. J., Seki T., Kinoshita S. & Yoshida T. 1992. Effects of surfactants on cell growth and pigment production in suspension cultures of *Perilla frutescens*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 106-109.

Zhong J. J., Fujiyama K., Seki T., & Yoshida T. 1994. A quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell cultures of *Perilla frutescens* in bioreactors. Biotechnology Bioengineering. 44: 649-654.