

CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES EN BIORREACTORES: UN SISTEMA POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Fernando Orozco Sánchez¹; Rodrigo Hoyos Sánchez²;
Mario E. Arias Zabala³

RESUMEN

Los cultivos de células vegetales en biorreactores ofrecen un gran potencial para la producción de metabolitos secundarios, con importantes aplicaciones en la industria química, farmacéutica o alimenticia. Estos sistemas permiten controlar mejor la producción, a diferencia de los métodos tradicionales con plantaciones, los cuales presentan variaciones en la calidad y cantidad del producto debido a cambios climáticas, estacionales, problemas geopolíticos o tenencia del suelo. Esta revisión presenta algunos grupos de metabolitos secundarios de plantas, su utilidad y ejemplos de sustancias con un potencial de producción al nivel comercial en cultivos celulares. Además, se presentan tres tipos de reactores (células en suspensión, células inmovilizadas y biopelículas de células), los problemas asociados con el cultivo de células vegetales y los factores que afectan la producción de los metabolitos secundarios. Los anteriores factores involucran la composición del medio de cultivo (sales inorgánicas, vitaminas, fuente de carbono, hormonas y reguladores de crecimiento), la composición del gas suministrado (oxígeno, bióxido de carbono, etileno), la temperatura, el pH, la radiación luminosa, las características de mezclado, la fase del crecimiento celular, el grado de diferenciación celular y la elicitación (biótica o abiótica). El estudio y la manipulación de los anteriores factores (variables operación) constituyen una etapa

¹ Profesor. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

² Profesor. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía.

³ Profesor. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. Instituto de Ciencias Naturales y Ecología.

determinante para el diseño de un proceso que utilice esta tecnología como método de producción.

Palabras claves: *Metabolitos Secundarios, Biorreactores, Cultivo de Células Vegetales.*

ABSTRACT

Plant cell culture in bioreactors: a potential system for production of secondary metabolites

Plant cell culture in bioreactors offers a great potential for secondary metabolites production, with important applications in chemical, pharmacist or nutritious industry. This system allows a better production control, contrary to traditional plantation methods, which present variations in the quality and quantity of the product due to weather or seasonal changes, geopolitical problems or holding of lands. This review presents some groups of plant secondary metabolites, their utility and examples of substances with a production potential at the commercial level in cell culture. Also, three types of reactors (suspension cells, immobilized cells and biofilms of cells), associated problems with plant cell culture and factors that affect the production of secondary metabolites are presented. The previous factors involve the composition of the culture medium (inorganic salts, vitamins, source of carbon, hormones and regulators of growth), gas composition (oxygen, dioxide of carbon, ethylene), temperature, pH, light radiation, stirring characteristics, phase of cellular growth, degree of cellular differentiation and elicitation (biotic or abiotic). The study and the manipulation of the previous factors (operation variables) constitute a decisive step for a process design that uses this technology like production method.

Key words: *Secondary metabolites, bioreactor, plant cell culture.*

INTRODUCCIÓN

La biotecnología vegetal es un área innovadora y en pleno desarrollo, que ofrece un gran potencial productivo, especialmente si se tiene en cuenta la cantidad de sustancias que producen las células vegetales con aplicaciones

Los cultivos de células vegetales *in vitro* ofrecen la posibilidad de producir metabolitos

medicinales, farmacéuticas, alimenticias y productos de química fina. Las técnicas de micropropagación y mejoramiento de plantas han permitido desarrollar procesos de producción de compuestos utilizando células vegetales en diferentes tipos de biorreactores.

secundarios o realizar biotransformaciones (transformación de un compuesto suministrado

exógena-mente) en reactores, en un recinto cerrado o en una planta industrial, sin depender de extensas plantaciones, características de los suelos, condiciones climatológicas e incluso problemas sociales o de tenencia de la tierra. Lo anterior permite incrementar la productividad de metabolitos por unidad de biomasa en biorreactores, con respecto a los cultivos en plantaciones, reduciendo la presión sobre los suelos que están destinados a la alimentación humana y animal. De esta manera, la manipulación de las células vegetales en reactores es atractiva y se convierte en una excelente opción para la investigación y el desarrollo. En este trabajo se presenta un panorama general de la producción de los metabolitos secundarios de plantas en reactores, algunos tipos de biorreactores y los factores que se pueden manipular para la producción de determinado metabolito. Dichas consideraciones deberán tenerse en cuenta en el planteamiento de proyectos de investigación o en el mejoramiento de procesos productivos en esta área.

METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas tienen rutas metabólicas comunes en las que se producen azúcares, ácidos grasos, aminoácidos, proteínas, AND, ARN o polímeros, los caules son necesarios para su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias son conocidas como metabolitos primarios. Los reguladores de crecimiento y algunas fito hormonas (giberelinas, citoquininas, auxinas) son considerados metabolitos primarios. Otras rutas metabólicas son propias de un grupo taxonómico determinado – especie, género, familia – y conducen a la síntesis de

compuestos importantes para su relación con otros organismos: los pigmentos de las flores que atraen a insectos polinizadores, compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos (sustancias alelopáticas) o que protegen a la planta productora de infecciones (fitoalexinas) o de los depredadores (disuasorios alimenticios) (Piñol y Palazón, 1993). Estas rutas metabólicas constituyen el metabolismo secundario, el cual puede definirse como la biosíntesis, transformación y degradación de compuestos endógenos mediante proteínas de especialización (Piñol y Palazón, 1993). Los productos de este metabolismo son denominados metabolitos secundarios y tienen aplicaciones como esencias, colorantes, insecticidas, aditivos nutritivos o productos farmacéuticos. Actualmente se registran más de 20000 metabolitos secundarios producidos por las plantas y a éste número se suma más de 1600 nuevas sustancias descubiertas cada año (Salisbury y Ross, 1994). Se considera tres grandes grupos de metabolitos secundarios: los terpenos, los fenoles y los alcaloides y de éstos compuestos sólo un número reducido es producido por síntesis química. Con el fin de mostrar el potencial que ofrecen estas sustancias, se presenta una breve descripción de estos grupos con algunos ejemplos.

Terpenos. Los terpenos son sustancias químicas que se encuentran en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, por ejemplo en los pinos y muchos tipos de cítricos. Los aceites esenciales son sustancias volátiles que le dan esencia (olor) a muchas especies vegetales. Uno de los terpenos más comunes es el pineno, que se encuentra, entre otros, en

la trementina, extraída del pino (Luis, 2002). Se sintetizan a partir del acetyl Co-A. Otros ejemplos de terpenos son los siguientes (Salisbury y Ross, 1994; Seki *et al*, 1997).

- Monoterpenos (C₁₀). El geranyl pirofosfato (C₁₀) es el precursor de todos los monoterpenos. Generalmente son volátiles y hacen parte de los aceites esenciales.
- Sesquiterpenos (C₁₅). Forman parte de las denominadas esencias y algunos tienen actividad como fitoalexinas (protegen a la planta productora de infecciones).
- Saponinas (C₂₇). Promotores de germinación, inhibidores del crecimiento de las raíces, tienen efectos terapéuticos, expectorantes, anti inflamatorios y algunos tienen funciones como fitoalexinas.
- Glucósidos cardiotónicos. Esteroides formados a partir de la progesterona, cardiotónicos - fármacos irremplazables en insuficiencias cardíacas y arritmias.
- Tetraterpenos (C₄₀). Carotenos y xantofilas, componentes de pigmentos fotosintéticos. El β-caroteno puede proteger de ciertos tipos de cáncer por su acción antioxidante.
- Poli saponoides (>C₄₀). El caucho es un ejemplo típico.

Fenoles. Los fenoles constituyen un grupo de productos naturales muy importantes. Se encuentran, entre otros, en los taninos usados en el curtido de pieles, refinación de vinos, producción de resinas fenólicas y epóxicas, entre otros (Vitores, 2000). Son compuestos que poseen por lo menos un anillo bencénico

- Diterpenos (C₂₀). Precursores de las giberelinas (hormona vegetal que promueve el crecimiento generalizado de muchas plantas (Piñol y Palazón, 1993). El taxol, nombre comercial del paclitaxel - una amida diterpeno, ha sido aprobado para su uso como droga anticáncer en más de 40 países.

- Triterpenos (C₃₀). Con funciones fisiológicas en las plantas. Los derivados constituyen esteroides con funciones hormonales de interés farmacéutico.

(-C₆H₅). Su síntesis se relaciona con dos rutas metabólicas esenciales: la del ácido shiquímico y la de los compuestos cetóxicos (Piñol y Palazón, 1993). Algunos ejemplos son:

- Derivados policétidos. Derivados del acetyl Co A. Su unidad monomérica es (-CH₂-CO-).

- Derivados del ácido shiquímico, como los ácidos fenólicos que forman parte de esencias, bálsamos y resinas. Algunos atraen los insectos favoreciendo la polinización. Los derivados de los taninos tienen efecto astringentes (disuasores nutritivos), las cumarinas tienen efecto de fitoalexinas, las ligninas y lignanos forman parte de las resinas y de la pared celular.

- Flavonoides. Se conocen aproximadamente 2000 compuestos, algunos son antioxidantes y activadores enzimáticos. El canferol participa en polinización, las antocianinas tienen acción fungitóxica, algunos flavonoides participan

en la fijación de nitrógeno: especies de las leguminosas producen compuestos que activan algunos genes de *Rizhobium*, ocasionando nodulaciones y fijación del nitrógeno.

Alcaloides. Son compuestos secundarios que poseen nitrógeno en su estructura formando parte de un anillo heterocíclico. La mayoría son básicos como lo indica su nombre. Se han aislado aproximadamente 10.000 alcaloides de las plantas y se ha examinado menos del 15% de las 250.000 a 500.000 especies de plantas superiores del planeta. Se forman por rutas metabólicas a partir de aminoácidos. Por lo general en una planta se encuentran varios alcaloides. Así, en el látex de *Papaver somniferum* se encuentran unos 30 alcaloides, entre ellos la morfina, codeína, tebaína o papaverina, los cuales son

- Alcaloides de bencilisoquinolina. Entre ellos se encuentran los principales alcaloides del género *Papaver*, como los alcaloides del opio - tebaína, codeína, morfina y papaverina, de interés por sus aplicaciones farmacológicas. La heroína o diacetil-morfina, un derivado sintético de la morfina, es el más peligroso de todos los fármacos de adicción.
- Alcaloides indólicos simples. Derivados del triptófano como la fisostigmina, producida por las habas del calabar (*Physostigma venenosum*) es un agente terapéutico, aunque puede matar por parálisis respiratoria. Inhibe la acetilcolinesterasa, la enzima que destruye la acetilcolina una vez que este compuesto se ha activado para transmitir el impulso nervioso.

principios activos de medicamentos. Algunos grupos de alcaloides son los siguientes (Piñol y Palazón, 1993).

- Alcaloides tropánicos. Se conocen aproximadamente 150 alcaloides tropánicos. La hiosciamina, escopolamina y atropina se utilizan en medicina como anticolinérgicos. La cocaína es producida por el género *Erythroxilan*.
- Alcaloides de nicotiana o alcaloides del tabaco. La nicotina y nicotiana son producidas por *N. tabacum*; la anabsina es producida por *N. glauca*.
- Alcaloides de quinolizidina, esparteína (utilizado en medicina por su efecto antiaritmico), lupanina. La cadaverina es precursor de estos alcaloides.
- Alcaloides indólicos complejos como los alcaloides de *Catharantus*: vindolina, ca-rantina, serpentina o ajmalicina

con propiedades antitumorales; o los alcaloides del cornezuelo, producidos por hongos del género *Claviceps*.

- Estricnina. Producido por semillas de *Strychnos* (Loganiaceae), altamente tóxico (dosis mortal para un hombre 30-60 mg). En pequeñas dosis estimula la actividad muscular y mental y se usa en medicina para combatir el efecto de estupor debido a la morfina o por sobredosis de fármacos con efectos depresivos.

- Quinina y bases relacionadas. Alcaloides indólicos complejos producidos por especies del género *Chinchona* (Rubiaceae), agentes antipalúdicos, antiarrítmicos en el tratamiento de ciertas alteraciones cardíacas.

La Tabla 1 presenta algunas sustancias producidas mediante cultivos de células de plantas, incluyendo metabolitos primarios y secundarios.

Tabla 1. Sustancias reportadas de cultivos de células de plantas.

Alcaloides	Lípidos
Alergenos	Naftoquinonas
Antroquinonas	Acidos nucleicos
Agentes antileucémicos	Nucleótidos
Agentes antitumorales	Aceites
Agentes antivirales	Opiatos
Aromas	Acidos orgánicos
Benzoquinonas	Proteínas
Carbohidratos, incluyendo polisacáridos	Perfumes
Glicósidos cardíacos	Péptidos
Calcones	Pigmentos
Diantronas	Fenoles
Enzimas	Reguladores de crecimiento de plantas
Inhibidores enzimáticos	Reserpina
Flavonoides, flavones	Esteroides y derivados
Saborizantes (incluyendo edulcorantes)	Azúcares
Furanocumarinas	Taninos
Hormonas	Terpenos y terpenoides
Insecticidas	Vitaminas

(Lee, 1996).

TIPOS DE CULTIVO Y BIORREACTORES

Los biorreactores para el cultivo de células vegetales pueden clasificarse en tres grandes grupos dependiendo del tipo de cultivo: células en suspensión, células inmovilizadas y reactores de biopelícula (Kargi y Rosenberg, 1987).

Reactores con células en suspensión. En este tipo de reactor las células están suspendidas y se pueden mezclar libremente en el fluido, bien sea como células individuales o en forma de agregados. La principal ventaja es proporcionar un ambiente de cultivo uniforme para las células de las plantas. Una de sus principales desventajas es el relativo bajo control sobre el tamaño de agregado de las células. Se requiere cierto grado de

agregación (contacto célula-célula) y puede ser necesaria la diferenciación celular para la producción de los metabolitos secundarios. Cuando los agregados formados son grandes, los niveles de nutrientes en el centro de los agregados puede no ser adecuado para soportar la actividad metabólica. El tamaño de los agregados puede cambiar durante un cultivo batch, dependiendo del esfuerzo de corte y otros parámetros como la concentración de iones calcio y la concentración de compuestos de carbono (Kargi y Rosenberg, 1987). Ejemplos de este tipo de reactor lo constituyen el reactor de tanque agitado, la columna de burbujeo o el reactor airlift. Este último reactor, junto con el de burbujeo, parecen ser el tipo de reactor más apropiado para el cultivo de células vegetales en suspensión, debido a la sensibilidad frente al esfuerzo de corte de las células. Con el fermentador airlift se ha obtenido una mayor producción de metabolitos secundarios comparado con los reactores agitados mecánicamente (Kargi y Rosenberg, 1987; Kreis, and Reinhard, 1989), aunque para cultivos de alta densidad celular (20 – 30 kg células secas / m³) son apropiados los reactores agitados y para cultivos con densidades celulares moderadas (15 – 20 kg células secas / m³ son adecuados los reactores air – lift (Doran, 1999; Hu y Zhong, 2001), los cuales presentan la ventaja del bajo costo de agitación (Futamura *et al*, 2001).

- La inmovilización proporciona un mejor contacto célula – célula y una mejor diferenciación de células, resultando en una producción mayor de metabolitos secundarios.

Se han desarrollado varios métodos de inmovilización: atrapamiento en gel, enlace

También se podrían clasificar en este grupo los reactores de tambor rotatorio o cilindros horizontales, en los cuales se logra la transferencia de masa con un relativo menor consumo de potencia; son útiles para procesos cont ejidos sensibles al esfuerzo de corte y favorece las fotobiorreacciones, si el reactor es irradiado con luz, o los procesos con altas viscosidades (Salisbury y Ross,1994).

Reactores con células inmovilizadas. Este tipo de reactores contiene células inmovilizadas, cuya película de células no tienen un espesor definido. Algunas de las ventajas de la movilización son las siguientes (Kargi y Rosenberg, 1987; Kreis and Reinhard, 1989).

- La inmovilización proporciona una mayor concentración de células por unidad de volumen del reactor, obteniendo una alta productividad volumétrica de células y producto.
- La inmovilización elimina el problema del lavado de células (washout) y permite el re-uso de las células vegetales en un sistema continuo y por largos periodos de tiempo.
- Las células están protegidas contra los esfuerzos de cizalladura.

covalente e inmovilización en membranas y en reactores de fibras huecas. Pueden usarse reactores airlift o de lecho fluidizado conteniendo burbujas de gel con células inmovilizadas y aunque estos reactores mejoran las condiciones transferencia de masa con respecto a otros reactores de lecho inmovilizado, se obtiene un crecimiento de

células y producción de metabolitos muy lenta. Se han realizado numerosos estudios para mejorar esta producción, por ejemplo, una duplicación en la densidad del inóculo (células inmovilizadas en alginato) en un reactor de *Catharanthus roseus*, duplicó la concentración de ajmalicina (Lee, 2000). En los reactores con lechos poliméricos porosos (polifenileneóxido activado con glutaraldehído) las condiciones micro-ambientales son el principal problema. Los reactores empacados tienen una alta producción debido a la alta relación superficie/volumen.

Los reactores de fibras huecas han sido ampliamente usados para la inmovilización de células microbiales y mamíferas. También se usa la microencapsulación de célula de plantas mediante microcápsulas de membranas poliméricas (poliestireno, nylon, polilisina-alginato).

Reactores de biopelículas de células. Estos reactores tienen un espesor definido de la película de células inmovilizadas, lo cual puede proporcionar un mejor ambiente para el crecimiento de células y formación de metabolitos secundarios (Kargi y Rosenberg, 1987). Se reporta el cultivo de callos de células de plantas con una cantidad mayor de producción de alcaloides comparado con cultivos en suspensión (Lindsey y Yeoman, 1983). La unión de las células a superficies de vidrio se obtiene con altas concentraciones de calcio (se cree que los iones calcio forman puentes entre las moléculas poliméricas, e.g. pectina, y la superficie de vidrio). Algunas de las ventajas de los reactores de biopelícula son las siguientes (Kargi y Rosenberg, 1987):

- Las células inmovilizadas sobre superficies

de partículas inertes tienen un contacto directo con los nutrientes de una fase líquida bien mezclada y controlada. Se puede cambiar el grado de diferenciación de las células, manipulando el espesor de las películas y las condiciones microambientales.

- Las células tienen un contacto directo unas con otras, lo cual permite una mayor producción de metabolitos.

- Se puede obtener una alta concentración de células si se usa una configuración de reactor con una alta relación superficie/volumen.
- Debido a que se diferencia claramente la fase líquida de la fase sólida, se simplifican las operaciones de recuperación de producto.
- Se elimina el problema del lavado de células.
- Los efectos de cizalladura son reducidos con respecto a los reactores en suspensión.

La Tabla 2 presenta un resumen de los tipos de cultivo, tipos de biorreactores y principales desventajas.

Tabla 2. Resumen de los tipos de cultivo, tipos de biorreactores y principales desventajas.

Tipo de cultivo	Tipo de reactor	Principales desventajas
Cultivo en suspensión	Tanques agitados mecánicamente.	Alto esfuerzo de corte. Necesita bajas velocidades, r.p.m.<100.
	Columnas en burbujeo	Mezclado imperfecto a bajas velocidades de aireación.
	Reactores airlft con reciclo interno o externo.	Mezclado imperfecto a bajas velocidades de recirculación.
	Lecho empacado	Heterogeneidad, mezclado imperfecto, posibles limitaciones de transferencia de masa.
Células inmovilizadas (atrapamiento en gel, enlace covalente, encapsulación)	Lecho fluidizado	Mezclado imperfecto
	Burbujeo/airlift	Mezclado imperfecto a bajas

	Membrana	velocidades aireacion/burbujeo. Posibles limitaciones de transferencia de masa intercelular.
Reactores de biopelículas	Fibras huecas	Heterogeneidad. Control de condiciones microambientales dentro del reactor.
	Lecho empacado	Heterogeneidad. Posibles limitaciones de transferencia de masa.
	Lecho fluidizado	Mezclado imperfecto. Remoción de biopelícula a altas velocidades del fluido.
	Burbujeo	Mezclado imperfecto. Remoción de la biopelícula a altas velocidades del aire.

Kargi y Rosenberg, 1987).

Utilización comercial de reactores con células vegetales. El primer proceso comercial que utilizó células vegetales fue la producción del colorante y compuesto antibacterial shikonina, utilizando *Lithospermum erythrorhizon* en 1983. Algunos productos reportados con un potencial comercial se aprecian en la Tabla 3. Hay muy pocos procesos comerciales reportados a escala industrial, incluyendo la producción de shikonina, fosfodiesterasa, ácido rosma-

rínico, ginseng (Zhong, Yu; y Yoshida , 1995) y berberina (Sajc, Grubisic, y Vunjac-Novakovic, 2000). La productividad de compuestos en base seca, de células vegetales, se puede incrementar considerablemente en los cultivos celulares con respecto a la productividad con plantas intactas. La Tabla 4 muestra algunos ejemplos que comparan el incremento en la productividad de ciertos metabolitos en biorreactores, con respecto a las plantas *in vivo*.

Tabla 3. Algunos metabolitos secundarios de plantas con un potencial comercial para obtenerse en cultivos celulares.

Producto	Uso	Especie
----------	-----	---------

Producto	Uso	Especie
Drogas/Químicos		
Antraquinonas	Laxante	<i>Morinda citrifolia</i>
Ajmalicina	Tranquilizante	<i>Catharantus roseus</i>
Diosgenina	Hormona	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Tebaína	Codeína	<i>Nicotiana tabacum</i>
Ubiquinona-10	Droga cardíaca	<i>Catharantus roseus</i>
Saborizantes/fragancias		
Vainilla	Saborizante	<i>Vanilla planifolia</i>
Cocoa	Saborizante	<i>Theobroma cacao</i>
Aceite de rosa	Fragancia	<i>Rosa damascena</i>
Mentol	Fragancia	<i>Mentha piperita</i>
Jasmín	Fragancia	<i>Jasmin grandiflorum</i>
Colorantes/Pigmentos/Edulcorantes		
Antocianina	Colorante	<i>Vitis vinifera</i>
Azafrán	Colorante de alimentos	<i>Crocus sativus</i>
Acido rosmárico	Especia antioxidante	<i>Coleus blumei</i>
Esteviósido	Edulcorante	<i>Stevia rebaudiana</i>

Lee, 1996.

Tabla 4. Comparación de la producción de las células vegetales en biorreactores con respecto a los cultivos madres

Producto	Especie	Producción en cultivo de células	% peso seco en plantas	Razón de producción cultivo células /plantas
Antocianina	<i>Vitis</i> sp.	16424	10	16133160
	<i>Euphorbia milli</i>		0,3	
	<i>Perilla frutescens</i>		1,5	
Antraquinona	<i>Morinda citrifolia</i>	18	2,2	82
Berberina	<i>Coptis japónica</i>	13	4	33
	<i>Thalictrum minor</i>	10	0,01	1000
Acido rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>	27	3	90
Shikonina	<i>L. erythrorhizon</i>	14	1,5	33

(Zhong *et al.* Recent advances in planta cell cultures in bioreactors, 1995.

La Figura 1 presenta el diagrama de flujo de una fermentación para producir shikonina. Una sola corrida de producción de shikonina con *L. erythrorhizon* en un fermentador de 750 L (14 días) produce la misma cantidad de shikonina que un cultivo de plantas en 176400 metros cuadrados (Kreis, y Reinhard, 1989).

Figura 1. Diagrama de flujo de una fermentación en dos etapas de *L. erythrorhizon* para la producción de shikonina. Kreis y Reinhard, 1989.

Se esperaría obtener la síntesis de cualquier producto natural en biorreactores, pero no todos los cultivos de células producen los compuestos naturales y en general éstos se acumulan en pequeñas cantidades. Por esto los mejores candidatos para la producción comercial son los metabolitos secundarios con un alto costo en el mercado. Las células cultivadas son diferentes a las células en la planta intacta en términos de fisiología, citología y morfología (Lee, 1996). Esto implica que en muchos casos es preciso la inducción de los metabolitos de interés en los cultivos celulares (elicitación) e inclusive la extracción de los metabolitos del interior de las células, ya que algunos no son excretados al medio extracelular. La inducción de los metabolitos depende de múltiples factores tal como se presenta en las secciones posteriores y la concentración de las sustancias de interés en el medio de cultivo va a determinar en gran medida el costo del producto. Mientras más diluido se encuentre el producto, más etapas unitarias de purificación se requerirán y más costoso será el proceso productivo y en este caso se puede recurrir a resinas o polímeros para extraer o concentrar los metabolitos secundarios (Ju *et al*, 1999; Lee, 2000). El tipo de fermentador que se utilice, si es de lecho empacado, columna de burbujeo o tanque agitado, también está relacionado con las variables de operación y el costo de producción.

Problemas asociados al cultivo de células vegetales

En el cultivo de células vegetales deben considerarse múltiples factores: el medio de cultivo (fuente de C, N, P, K, micronutrientes, hormonas, etc), la irradiación (calidad del espectro, intensidad y período), el esfuerzo cortante (sensibilidad a esfuerzos hidromecánicos, tamaño de las células), el suministro de oxígeno (el efecto en el crecimiento y metabolismo), la composición del gas (e.g. bióxido de carbono y etileno), reología

Las células de las plantas cultivadas en suspensión son más susceptibles a los esfuerzos de corte y crecen mucho más lento que las células microbinas, lo que implica la necesidad de condiciones asépticas muy exigentes para su cultivo. Además, las células de plantas tienden a formar agregados y la transferencia de oxígeno es un factor crítico para los cultivos a gran escala. Debido a que algunas sustancias son retenidas intracelularmente, la purificación de estos compuestos incrementa los costos de producción. La excreción de estas sustancias puede realizarse controlando el pH del medio o mediante la permeabilización no destructiva de las células inmovilizadas con sustancias orgánicas. Los niveles de producción de las sustancias de interés aún son muy bajos y completamente variables (Lee, 1996).

Tabla 5. Problemas asociados con un cultivo de células vegetales.

(interacción de viscosidad, mezclado y transferencia de masa con el crecimiento celular y producción de metabolitos en un biorreactor, formación de agregados celulares), el tipo de biorreactor (tanque agitado mecánicamente, columna de burbujeo, airlift, lecho empacado, tambor rotatorio, entre otros), la temperatura, la rapidez de crecimiento e inclusive la variación somacional de los callos o cultivos de células (Jain, 2001; Lee, 1996).

Las Tablas 5 y 6 presentan los problemas asociados con un cultivo de células vegetales y la comparación de tamaños celulares, las superficies y volúmenes de algunos microorganismos. La Tabla 7 presenta los tiempos de crecimiento de diferentes cultivos celulares.

Problemas Biológicos	Problemas Operacionales
Baja rapidez de crecimiento	Adhesión de paredes
Heterogeneidad fisiológica	Requerimientos de luz
Inestabilidad genética	Viscosidad
Bajo contenido de metabolitos	Sensibilidad al esfuerzo de corte
Secreción de productos	Asepsia

Zhong, op. cit. p. 463.

Tabla 6. Comparación de tamaños celulares, superficies y volúmenes.

Especie	Tamaño, μm	Superficie, μm^2	Volumen, μm^3
<i>Serratia marescens</i>	0,5 x 1,7	6,9	1,3
<i>Escherichia coli</i>	1,3 x 4,0	43	21
<i>Bacillus megaterium</i>	1,2 x 7,6	66	34
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	3,5 (esférica)	153	179
<i>Coleus blumei</i>	60,0 (esférica)	4500	900 000

Kreis & Reinhard, op. cit. p 411.

Tabla 7. Comparación de algunos tiempos de crecimiento (tiempo de duplicación y velocidad específica de crecimiento).

Especie	Tiempo duplicación, h	Veloc. Específ. Crecim, h^{-1}
<i>Escherichia coli</i>	0.33	2.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	15	0.046

<i>Coleus blumei</i>	53	0.013
<i>Catharantus roseus</i>	72	0.01
<i>Berberis wilsoniae</i>	100	7
<i>Digitalis lanata</i>	120	6

Kreiss & Reinhard, op. cit. p. 411.

Factores que afectan la producción de metabolitos secundarios

Tal como se presentó anteriormente, son múltiples los factores que afectan un cultivo de células vegetales y la producción de metabolitos secundarios.

Elicitación. El término elicitación se refiere a la activación o incremento del metabolismo secundario, provocada por determinado factor y que conlleva a la producción de estos metabolitos. La elicitación se clasifica en abiótica (utilizando factores como la luz UV, temperatura, concentración de sustancias inorgánicas, pH, etc) y biótica (sustancias producidas por organismos) (Akimoto, *et al*, 1999). A su vez, la elicitación biótica puede ser clasificada con base en su origen: exógena (si las sustancias factores de elicitación son derivadas de microorganismos o insectos, (como el quitosán y sus oligómeros) o endógena (elicitores originados de los compuestos estructurales de las plantas) (Akimoto *et al*, 1999). El oligómero alginato, por ejemplo, actúa como un elicitor endógeno, de manera similar al oligómero del ácido galacturónico. Por el contrario el

La manipulación y control sobre estos factores puede incrementar o disminuir significativamente la producción de determinados metabolitos secundarios.

oligómero de quitosán actúa como un elicitor exógeno, al igual que muchos extractos o sustancias producidas por patógenos, hongos o levaduras (Klessig *et al*, 2000). Los mecanismos intracelulares de elicitación son complejos y en gran parte desconocidos y la activación de determinados genes (genes de resistencia o avirulencia entre otros) depende del factor de elicitación. Dentro de estas señales de activación aparecen las especies relacionadas con el oxígeno (ROS), monóxido de nitrógeno o el ácido salicílico (Akimoto *et al*, 1999; Akimoto *et al*, 2000; Bohlman *et al*, 1998; Edwards *et al*, 1997; Jabs *et al*, 1997; Lee *et al*, 2001). Con base en las definiciones anteriores, la manipulación de muchos factores abióticos, que afectan los cultivos celulares y a su vez las rutas metabólicas secundarias, pueden considerarse como elicitores abióticos. La manipulación

de los reguladores de crecimiento, las hormonas, extractos fúngicos, extractos bacterianos o la sacarosa, podrían considerarse elicitores bióticos.

Se puede lograr el incremento en la producción de fitoalexinas (hidroxicinamoyltiraminas y compuestos fenólicos enlazados a la pared celular) en *Solanum tuberosum* y un mejoramiento del crecimiento y producción de cumarinas en cultivos de raíces de *Cichorium intybus* elicitando con filtrados de *Phytophthora infestans* (Bais *et al*, 2000; Schidmt *et al*, 1998) o un incremento en la producción del sesquiterpeno ácido tesárico (compuesto usado como un anticolesterol) en cultivos celulares de *Tessaria absinthioides* mediante la utilización de extractos de *Verticillium sp.*, *Monodictis catanaeae*, *Acremonium sp.* y *Aspergillus niger* (Kurina *et al*, 2000). El metil jasmonato incrementó la producción de taxoides en cultivos de *Taxus* (Ketchum *et al*, 1999) y los compuestos del corcho incrementaron la producción de metabolitos secundarios en cultivos de *Sophora flavescens* y *Glycyrrhiza glabra* (Yamamoto *et al*, 2001).

Composición del Medio de Cultivo

Un medio de cultivo para células vegetales está constituido principalmente por sacarosa, sales inorgánicas -macro y micronutrientes-, vitaminas, fitohormonas

A una concentración de ion nitrato de 7 mM se presenta un máximo en la

y reguladores de crecimiento. Existen numerosos estudios que reportan el efecto de la concentración de compuestos inorgánicos (principalmente los compuestos de nitrógeno y fósforo), sacarosa y fitohormonas sobre la producción de metabolitos secundarios.

Nitrógeno. El nitrógeno se suministra en forma nítrica, amoniacal y en muy pequeñas cantidades en los aminoácidos. La concentración de nitrógeno y la relación de nitrógeno nítrico y amoniacal puede afectar el crecimiento y la producción de metabolitos. Así por ejemplo, en 2/3 del nivel de nitrógeno normal se presenta un máximo en la producción de digitoxina en un cultivo de células en suspensión de *Digitalis purpurea*, aunque también se reduce el crecimiento celular. La producción de digitoxina y el crecimiento celular se reducen drásticamente en 1/10 y 10 veces el nivel de nitrógeno normal (Collin, 1987).

producción de shikonina y en la producción de biomasa de *Lithospermum*

erythrorhizon, en un estudio entre 0 y 40 mM. Además, la producción de digitoxina se ve favorecida por una relación de nitrógeno nítrico a amoniacal de 2:1 en un cultivo de *D. Purpurea* (Collin, 1987). En un cultivo batch de *Catharanthus roseus*, cuando se presenta una limitación del nitrógeno (tanto nítrico como amoniacal) se presenta una excreción significativa de ácidos orgánicos como el piruvato, lactato, succinato y formato, con la consecuente disminución del pH del medio de cultivo (Bhadra and Shanks, 1997).

Fósforo. Una limitación de fosfato puede estimular o inhibir la producción de metabolitos secundarios, según la especie vegetal. Knobloch et. al. reportan un medio en el cual se eliminaron el fosfato y el 2-4 diclorofenoxiacético (2-4 D) y se incrementó la sacarosa hasta el 8 %, ocasionando un incremento en la producción de cinamoil putrecina en plantas de tabaco, al igual que la formación de alcaloides en *Catharanthus roseus*. En un cultivo batch de *C. roseus*, cuando se presenta una limitación de fosfato, también se presenta una excreción significativa de ácidos

Hormonas y reguladores de crecimiento.

Las hormonas son compuestos que a concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica en el vegetal, promoviendo o inhibiendo el crecimiento, participan en diferenciación de órganos, maduración, etc (Salisbury y Ross, 1994).

Además de estas funciones, las hormonas

orgánicos (Bhadra y Shanks, 1987). La síntesis de antraquinona y el crecimiento de células de *Morinda citrifolia*, la acumulación de digitoxina en *Digitalis purpurea* y la producción de shikonina en cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon* fueron estimulados por un incremento en la concentración de fosfato.

En estos últimos casos la producción de los metabolitos fue estimulada por un crecimiento activo de las células (Collin, 1987).

Fuente de carbono. Normalmente se le adiciona sacarosa a los cultivos de células vegetales, pero una fuente diferente de carbono puede afectar el cultivo. La producción de digitoxina por *D. purpurea*, nicotina en cultivos de tabaco y diosgenina en cultivos de *Dioscorea deltoidea* se reduce significativamente cuando se reemplaza la sacarosa por otros carbohidratos como la lactosa, maltosa, galactosa, glucosa y rafinosa. La producción de ajmalicina y serpentina se incrementó cuando se aumentó la concentración de sacarosa de 2 a 6 %, en cultivos de *C. Roseus* (Collin, 1987).

y los reguladores de crecimiento parecen participar en la síntesis de algunos metabolitos secundarios. La presencia de las auxinas, 2,4-D, ácido indol 3-acético (IAA) y ácido 1-naftalén acético (ANA), incrementaron la producción de escopoletina y escopolina en cultivos de tejidos de tabaco. 2,4-D incrementó la

producción de saponina en callos de *Panax ginseng* y altos niveles de la auxina 2,4-D, ácido naftalén acético (ANA) e IAA, incrementó la producción de los alcaloides indólicos en cultivos de *Chinchona ledgeriana*. Además, bajos niveles de 2,4-D y kinetina favorecieron la producción de diosgenina en cultivos de *Costus speciosus* y la producción de antraquinona en *C. Ledgeriana* (Collin, 1994). La adición de 2,4 D en cultivos celulares de *Vitis sp.* mejoró la formación de glucósidos de quercetina (Kokybo *et al*, 2001).

Composición del Gas Suministrado

La composición de los gases suministrados a los cultivos celulares no sólo afectan el crecimiento y el desarrollo vegetal, sino que también pueden afectar la diferenciación celular y la producción de metabolitos secundarios de una manera variable. El intercambio gaseoso involucra el suministro de oxígeno y la remoción de metabolitos gaseosos como el CO₂, etileno, etano, acetaldehído y etanol (Nour y Thorpe, 1994).

Mezclado. Los biorreactores requieren del mezclado y de la agitación para homogenizar el medio de cultivo, permitir la transferencia de masa (intercambio de nutrientes, oxígeno, metabolitos), facilitar la transferencia de calor y evitar o disminuir la sedimentación de las células vegetales o sus aglomerados. Como consecuencia del mayor tamaño de las

La acumulación o aplicación de gases como el etileno y el CO₂ pueden promover el crecimiento y regeneración en callos en algunos casos o inhibir los cultivos de brotes de *Magnolia soulangeana* o la regeneración de raíces de discos de hojas de tomate. La acumulación de estos gases también promovieron el desarrollo y elongación de brotes axilares de *Thuja accidentalis* (Nour y Thorpe, 1994). En un reactor de tanque agitado con *C. roseus*, la alta concentración de metabolitos gaseosos, redujeron significativamente la producción de ajmalicina (Shalatman *et al*, 1997). El CO₂ y el etileno afectan la formación de berberina en cultivos celulares de *T. minus*, duplicando la producción de este metabolito cuando se suministró una mezcla de estos gases a un reactor airlift. El oxígeno por encima de ciertos valores puede afectar la producción de ciertas enzimas, _ glucuronidasa y metabolitos secundarios en cultivos de tabaco (Zhong, Yu y Yoshida, 1995).

células vegetales con respecto a los microorganismos - bacterias o levaduras- y la presencia de una pared celular rígida e inflexible, las células vegetales son particularmente sensibles a los esfuerzos de corte y presentan mayor sedimentación en los reactores con células en suspensión.

Por encima de cierto nivel de esfuerzo cortante, se reduce la viabilidad del

cultivo, masa celular y productividad celular, tal como ha sido demostrado para cultivos de tabaco, *Catharanthus roseus* y *P. frutescens* (Zhong, Yu y Yoshida, 1995). Se usa el concepto de esfuerzo para condiciones de flujo laminar, un esfuerzo de corte crítico entre 80 y 200 N/m² (Sajc, Grubisic y Vunjac-Novakovic, 2000). Los niveles de esfuerzo cortante por debajo de los cuales se evita el daño celular, son suficientes para permitir un mezclado eficiente de la fase líquida y permitir un intercambio de gases adecuado (Sajc, Grubisic y Vunjac-Novakovic, 2000). A nivel de laboratorio son normales velocidades de agitación entre 80 y 150 rpm en equipos como los agitadores orbitales (Orihara *et al*, 1994; Orihara y Furuya, 1994; Szabados *et al*, 1991) aunque en un proceso de escalado debe proporcionarse la misma intensidad de mezclado y esto constituye un problema que no es fácil de solucionar en la mayoría de los casos.

Temperatura

La temperatura afecta considerablemente una célula y una de sus mayores manifestaciones se presenta en las membranas bilipídicas de ésta. Una disminución en la temperatura del cultivo incrementa el contenido total de ácidos grasos por peso de células secas, con respecto a las temperaturas superiores, ya que se presenta una mayor acumulación de ácidos insaturados C₁₈. En un estudio con *C. roseus*, se observó además de lo

anterior, un incremento de la proporción relativa de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Toivonen, 1993). La insaturación de los ácidos grasos permite conservar una fluidez de la capa bilipídica aproximadamente constante con la temperatura. De manera similar, la temperatura también parece afectar el metabolismo secundario de algunas especies: así, la disminución en la temperatura de 27°C a 16°C, causó un incremento en la producción de ajmalicina y serpentina en cultivos de *C. roseus* (Collin, 1987). La disminución en la temperatura parece causar un estrés de tal manera que se inhibe el crecimiento y algunos compuestos intermediarios se orientan hacia las rutas del metabolismo secundario (Collin, 1987).

Irradiación luminosa

La radiación visible puede afectar el crecimiento celular dependiendo de la longitud de onda de la radiación, la intensidad y el período de exposición. La luz puede afectar la formación de diversos compuestos como las antocianinas, vindolina, catarantina y tiofeno. Una intensidad de la luz visible de 27,2 W /cm² afecta la formación de antocianina en cultivos celulares de *Perilla frutescens* en un biorreactor (Zhong, Y y Yoshida, 1995). En cultivos de *C. roseus* la luz redujo el efecto inhibitorio que tiene el ion fosfato en la acumulación de la antocianina y alcaloides indólicos como la serpentina. Además, la luz blanca y

especialmente la luz azul, tuvo un efecto estimulador en la producción de cardenólidos en cultivos celulares de *Digitalis lanata* (Collin, 1987).

Generalmente la producción de metabolitos secundarios se presenta en la fase estacionaria o en la parte final de la fase exponencial del crecimiento celular, una vez el crecimiento celular ha disminuido y se activan con mayor facilidad las rutas metabólicas secundarias.

Sin embargo, numerosos reportes demuestran que la producción de metabolitos, dependiendo del metabolito y de la especie, puede presentarse en diferentes fases del crecimiento celular. En un cultivo celular de *C. roseus*, se apreció que la producción de ajmalicina y tabersonina, se presenta en la fase exponencial del crecimiento, mientras que la producción de serpentina no está asociada al crecimiento y se presenta en la fase estacionaria del crecimiento celular (Bhadra y Shanks, 1997).

Diferenciación celular y cultivo de órganos

La diferenciación de un cultivo de tejidos vegetales está asociada con incremento en la producción de metabolitos secundarios, al presentarse un incremento en la agregación celular, la producción de tipos específicos de células, desarrollo de cloroplastos y pigmentación verde e iniciación de estructuras más organizadas como embriones, raíces y brotes (Collin, 1987). Los alcaloides

Fase de la curva de crecimiento celular

codeína y tebaína sólo se hallan en callos y suspensiones celulares si se presentan células embriogénicas. De igual manera, la formación de embriones en suspensiones celulares de especies solanáceas, está asociada con un incremento en la producción de alcaloides tropánicos (Collin, 1987). En cultivos de *Atropa belladonna* se ha determinado que el sitio primario para la síntesis de hiosciamina son las raíces y la bioconversión de hiosciamina a escopolamina se presenta principalmente en las partes aéreas de la planta. Por lo anterior, se ha estudiado el cocultivo de raíces y brotes de *A. belladonna* y un híbrido de *Duboisia leichhardtii* x *D. myoporoides* para la síntesis, translocación y bioconversión de hiosciamina y escopolamina (Scragg, y Arias, 1992). Se reporta el cultivo de vellos radicales para el mejoramiento de la producción de los metabolitos secundarios de múltiples especies como *Nicotiana tabacum*, *Scopolia japonica*, *Catharanthus roseus*, *Beta vulgaris*, *Amsonia elliptica*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Lobelia inflata*, *Panax ginseng*, *Cassia torosa*, etc. (Szabados *et al*, 1991).

Modificaciones en el biorreactor

El tipo de biorreactor y la forma de operación pueden afectar considerablemente un cultivo de células vegetales y la producción de metabolitos secundarios. La producción de capsaicina, por peso de células secas, se duplicó en un biorreactor de células inmovilizadas con respecto a un cultivo de células en suspensión de *Capsicum frutescens* (Collin, 1987). La producción de hiosciamina y escopolamina fue significativamente mayor cuando se cultivaron raíces y brotes de *Atropa belladonna* y *Duboisia* sp. En un biorreactor dual - dos recipientes diferentes conectados con un tubo entre ellos- con respecto a un solo biorreactor que contenía ambos tipos de órganos en un mismo recipiente. El tubo conector permite la traslocación de la hiosciamina producida en las raíces hasta los brotes, donde se biotransforma a escopolamina (Subroto, Kwok, Hamill y Doran, 1996). Scragg y Arias (1992) presentan diferentes diseños de biorreactores, como el tambor rotatorio o el biorreactor de membrana de vórtice anular libre de burbujas, para resolver los problemas de mezclado en condiciones de bajo esfuerzo de corte. Estos reactores han sido evaluados para cultivos de *L. erythrorhizon*, *Beta vulgaricus* y *Thalictrum rugosum*.

El diseño de nuevos agitadores (e.g. agitador centrífugo) ha permitido operar los reactores agitados reduciendo el esfuerzo de corte, a la vez que se mejora la transferencia de oxígeno y se reduce el

consumo de potencia (Wang y Zhong, 1996). El estudio de la agitación del medio de cultivo y el flujo del aire, permite construir curvas de operación, con las cuales se establecen zonas de daño celular y zonas en las cuales este daño no se presentan (Doran, 1999). Para operar los biorreactores reduciendo los riesgos de contaminación y poder caracterizar adecuadamente la biomasa, morfología celular y producción de metabolitos secundarios, se han diseñado diferentes sistemas de estimación en línea de la biomasa y metabolitos secundarios, los cuales incluyen sistemas de procesamiento de imágenes o medida de la conductividad e índice de refracción del medio de cultivo (Berzin *et al*, 2000; Miyanaga, Seki, y Furusaki, 2000; Ramakrisnan, Luyk y Curtis, 1999).

Mejoramiento de las líneas celulares

Se pueden seleccionar diferentes líneas celulares que tienen una alta producción de metabolitos secundarios, mediante diferentes métodos como la selección con compuestos coloreados, cromatogramas, radioinmunoensayo o microespectrofotometría (Collin, 1987) o pueden obtenerse líneas altamente productoras mediante la transformación genética de las plantas. Mediante la transformación genética con el plásmido contenido dentro de *Agrobacterium* sp. Se pueden obtener vellos radicales transformados, los cuales muestran un alto

crecimiento y con frecuencia tienen una alta acumulación de metabolitos secundarios. Un cultivo de brotes de *Mentha citrata*, transformado mediante *A. tumefaciens*, mostró la producción de terpenos utilizando diferentes mallas en biorreactores airlift (Scragg y Arias, 1992). Para el cocultivo de raíces y

La producción de metabolitos secundarios mediante el uso de cultivos de células vegetales en biorreactores, es prometedora y ofrece la posibilidad de producir sustancias de una manera más controlada y de mayor calidad, con respecto a los sistemas tradicionales de producción de éstos. Los procesos no estarían afectados por variables incontrolables como las condiciones climáticas o las situaciones sociopolíticas que se pudieran presentar en una región. Sin embargo, antes de materializar un proyecto o ser éste factible económicamente, deben solucionarse una serie de problemas técnicos que afectan el cultivo celular. Estos factores incluyen la concentración de los nutrientes en el medio de cultivo, condiciones de operación como la luz, temperatura, grado de agitación, diferenciación celular o fase en el crecimiento celular. Además, debe considerarse el tipo de biorreactor, línea celular y elicitación -biótica o abiótica- de los metabolitos de interés. Cada especie vegetal y metabolito secundario requiere un estudio profundo y cuidadoso, ya que todos los factores afectan el cultivo y deben definirse de una manera particular para cada proyecto.

brotes de *A. belladonna* y *Duboisia* sp. Con el fin de producir hiosciamina y escopolamina, se utilizan órganos transformados genéticamente (Subroto, Kwok, Hamill y Doran, 1996).

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

AKIMOTO, C. *et al.* Endogenous elicitor-like efectos of alginate on physiological activities of plant cells. *Er: Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 52 (1999); p.429-436.

AKIMOTO, C. *et al.* Synergistic effect of active oxigen species and alginate on chitinase production by *Wasabia japonica* Cell and its application. *Er: Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol 89, No. 2 (2000); p.131– 137.

BAIS, H. P. *et al.* enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.cv.Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. *Er: Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol 90, No. 6 (2000); p.648–653.

BERZIN, Isaac, *et al.* Rhizoscan: A semiatomatic image processing system for characterization of the morphology and secondary metabolite concentration in hairy root cultures. *Er: Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 70, No 1 (oct. 5 2000); p. 17-23.

BHADRA, Rajiv and SHANKS, Jacqueline. Transient of nutrient uptake growth, and indole alkaloid accumulation in heterotrophic cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*. *Er: Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 55, No. 3 (aug.5, 1997); p.527-534.

BOHLMAN, J. *et al.* Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Er: Proceeding of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America. Vol 95 (apr., 1998); p.4126-4133.
- COLLIN, H. A. Determinants for yield of secondary products in plant tissue cultures. *En: Advances in Botanical Research.* Vol 13 (1987); P.145-185.
- DORAN, Paulin M. Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors. *En: Biotechnology Progress.* Vol. 15 (1999); p.319–335.
- FUTAMURA, T. *et al* Kojic acid production in an airlift bioreactor using partially hydrolyzed raw corn starch. *En: Journal of Bioscience and Bioengineering.* Vol 92, No. 4 (2001); p.360–365.
- EDWARDS, Robert, *et al* Methylation reactions and the phytoalexin response in alfalfa suspension culture. *En: Planta.* Vol. 201 (1997); p.359–367.
- HU, Wei-Wei and ZHONG, Jiang-jiang. effect of bottom clearance on performance of airlift bioreactor in high density culture of *Panax notoginseng* Cells. *En: Journal of Bioscience and Bioengineering.* Vol 92, No.4 (2001); p.389–393.
- KLESSIG, Daniel, *et al* Nitric oxide an salicylic acid signaling in plant defense. *En: Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol. 97, No. 16 (aug., 1, 2000); p.8849–8855
- JABS, Thorsten, *et al* Elicitor stimulated ion fluxes and O₂ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *En: Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol 95 (apr., 1997); p.4800-4805.
- KNOBLOCH, K. H, BEUTNAGEL, G, and BERLIN, J. *En: Planta.* Vol. 153 (1981); p.582-585.
- JAIN, S. M. Tissue culture derived variation in crop improvement. *En: Euphytica-* Vol. 18 (2001); p. 153–166.
- KOKYBO, Tetsuro *et al* Promotive effect of auxins on udp-glucose: flavonol glucosyltransferase activity in *Vitis sp.* cell cultures. *En: Journal of Bioscience and Bioengineering.* Vol 91, No.6 (2001); p.564–569.
- JU, J.Y. *et al* Imprinted polymers as tools for the recovery of secondary metabolites produced by fermentation. *En: Biotechnology and Bioengineering.* Vol. 64, No. 2 (jul., 20, 1999); p.232-238.
- KREIS, Wolfgang and REINHARD, Ernst. The production of secondary metabolites by plants cells cultivated in bioreactors. *En: Planta Medica.* Vol. 55 (1989); p.409-416.
- KARGI, Fibret and ROSENBERG, Mirris Z. plant cell bioreactors: present status and future trends. *En: Biotechnology Progress.* Vol. 3, No. 1 (mar., 1987); p.1-8.
- KURINA, M *et al* Enhancement of tassaric acid production in *Tessaria absinthioides* cell suspension cultures. *En: Plant Cell Reports.* Vol. 19 (2000); p. 821–824.
- KETCHUM, Raymond E.B. *et al* The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures following elicitation with methyl jasmonate. *En: Biotechnology and Bioengineering.* Vol. 62, No.1 (jan., 5, 1999); p.
- LEE, H. Byong. Fundamentals of food biotechnology. United Kingdom: VCH Publishers, 1996. 431p.
- LEE, Carolyn, W. T. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharantine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. *En: Biotechnology and Bioengineering.* Vol 67, No. 1 (jan., 2000); p.61-71.
- LEE, Kung-Ta, *et al* Responses of transformed root culture of *Atropa belladonna* to salicylic acid stress. *En: Journal of Bioscience and Bioengineering.* Vol 91, No. 6 (2001); p. 586–589.

- LINDSEY, K and YEOMAN, M.M. Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. *En: Plant* LUIS, José. Aceites esenciales. Usos y Riesgos (en línea). Editorial Alternativa. s.f. (citado en 2002-04-02). Disponible en Internet: <http://www.argentanet.com/milenio/editorial/aceites/>.
- MIYANAGA, Kazuhiko; SEKI, Minoru and FURUSAKI, Shintaro. Analysis of pigment accumulation heterogeneity in plant cell population by image – processing system. *En: Biotechnology and Bioengineering*, Vol 67, No 4 (feb., 20, 2000); p.493-503.
- NOUR, Katy A. and THORPE, Trevor A. The effect of the gaseous state on bud induction and shoot multiplication in vitro in eastern white cedar. *En: Physiologia Plantarum*. Vol.90 (1994); p.163-172.
- ORIHARA Yutaka *et al* Biotransformation of caryophyllene oxide by cultured cells of *Eucalyptus perriana*. *En: Phytochemistry*. Vol 35, No. 3 (1994); p.635-639.
- ORIHARA, Yutaka and FURUYA, Tsutomu. Biotransformation of 1,8 Cineole using cultured cells of *Eucalyptus perriana*. *En: Phytochemistry*. Vol 35, No. 3 (1994); p.641–644.
- PIÑOL, M. Teresa y PALAZÓN, Javier. “Metabolismo Secundario” p. 237–283. *En: AZCON - BIETO, J. y TALON, M. Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Madrid: Iberoamericana Mc Graw Hill, 1993. 581 p.
- RAMAKRISNAN, Divakar; LUYK, Derek and CURTIS, Wayne R. Monitoring biomass in root culture systems. *En: Biotechnology and Bioengineering*, Vol 62, No. 6 (mar., 20, 1999); p. 35-42.
- SALISBURY, Frank y ROSS, Cleon. Fisiología vegetal. México: Grupo Editorial Iberoamericana, 1994. 759p.
- TOIVONEN, Leena. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *En: Biotechnology*. S.H. Mantell and H. Smith. (eds). New York: Cambridge University Press, 1983. p.39-67.
- SAJC, Lidija; GRUBISIC, Dragan and VUNJAC-NOVAKOVIC, Gordana. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *En: Biochemical Engineering Journal*. Vol.4 (2000); p.89-99.
- SHALATMAN, J.E. *et al* Gaseous Metabolites and the ajmalicine production rate in high density cell cultures of *Catharanthus roseus*. *En: Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 20 (1997); p.107-115.
- SCHIDMT, Axel, *et al* Elicitor stimulates biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension culture of *Solanum tuberosum*. *En: Planta*. Vol. 205 (1998); p.251–255.
- SCRAGG, A.H. and ARIAS-CASTRO, C. Bioreactors for industrial production of flavours: use of plant cells. *En: R.L.S. PETERSON et al (eds.) Bioformation of flavours*. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 1992. p.131-154.
- SEKI, Minoru *et al* Taxol (Paclitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidata*. *En: Biotechnology and Bioengineering*. Vol 53 (1997); p.214-219.
- SUBROTO, M.A; KWOK, K.H; HAMILL, J.D and DORAN, P.M. Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites. *En: Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 49 (1996); p. 481-494.
- SZABADOS, *et al* Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. *En: ROCA, William y MOGRINSKI, Luis A. Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Cali: CIAT, 1991. p.173-210.

Biotechnology Progress, Vol. 9/(1993); p.12-20.

TOIVONEN, Leena; LAAKSO, Simo and ROSENQVIST, Heikki. The effect of temperature on growth, indole alkaloid accumulation and lipid composition of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 11 (1992); p.390-394.

VITORES, Juan Tomás. Fenoles (en línea). Centro canario del agua, España, 12 de diciembre de 2001. (citado en 2002-04-01). Disponible en Internet: <<http://www.fcca.es/Docs/Informe%20fenoles.doc>>.

WANG, Si-Jing and ZHONG, Jiang-Jiang. A novel centrifugal impeller bioreactor. I. Fluid circulation, mixing, and liquid velocity

profiles. *En: Biotechnology and Bioengineering*, Vol 51, (1996); p.511-519.

WANG, Si-Jing and ZHONG, Jiang-Jiang. A novel centrifugal impeller bioreactor. II. Oxygen transfer and power consumption. *En: Biotechnology and Bioengineering*, Vol 51 (1996); p.520-527.

YAMAMOTO, Hirobumi *et al*. Increases of secondary metabolite production in various plant cell cultures by co-cultivation with cork. *En: Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Vol. 65, No. 4 (2001); p.853-860.

ZHONG, J.J. YU, J.T. and YOSHIDA T. Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. *En: World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 11 (1995); p. 461-467.

Aprobado para su publicación
Octubre 10 de 2001