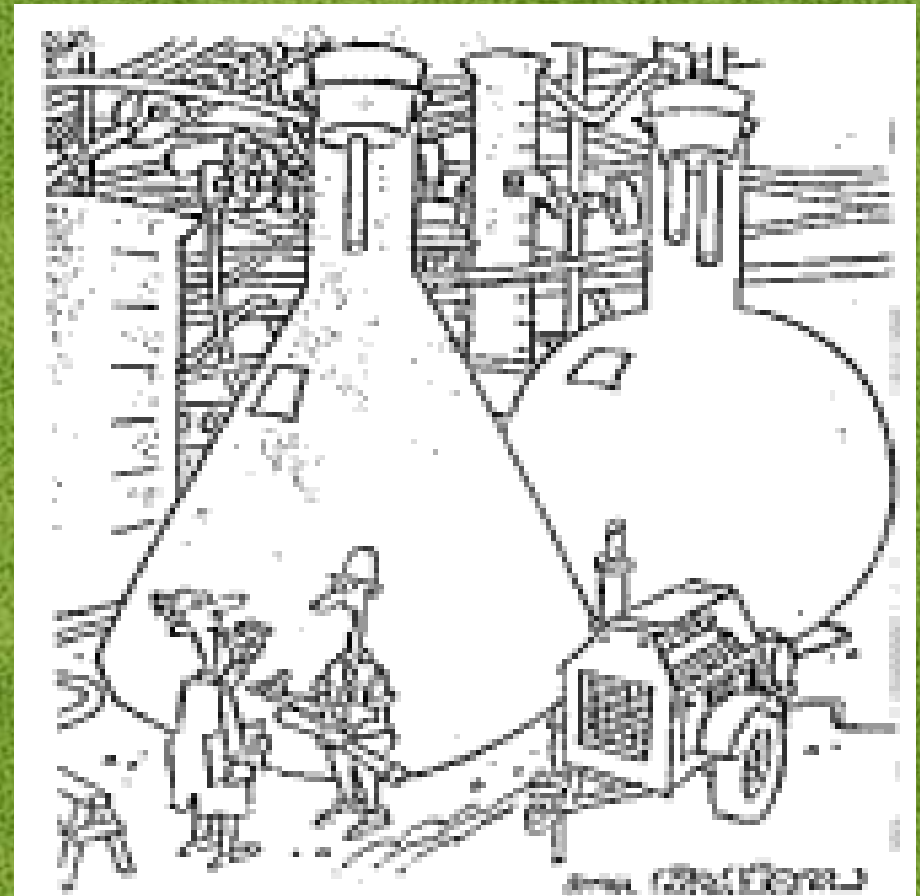


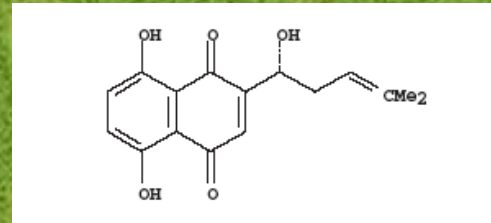
BIORREACTORES



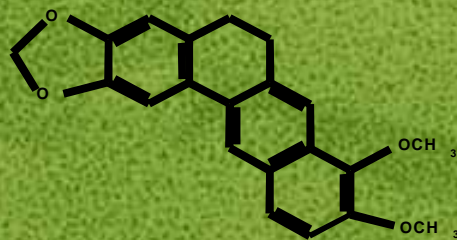
"Got a few problems going from lab scale up to full-scale commercial."

Various types of fermentors have been designed by many researchers since the end of 1950's.

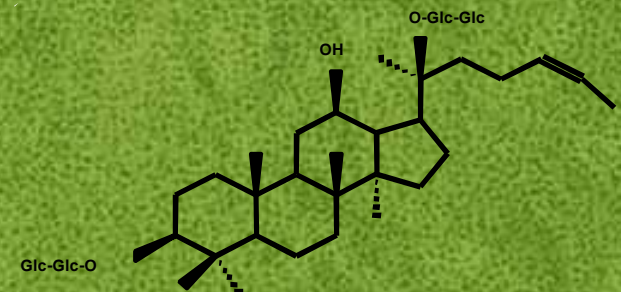
En la actualidad se encuentran desarrollados, entre otros, a escala industrial de producción los procesos para obtención de shikonina por cultivo de células de *Lithospermum erythrorhizon*, puesto a punto por la Industrias Petroquímicas Mitsui,



así como la producción de berberina



y biomasa de ginseng



Los procesos industriales requieren de tres puntos fundamentales:

- Crecimiento eficiente en grandes volúmenes**
- Acumulación de metabolitos secundarios en el cultivo**
- Si el proceso implica bioconversión o producción de enzimas, que esto ocurra en las condiciones de operación del proceso**

Es necesario ajustar algunos parámetros :

- Presión parcial de oxígeno
- Presión parcial de dióxido de carbono
- pH
- Agitación y mezclado
- densidad del cultivo
- Temperatura
- Iluminación de ser necesario

Características	células microbianas	células vegetales dediferenciadas	consecuencias en el biorreactor
Tamaño	2-10 mm	10-200 mm	Rápida sedimentación, mayor sensibilidad al corte
Células individuales	pueden obtenerse	forman agregados	Rápida sedimentación
Velocidad de crecimiento	Alta t_d 1-2 horas	Baja t_d 2-5 días	Largos procesos, problemas para mantener esterilidad
Densidad del inóculo	pequeño	5-20 %	Problemas de manipuleo. Dificulta la posibilidad de escalado
Sensibilidad al esfuerzo de corte	no sensitivo	sensitivo/tolerante	Disminución de la velocidad de agitación
Aireación	alta	baja	Baja demanda de oxígeno, bajo $K_L a$

agitación



transferencia de oxígeno

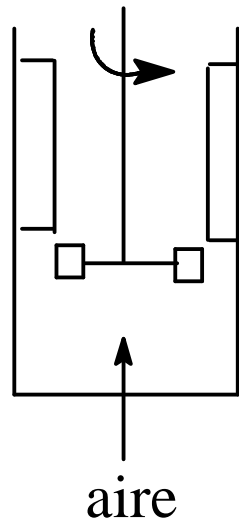
- Aumenta el área de transferencia de oxígeno por la formación de pequeñas burbujas
- Retarda el escape de burbujas desde el líquido
- Previene la coalescencia de las burbujas de aire
- Disminuye el grosor de la interfase gas/líquido al crear un flujo turbulento

Efecto de corte

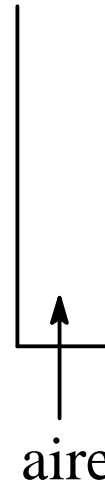
La agitación como factor de transferencia de masa

- Asegurar el suministro de nutrientes a nivel celular
- Prevenir la sedimentación
- Asegurar la transferencia de gases
- Solubilizar componentes menos solubles de los medios

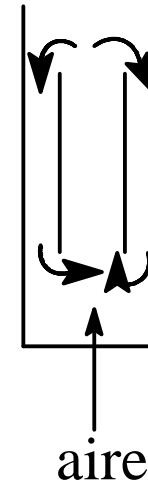
Diseños básicos de biorreactores para múltiples propósitos



Tanque agitado

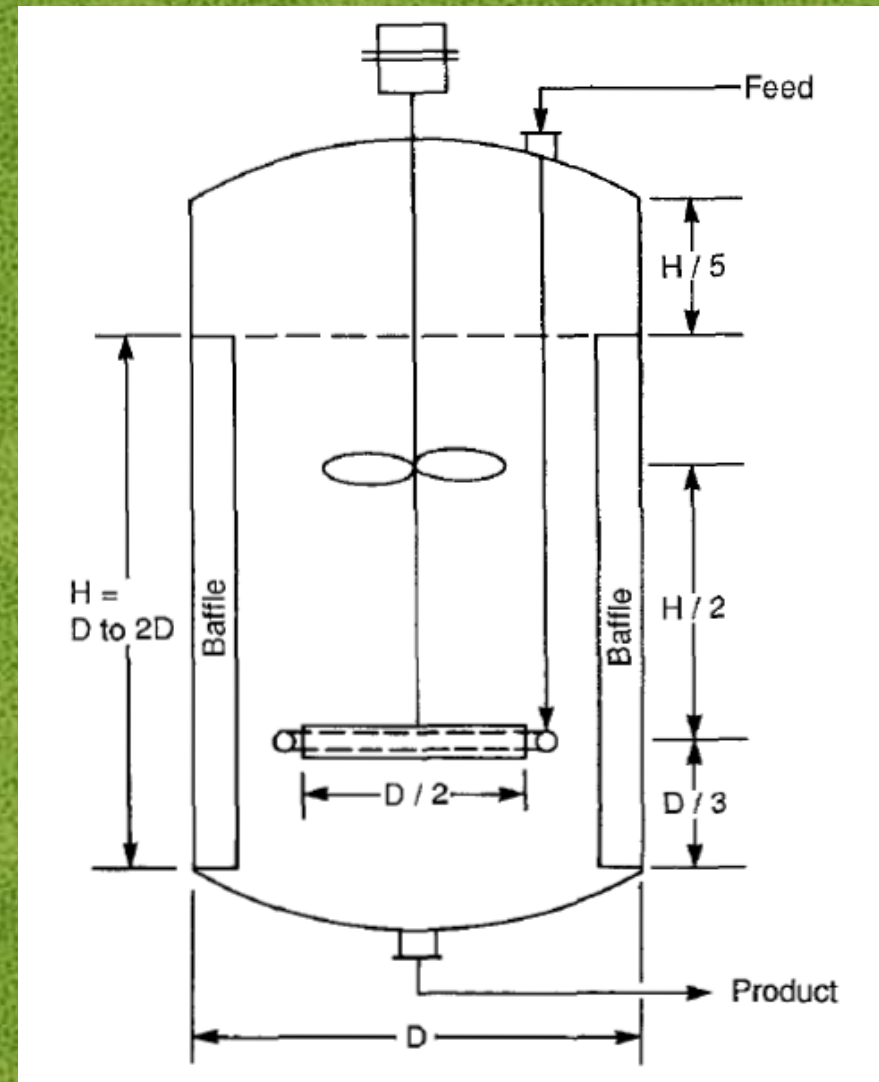


Columna de burbujas



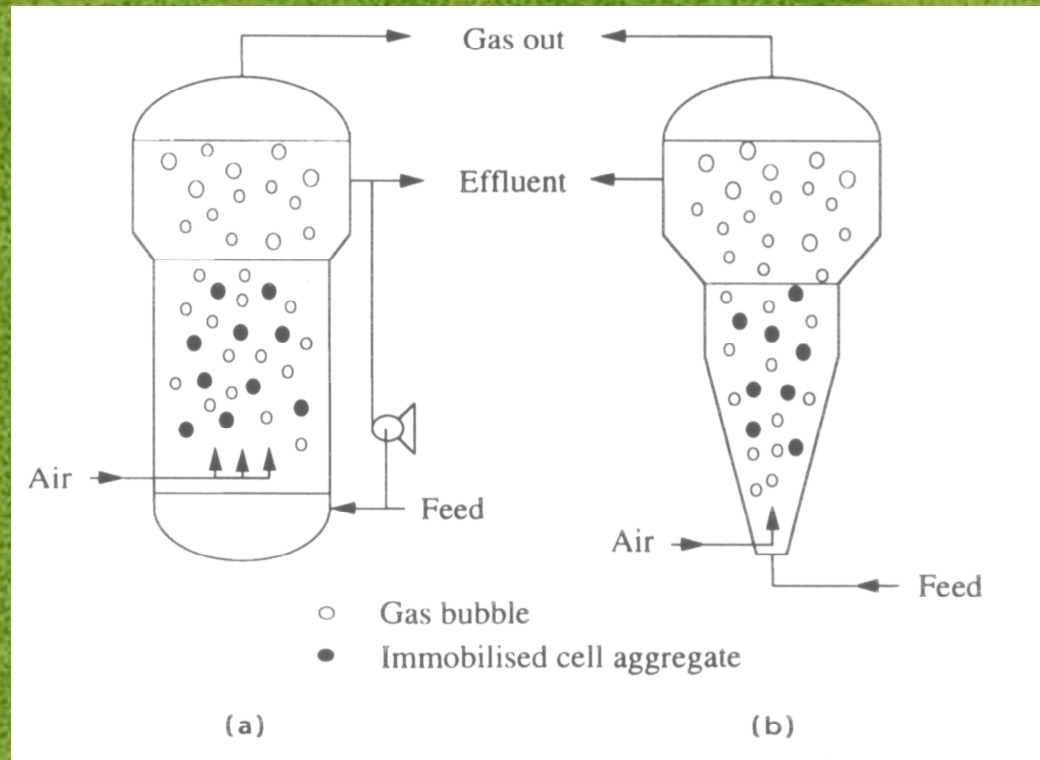
air lift

Tanque agitado



Proporciones típicas de un tanque agitado

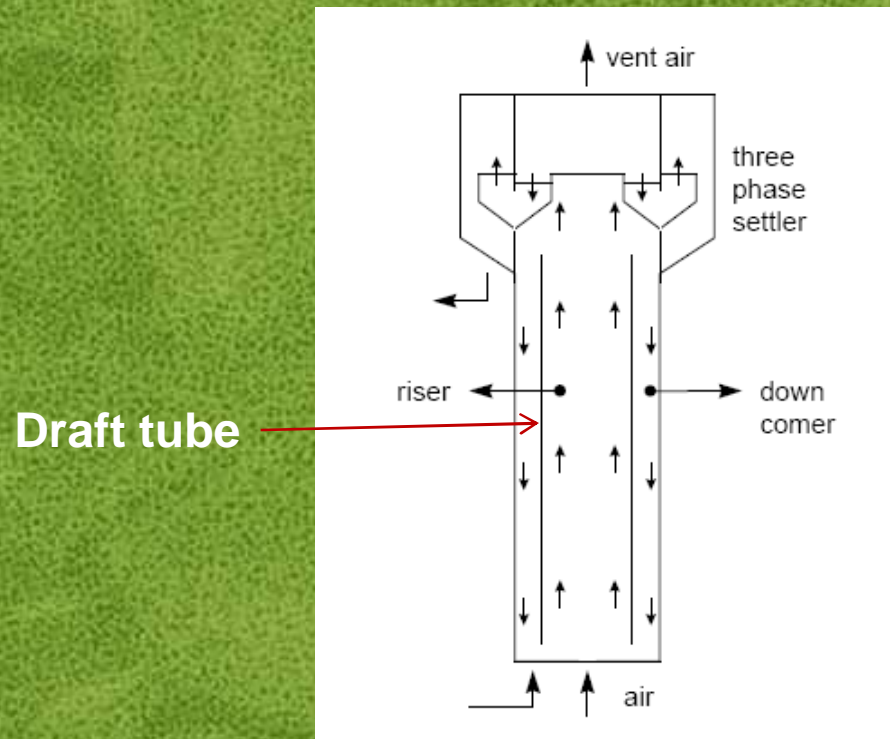
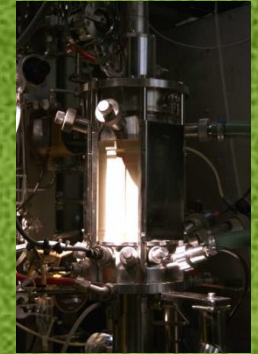
Reactores de lecho fluido (columna de burbujas)



a) Reactor de lecho fluido

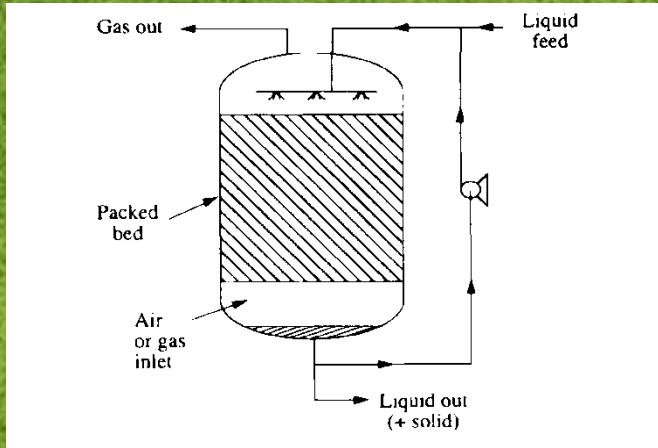
b) Reactor de lecho fluido cónico

Dalton en 1978 diseñó un reactor de bajo esfuerzo de corte denominado **“air lift”**



Airlift - uses air sparging to pneumatically mix the media

Algunas variantes

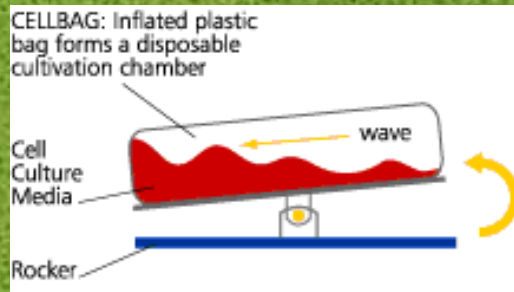


Reactores de lecho fijo por goteo

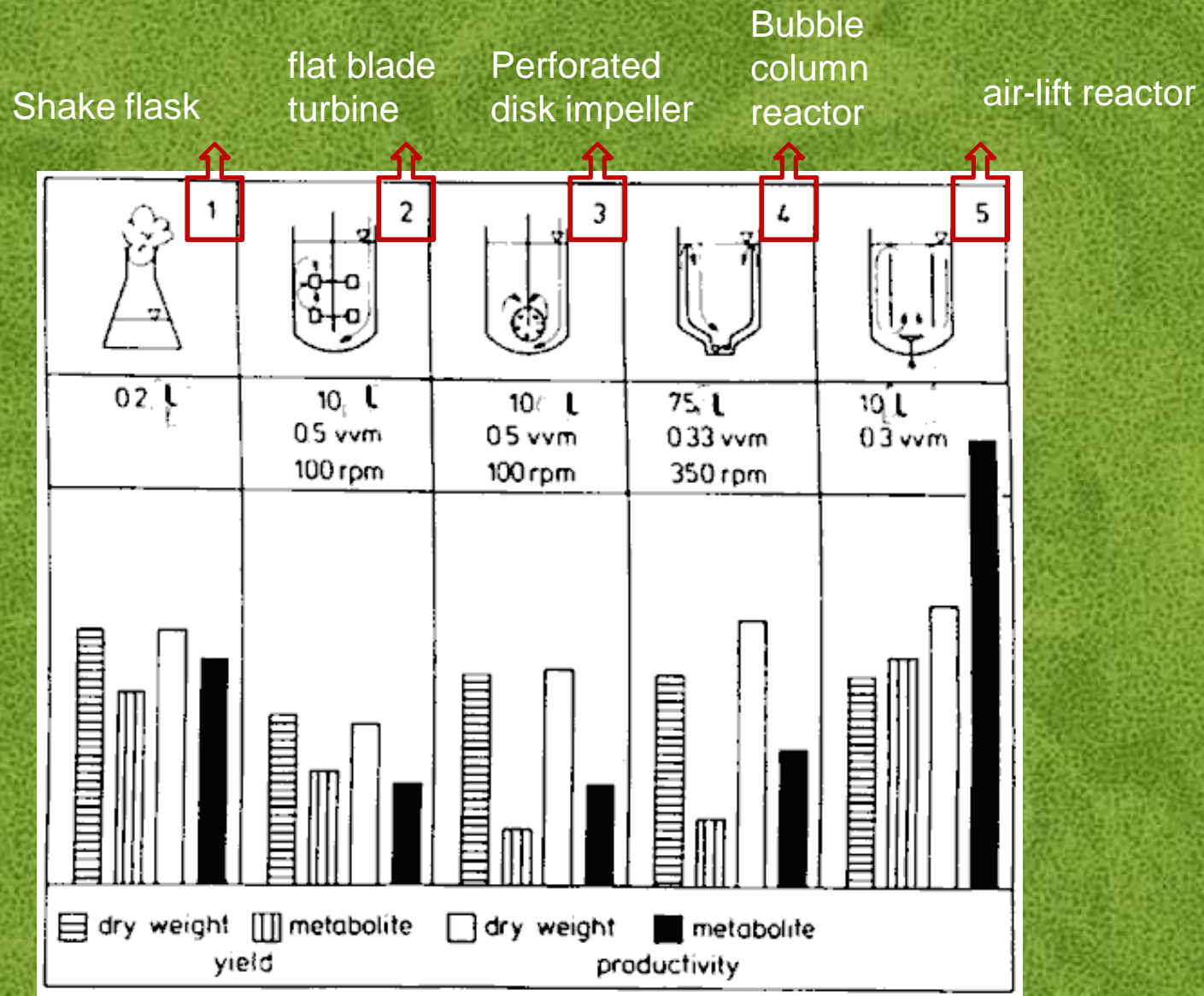


Mini air lift "invertido"

Bolsas descartables

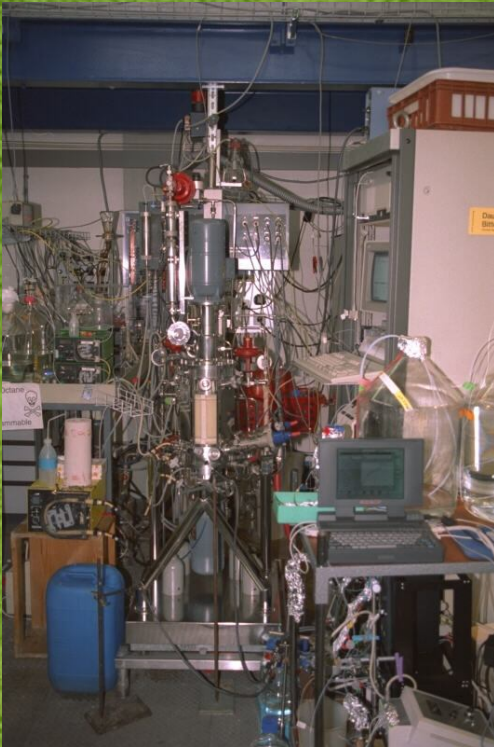


Comparison of Yield and Productivity for Cell Mass and Anthraquinones in Various Reactor Systems

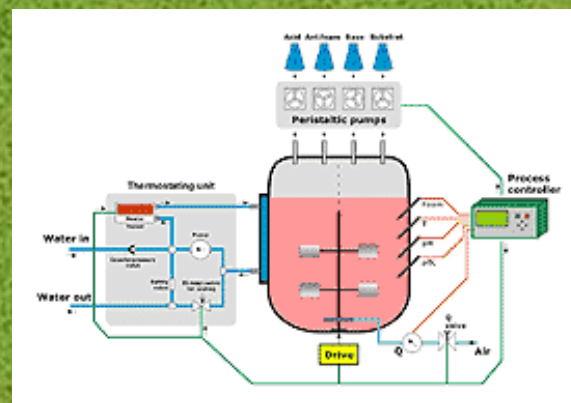


Wagner, F. In "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological application"
 Ed. Barz, W. et al., p. 250 (1977). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

PROCESS MONITORING AND CONTROL



¿Que parámetros controlar?



Temperatura

pH

Presión parcial de O_2

Formación de espuma

Ej. Producción de alcaloides terpenoindólicos con cultivos celulares de *Uncaria Tomentosa* “uña de gato” en tanque agitado

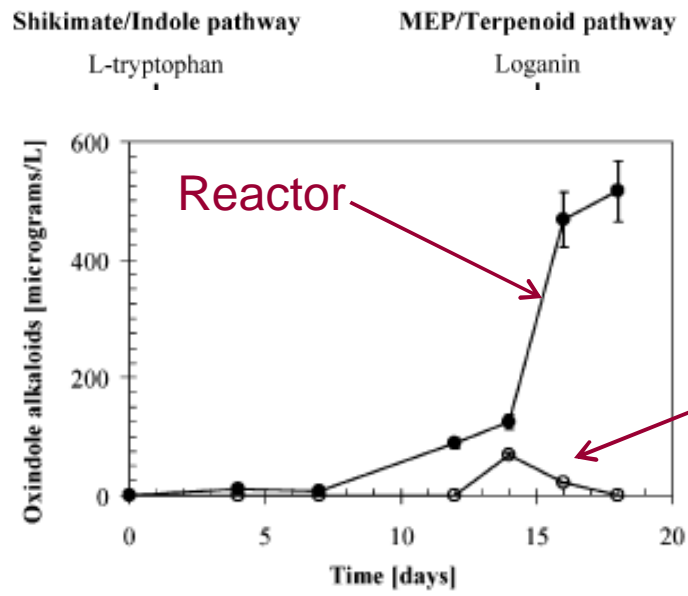


Figure 5. Time course of total monoterpenoid oxindole alkaloid production by *U. tomentosa* cell cultures grown in a stirred tank (●) and in Erlenmeyer flasks (○). Error bars indicate standard deviation from the mean ($n = 6$).

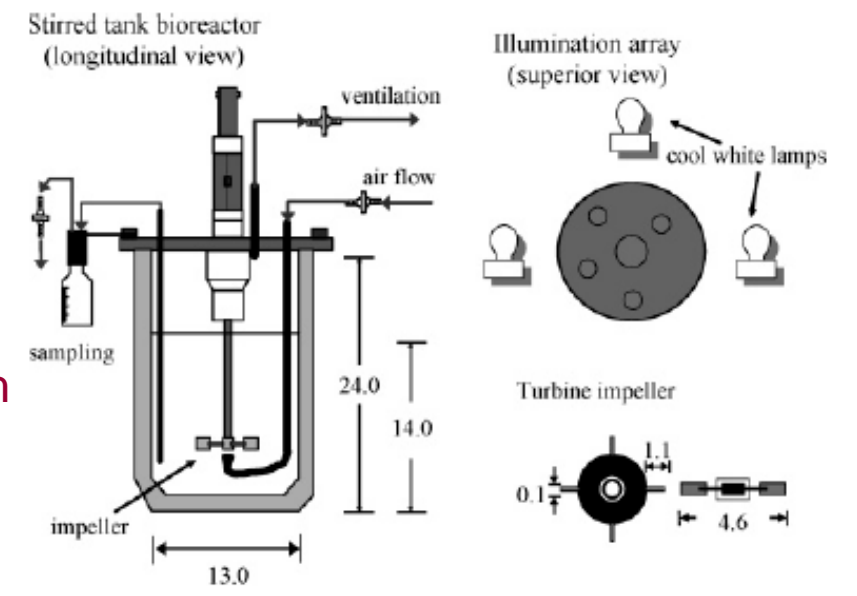
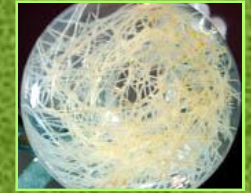


Figure 2. Stirred tank bioreactor configuration (dimensions in cm), impeller type, and illumination array with cool white fluorescent lamps.

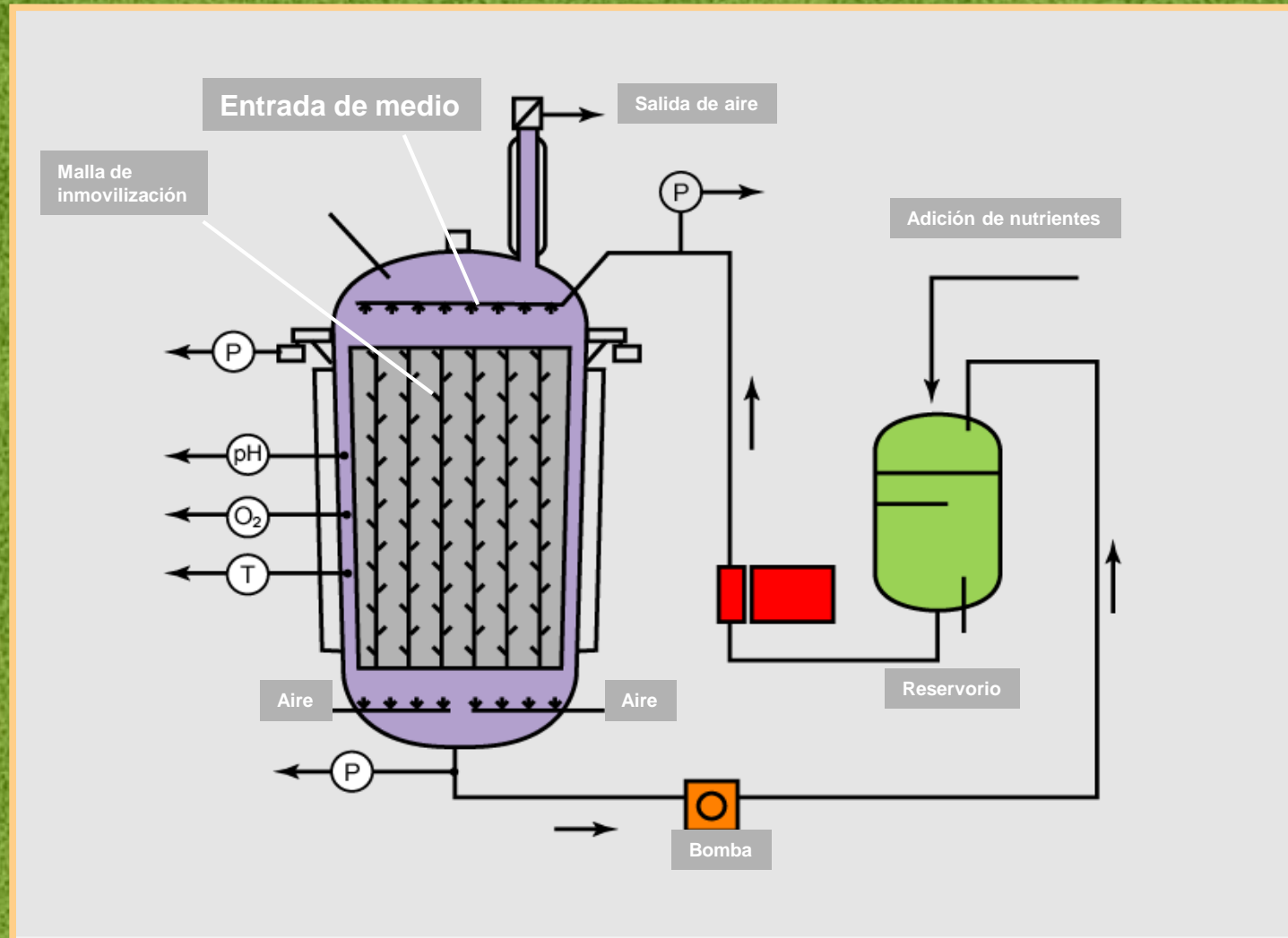
Characteristics of plant cell suspensions and organized cultures

Characteristic	Suspension	Root, shoot, embryo	'Hairy' roots
Size	10–200 μm in length, often aggregated, up to 2 mm in diameter	Large organized structures, up to 2 cm in length	Long, highly branched roots; negatively geotropic
Growth rate	Doubling times 2–5 days	Doubling times long (5–15 days)	Rapid growth
Aeration requirement	Low	Low, may require certain levels of CO_2 or ethylene	Low
Shear stress sensitivity	In a number of cases, tolerant	Probably sensitive	Sensitive

Biorreactores para el cultivo de raíces

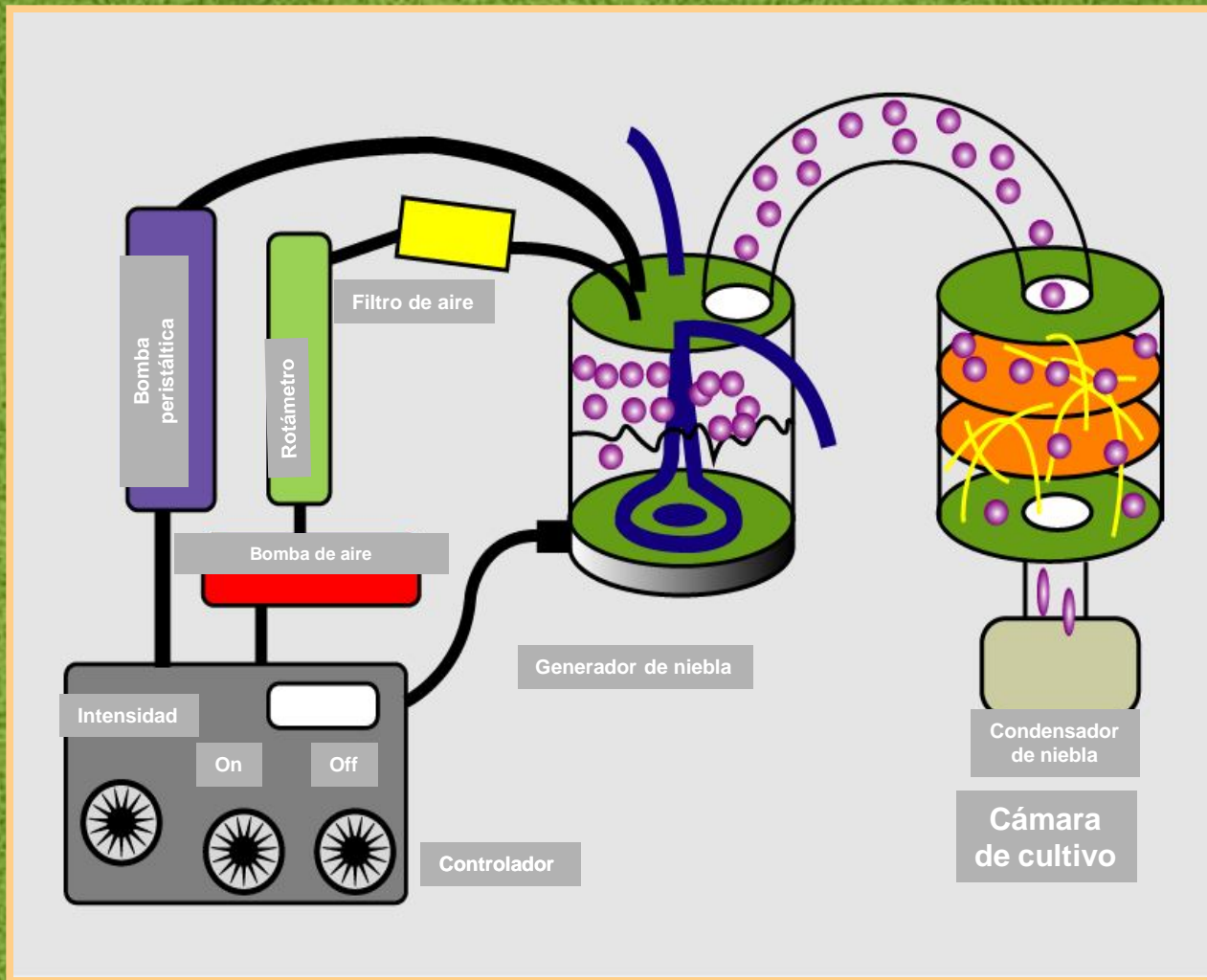


Bioreactor de lecho de goteo con malla para inmovilizar a las raíces



Biorreactores para el cultivo de raíces

Bioreactor de lecho de niebla (*nutrient mist reactor*)

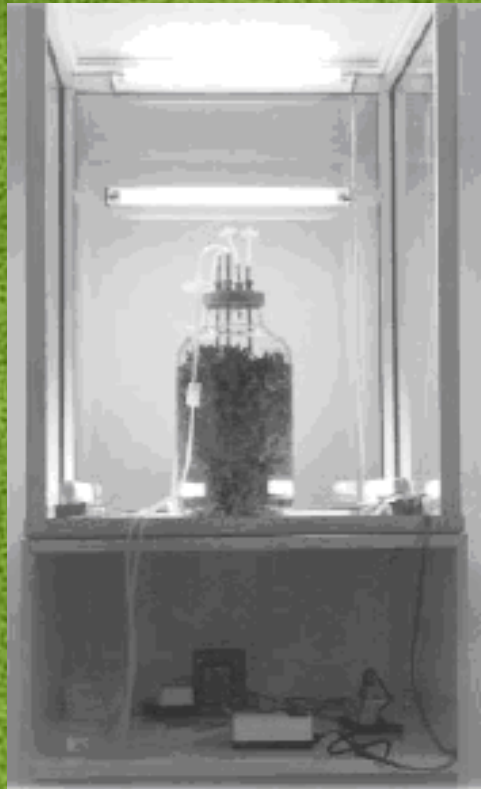


A nutrient mist reactor is substantially the same as aeroponic growth of plants as proposed by botanists



Growth of hairy roots in the 3 L MTR on the 16th day

Biorreactores para cultivo de otros órganos



Pineapple micropropagation using the bioreactor system.



10 liter vessel bioreactor containing 10-week old pineapple culture in elongation stage.

Para cultivo de órganos

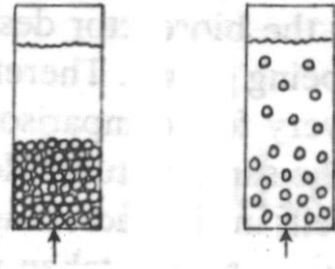


MTB

Centaurium erythraea **shoot culture** in mist trickling bioreactor after 21 days.

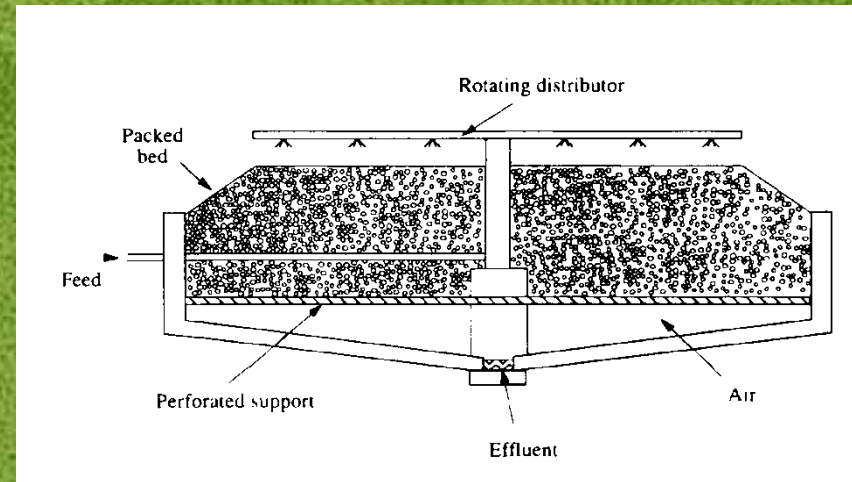
Modelos para células inmobilizadas

Alginate entrapped cells

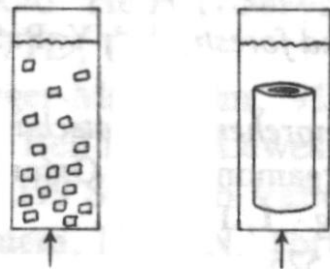


Packed bed

Fluidised bed



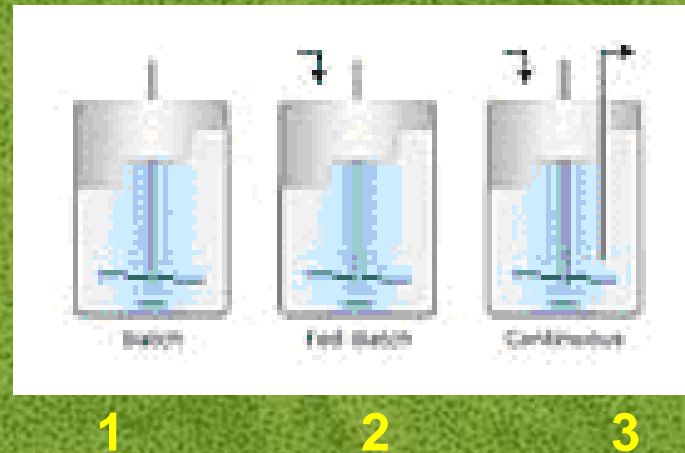
Polyurethane entrapped cells



Fluidised cubes

Polyurethane
draft tube

Operación de Biorreactores



1.Batch:

Son **sistemas cerrados** que se caracterizan por cambiar las condiciones fisiológicas y ambientales.

No hay entrada ni salida de medio de cultivo.

Operación de Biorreactores



2. Batch alimentado:

Estos sistemas operan adicionando medio fresco, pero sin remoción del existente.

Son muy útiles cuando se requiere **una elevada densidad celular** en la etapa de iniciación del proceso que implica un alto consumo de nutrientes, especialmente de fuente hidrocarbonada que suele funcionar como sustrato limitante.

Variante del batch alimentado:

2.1-Draw-fill o semicontínuo:

Consiste en remover, al final de la operación entre un 80 y un 90 % del cultivo y reemplazarlo por medio fresco.

De esta manera puede **eliminarse el período lag**, satisfacerse sencillamente la necesidad de contar con inóculos de gran tamaño y a su vez evitar la esterilización del reactor entre dos ciclos.

Operación de Biorreactores



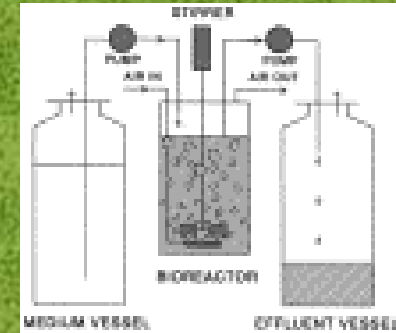
3.Continuo:

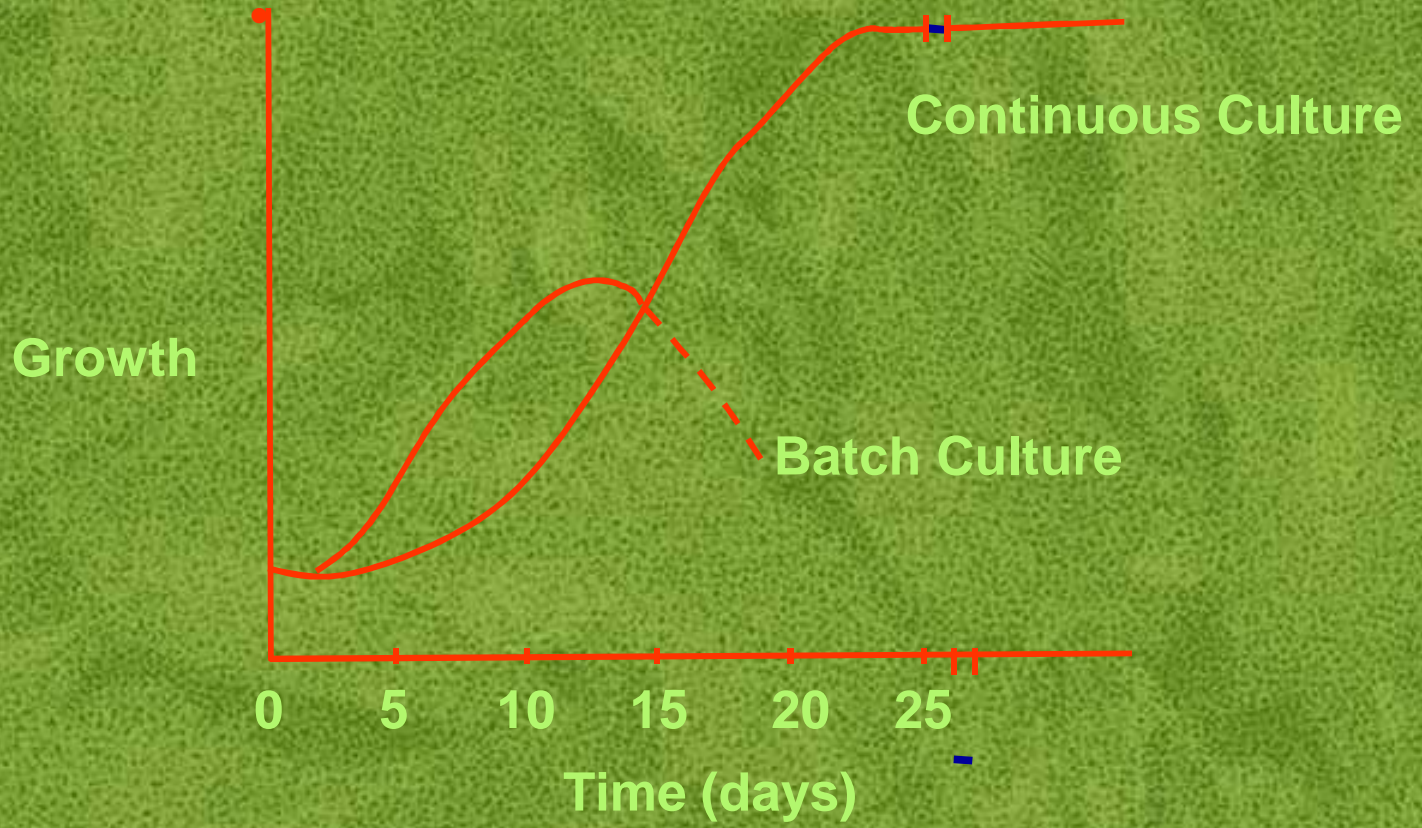
- el caudal de entrada de medio fresco es igual al de salida de medio utilizado.
- Son utilizados en cultivos donde la **velocidad de crecimiento celular es constante** por lo que existe un suministro constante de nutrientes o para la remoción permanente de producto sobre todo en sistemas inmobilizados.

Operación de Biorreactores

3.Continuo:

- Este tipo de operación presenta grandes inconvenientes con respecto al mantenimiento de las condiciones de asepsia del proceso, y se dificulta debido a la tendencia a formar agregados de las células vegetales en cultivo, la formación de merengue y el lento crecimiento celular.
- Para su buena aplicación se requiere del diseño de sistemas que permitan suplementar continuamente el medio de cultivo evitando la remoción de las células y así minimizar lo que se denomina **lavado** del cultivo.
- Una variante es la **Perfusión** que implica la remoción y suministro de medio dejando la biomasa ocluida en una malla.





Remoción de producto *in situ*

- **Líquido-líquido:**

Compuestos inmiscibles en agua, como solventes orgánicos o lípidos (sistemas de dos fases agua-orgánico). Ejemplos: migliol, hexadecano, dodecano.

- **Sólido-líquido:**

La segunda fase es un material sólido como resinas u otros absorbentes. Generalmente resinas como XAD, RP18, etc.

- **Requerimientos:**

- Autoclavables
- No tóxicos
- Fácil separación del producto de interés de la segunda fase
- No modificación del medio de cultivo
- Permanencia de las células en la fase acuosa

Adaptaciones para la extracción *in situ* del producto

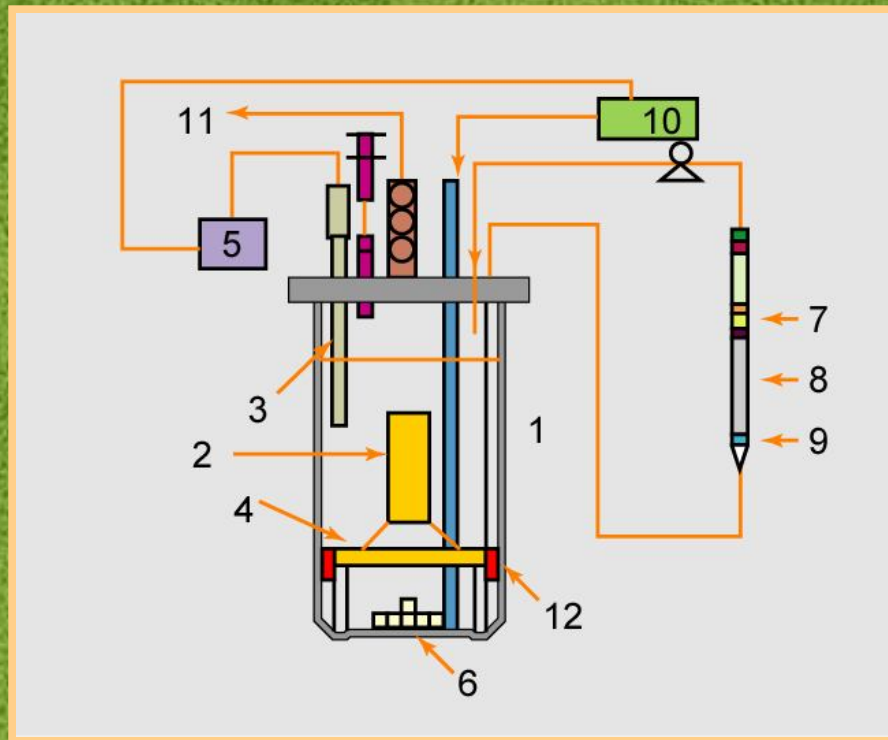
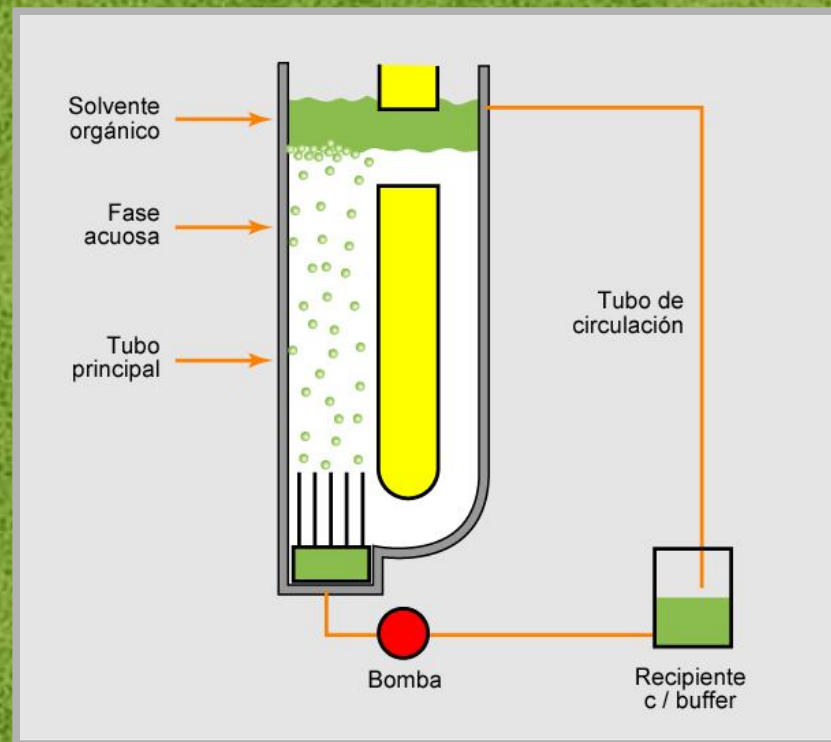


Diagrama de un tanque de agitación mecánica modificado para operar con remoción *in situ* del producto.

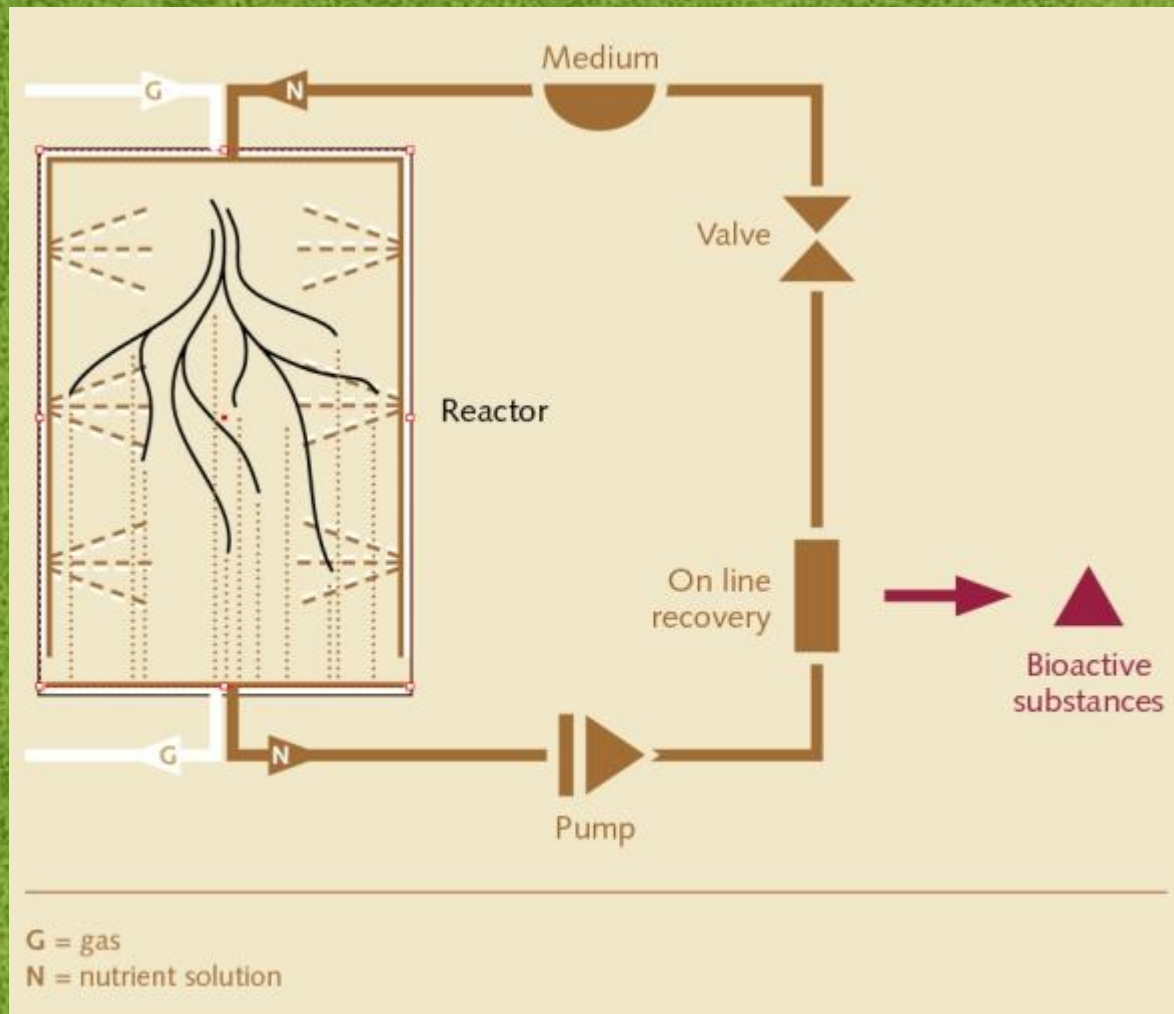
- 1: tanque;
- 2: malla de acero inoxidable para inmovilizar raíces;
- 3: sensor de oxígeno;
- 4: malla acero inoxidable;
- 5: medidor DO; 6: agitador;
- 7: lana de vidrio;
- 8: resina XAD-2;
- 9: filtro de vidrio;
- 10: generador de aire;
- 11: condensador;
- 12: marco de la malla

Adaptaciones para la extracción *in situ* del producto



Un bioreactor de agitación por líquido con *loop* externo

ROOTec Mist Bioreactor (RMB)



<http://www.rootec.com/index.php?p=2>

Large-scale suspension cultures reactors for plant cell cultures

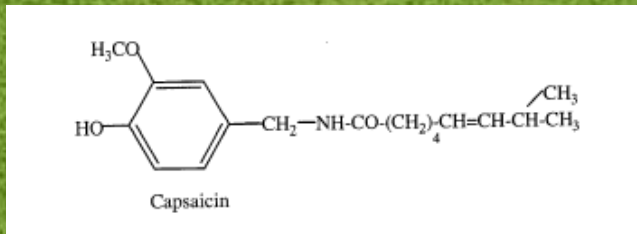
Plant species	Product	Bioreactor capacity	Reference
<i>Cath. roseus</i>	Serpentine	100 l airlift	Smart and Fowler (1981)
<i>Col. blumei</i>	Rosmarinic acid	300 l airlift	Rosevear (1984)
<i>L. erythrorhizon</i>	Shikonin	750 l agitated	Tabata and Fujita (1985)
<i>N. tabacum</i>	Biomass	20,000 l agitated	Kato et al. (1976)
	Biomass	1500 l bubble column	Noguchi et al. (1977)
<i>Panax ginseng</i>	Saponins	20,000 l agitated	Ushiyama et al. (1986)
<i>E. purpurea</i>	Biomass	750–75,000 l agitated	Ritterhaus et al. (1990)
<i>Ra. serpentina</i>	Biomass	750–75,000 l agitated	Ritterhaus et al. (1990)
<i>Panax ginseng</i>	Biomass	750–75,000 l agitated	Ritterhaus et al. (1990)

Biotechnology Advances 20 (2002) 101–153

S. Ramachandra Rao, G.A. Ravishankar

Ejemplo integrado

capsaicin production in 2-l airlift culture vessel using immobilized cells.



1. 20-day-old *Capsicum* cells to placenta (100-g fresh weight).
2. Alginate and calcium chloride solution required to envelop 100-g cells/placenta in beads. One litre of 2.5% (w/v) sodium alginate with cells extruded into 2 l of 0.9% (w/v) calcium chloride dihydrate.
3. Beads washed with water were transferred into the vessel containing 1 l of MS medium supplemented with 3% sucrose, 2-mg/l 2,4-D and 0.5-mg/l kinetin [standard medium (SM)].
4. Airflow (2:1 mixture of CO₂ + air for the initial 7 days of culture and 4:1 for the latter 7 days of production) at a rate of 4 V.V.M.
5. Incubation at 25 ± 2 °C under continuous light of 2000 lx.
6. pH adjustment to 5.8 during culture.
7. Replenishment of entire medium after 7 days with fresh medium.
8. Capsaicin recovery and analysis in 2 weeks of culture with two harvests at 7-day intervals.

Ejemplo integrado

capsaicin production in 2-l airlift culture vessel using immobilized cells.

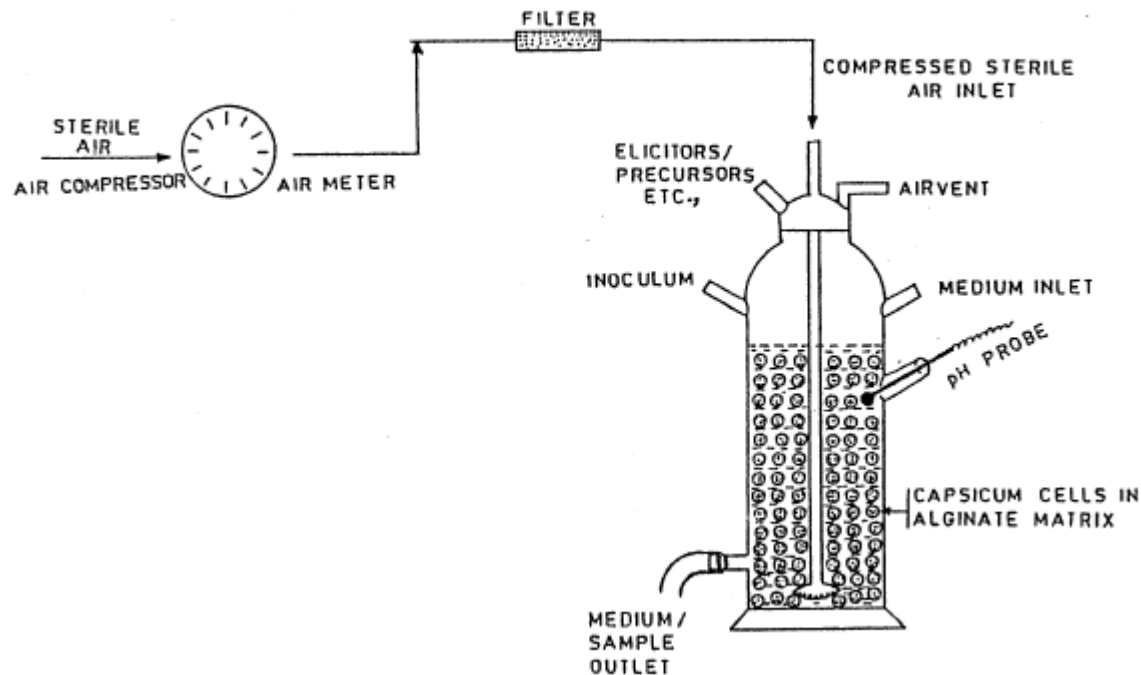
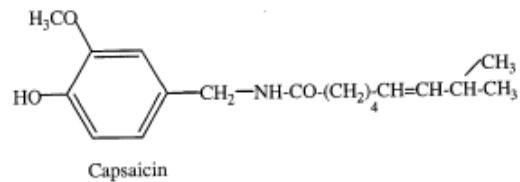


Fig. 4. Schematic representation of column reactor process for capsaicin production using immobilized cell cultures of *Ca. frutescens*.

Producción de shikonina por suspensiones celulares de *Lithospermum erythrorhizon*



Yamasaki Plant Photo Gallery



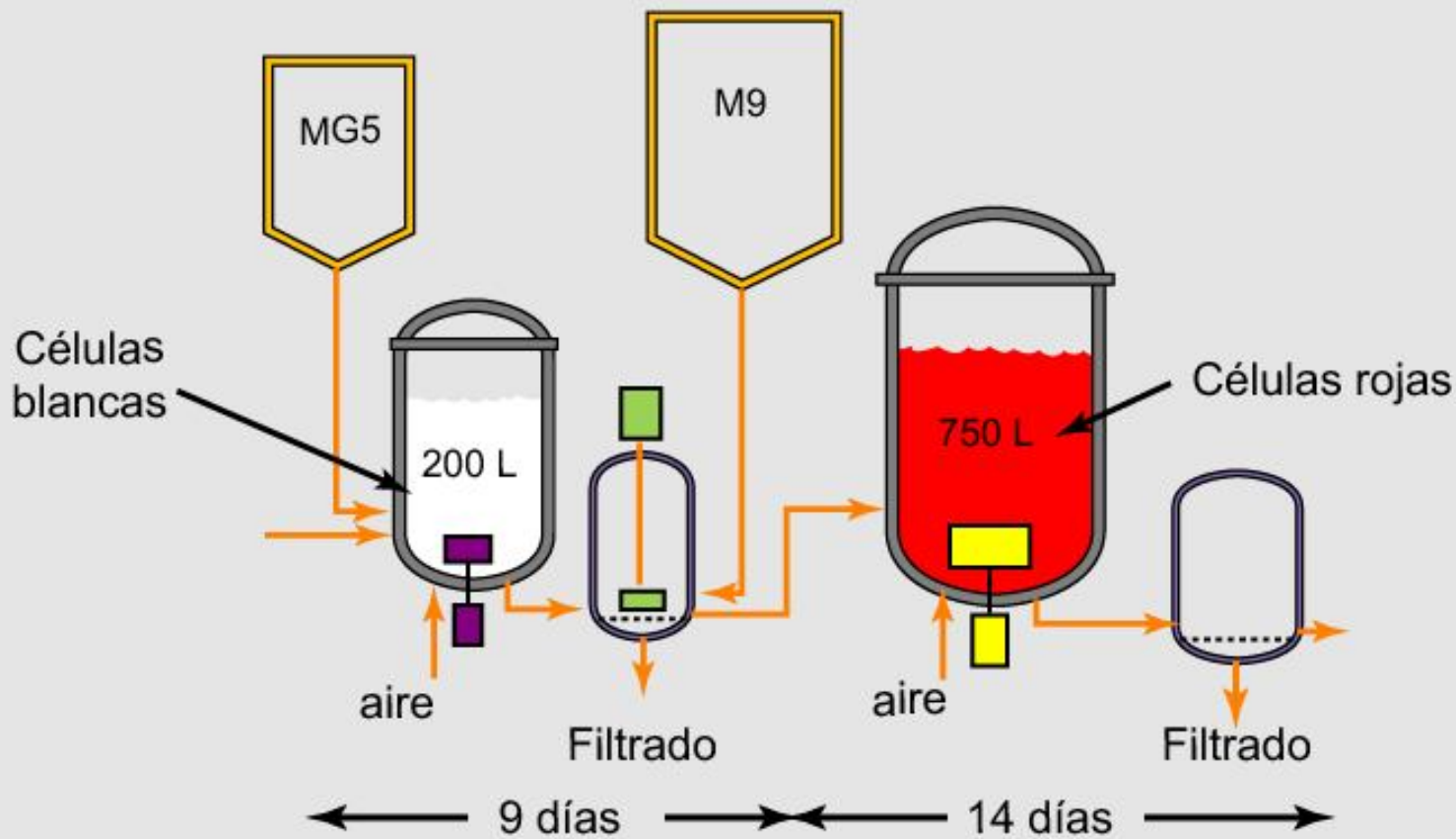
- **Planta entera**

- La extracción se realiza en plantas de aproximadamente 3 años.

- **Suspensiones celulares**

- 2,4-D estimula el crecimiento pero no la producción.
 - Las bajas concentraciones de nitrógeno y la elicitación inducen la producción de shikonina.

Proceso para la producción de shikonina a partir de células de *Lithospermum erythrorhizon* por Mitsui Petrochemical Ind.



Tomado de: Scraag. Plant Biotechnology, 1992.

Se utilizan fermentadores de agitación mecánica y tambor rotatorio. La productividad de shikonina es 840 veces superior a la de planta entera.

Secuencia en la optimización de un proceso para la producción de metabolitos secundarios

Selección de la planta por su contenido de metabolitos secundarios para iniciar cultivos *in vitro*



Establecimiento de cultivos *in vitro*



Estabilización y selección de cultivos *in vitro*: velocidad de crecimiento, niveles de producto, liberación al medio



Optimización de medio de cultivo para producción por diseño factorial: nutrientes, precursores, elicitación, liberación y remoción *in situ*



Optimización en bioreactores: escalado
Sistema de cultivo: *batch*, continuo, *fed-batch*, perfusión, en dos etapas.

Extracción y purificación del producto

Esquema de un proceso completo para la producción de un metabolito secundario por cultivo *in vitro* de células y órganos vegetales

