

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

**CAMPUS- TUXTEPEC**

**“Evaluación del crecimiento de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* en biorreactor *airlift* y su efecto en la acumulación de metabolitos secundarios”**

**TESIS**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Biotecnología**

**PRESENTA:**

Éxiva Rachel Ramírez Morrugares

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Edgar García López

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México 2019**

## **RECONOCIMIENTO**

**El presente trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Edgar García López, en las instalaciones del laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec.**

## **AGRADECIMIENTO**

Porqué desde qué lo conocí, es mi padre. Gracias a Dios por absolutamente todo.

A mi madre, porqué siempre me ha dado más de lo que ha tenido, por la ayuda que me ha brindado, cada consejo, cada llamada de atención, cada palabra de aliento. Porqué sus palabras son refrescantes para el alma en el momento adecuado. Realmente todo logro en mi vida es para ella y por ella.

A mi padre, qué lamentablemente compartió conmigo sólo un poquito de mi vida, atesoro cada momento que me brindó y tengo la certeza que su recuerdo estará en mi para siempre.

A mis hermanos y hermanas, por su voto de confianza, por sus palabras de apoyo, por cada momento feliz, por su interés reflejado en una llamada de teléfono, por esas risas nocturnas y porqué en cada momento difícil han mostrado su amor por mí. Gracias por su esfuerzo y lo que cada uno ha sembrado en mi vida.

A mis hijos por el amor dulce y el aprendizaje que día a día me brindan.

A mis tíos y abuelita, que, aunque estemos lejos, sé que ese lazo no se rompe.

A los amigos que se han convertido en familia.

Al director de esta tesis, Dr. Edgar García López por su apoyo, paciencia y aprendizaje.

A mi comité tutorial por las aportaciones y apoyo, Dra. Ariana, Dra. Jacqueline, Dr. Paul gracias por sus consejos y compartir sus anécdotas que creo que a más de uno nos ha sido de gran ayuda. A los catedráticos que aportaron a este trabajo como revisores, Dr. Cirilo, Dr. Oscar y Dr. Miguel Ángel. Para todos, como profesores mi admiración y respeto.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo que en su momento cada uno me brindó.

A los encargados de los diversos laboratorios de la UNPA por facilitar el trabajo

Muchas gracias

## DEDICATORIA

*A mi familia*



# UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/362
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 28 de octubre de 2019

**L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL**  
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Éxiva Rachel Ramírez Morrugares**, matrícula **16140012**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Evaluación del crecimiento de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* en biorreactor airlift y su efecto en la acumulación de metabolitos secundarios**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Beu Lo-tama, chí jí jú



**Dr. Adolfo López Torres**

Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Exiva Rachel Ramírez Morrugares - Estudiante

C.c.p. Archivo



## INDICE

INDICE DE TABLAS .....	IX
INDICE DE FIGURAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1 Generalidades de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	2
2.2 Propiedades medicinales de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	4
2.3 Particularidades de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	5
2.3.1 Metabolitos secundarios .....	5
2.3.2 Glucósidos de esteviol .....	5
2.3.3 Síntesis de glucósidos de esteviol .....	6
2.4 Estrategias biotecnológicas de mejora de producción de metabolitos secundarios .....	8
2.4.1 Cultivo <i>in vitro</i> vegetal.....	8
2.4.2 Cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	10
2.4.3 Elicitación.....	11
2.4.4 Ingeniería metabólica .....	13
2.4.5 Raíces transformadas y su proceso de agrotransformación.....	13
2.4.6 Crecimiento en biorreactor.....	15
2.4.7 Biorreactores utilizados en biotecnología vegetal para el cultivo <i>in vitro</i> de raíces.....	16
2.4.8 Biorreactor <i>airlift</i> .....	18
3. JUSTIFICACIÓN .....	21
4. HIPOTESIS .....	22
5.OBJETIVOS .....	22
5.1 Objetivos generales .....	22
5.2 Objetivos específicos.....	37
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DEL PROYECTO .....	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
7.1 Material vegetal.....	24
7.2 Medios de cultivo .....	24
7.3 Evaluación de las características fenotípicas de raíces transformadas .....	24

7.4 Cinéticas de crecimiento en matraz .....	25
7.5 Preparación del biorreactor .....	25
7.5.1 Cinéticas de crecimiento en biorreactor .....	26
7.5.2 Determinación de azúcares totales .....	26
7.5.3 Determinación de parámetros cinéticos .....	27
7.6 Determinación de la productividad de glucósidos de esteviol .....	28
7.6.1 Extracción de GE .....	28
7.7 Cromatografía en capa fina (TLC) .....	28
7.8 Extracción y cuantificación de fenoles totales .....	29
7.9 Análisis estadístico .....	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
8.1 Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>S. rebaudiana</i> transformadas SRSDXS y no transformadas en medio líquido .....	30
8.2 Perfil de crecimiento de líneas transformadas M5R4, SRSDXS y no transformadas .....	30
8.3 Efecto de la concentración del medio de cultivo MS sobre raíces transformadas .....	32
8.4 Cinéticas de crecimiento, conductividad, y consumo de sacarosa de las líneas NT, m5R4 y SRSDXS en matraz. ....	35
8.4.1 Cinética M5R4 .....	35
8.4.2 Cinética de crecimiento de la línea transformada SRSDXS .....	41
8.4.3 Cinética de crecimiento de la línea NT .....	43
8.4.4 Cinéticas de crecimiento, conductividad, consumo de sacarosa y pH de las líneas NT, M5R4 y SRSDXS en biorreactores <i>airlift</i> .....	48
8.5 Acumulación de fenoles totales en raíces transformadas M5R4, SRSDXS y no transformadas de <i>Stevia rebaudiana</i> . ....	69
8.6 Perfiles de acumulación de Glucósidos de esteviol por TLC .....	73
9. CONCLUSIONES .....	75
10. RECOMENDACIONES .....	76
11. PERSPECTIVAS .....	77
12. BIBLIOGRAFIA .....	78
13. ANEXOS .....	91

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	3
<b>Tabla 2.</b> Propiedades deseables en un biorreactor para el crecimiento de raíces transformadas .....	17
<b>Tabla 3.</b> Cultivo de raíces de <i>S. rebaudiana</i> en biorreactor .....	18
<b>Tabla 4.</b> Cultivo de raíces en biorreactor <i>airlift</i> .....	20
<b>Tabla 5.</b> Esquema general del diseño experimental de cuadrado latino que se utilizó para las cinéticas de crecimiento en biorreactor <i>airlift</i> .....	26
<b>Tabla 6.</b> Comparación de índices de crecimiento en los diferentes cultivos de raíces <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> después de 15 días. ....	31
<b>Tabla 7.</b> Comparación de índices de crecimiento y acumulación de biomasa de raíces M5R4 de <i>Stevia rebaudiana</i> a 6 días en diferentes medios de cultivos. ....	32
<b>Tabla 8.</b> Conductividad eléctrica inicial y final de las raíces transformadas M5R4 de <i>Stevia rebaudiana</i> en diferentes concentraciones de medio MS después de 6 días de cultivo. ....	34
<b>Tabla 9.</b> Parámetros cinéticos de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	46
<b>Tabla 10.</b> Características de los cultivos comparados creciendo en biorreactor <i>airlift</i> durante 7 días. ....	66
<b>Tabla 11.</b> Contenido de fenoles en cultivos en matraz de raíces transformadas M5R4, SRSDXS y no transformada de <i>Stevia rebaudiana</i> a 15 días. ....	69
<b>Tabla 12.</b> Contenido de fenoles totales de tratamientos de raíces transformadas M5R4 (C), SRSDXS (A) y no transformadas de <i>Stevia rebaudiana</i> (B) en reactor <i>airlift</i> . ....	69

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta <i>Stevia rebaudiana</i> .	2
<b>Figura 2.</b> Ruta biosintética de glucósidos de esteviol.	7
<b>Figura 3.</b> Usos del cultivo <i>in vitro</i> de plantas	9
<b>Figura 4.</b> Proceso de transferencia e integración de T-DNA de <i>Agrobacterium</i> a el genoma de la planta huésped.	14
<b>Figura 5.</b> Regímenes de operación: A) Lote (batch), B) Lote alimentado (Fed batch), C) Continuo.	16
<b>Figura 6.</b> Biorreactor <i>airlift</i> .	19
<b>Figura 7.</b> Diagrama experimental del proyecto.	23
<b>Figura 8.</b> A) Plántulas <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> línea transformada SRSDXS, y línea no transformada B) Raíces SRSDXS y no transformada en medio líquido.	30
<b>Figura 9.</b> Cultivos <i>in vitro</i> de raíces a) no transformadas (NT), b) línea M5R4 y c) línea SRDXS después de 15 días de crecimiento.	31
<b>Figura 10.</b> Raíces después de 6 días de crecimiento en a) mitad de sales de MS con vitaminas, b) Sales completas de MS con vitaminas y c) Sales completas de MS sin vitaminas. La figura muestra biomasa de tres unidades experimentales.	34
<b>Figura 11.</b> Cinética de crecimiento de raíces transformadas M5R4 y perfil de conductividad eléctrica en el medio de cultivo.	36
<b>Figura 12.</b> Correlación entre la conductividad y la acumulación de biomasa de raíces transformadas de <i>S. rebaudiana</i> .	38
<b>Figura 13.</b> Medida de pH durante la cinética de crecimiento de raíces transformadas M5R4.	39
<b>Figura 14.</b> Correlación de consumo de fuente de carbono con el crecimiento de raíces de <i>Stevia rebaudiana</i> M5R4.	40
<b>Figura 15.</b> Cinética de crecimiento y conductividad en el medio del cultivo de raíces transformadas SRSDXS.	41
<b>Figura 16.</b> Acumulación de biomasa y consumo de sacarosa en la cinética de raíces transformadas SRSDXS.	42
<b>Figura 17.</b> pH y acumulación de biomasa durante la cinética de crecimiento de raíces transformadas SRSDXS.	43

<b>Figura 18.</b> Cinética de crecimiento y conductividad en el medio del cultivo de raíces no transformadas. ....	44
<b>Figura 19.</b> Acumulación de biomasa y consumo de sacarosa en la cinética de raíces no transformadas. ....	45
<b>Figura 20.</b> Medida de pH durante la cinética de crecimiento de raíces no transformadas. ....	45
<b>Figura 21.</b> A) Inoculo inicial de raíces SRSDXS en el reactor <i>airlift</i> B) Raíces SRSDXS al final de la cinética. ....	48
<b>Figura 22.</b> Parámetros evaluados en el tratamiento 1 (A). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L). ....	49
<b>Figura 23.</b> A) Inoculo inicial de raíces no transformadas en el reactor <i>airlift</i> B) Raíces no transformadas al final de la cinética. ....	50
<b>Figura 24.</b> Parámetros evaluados en el tratamiento 2 (B). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L). ....	51
<b>Figura 25.</b> A) Inoculo inicial de raíces M5R4 B) Raíces M5R4 al final de la cinética....	52
<b>Figura 26.</b> Parámetros evaluados en el tratamiento 3 (C). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L). ....	53
<b>Figura 27.</b> A) Inoculo inicial de raíces no transformadas B) Raíces no transformadas al término de la cinética. ....	54
<b>Figura 28.</b> Parámetros evaluados en el tratamiento 4 (B). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L). ....	55
<b>Figura 29.</b> A) Inoculo inicial de raíces transformadas M5R4 B) Raíces transformadas M5R4 al término de la cinética. ....	56
<b>Figura 30.</b> Parámetros evaluados en el tratamiento 5 (C). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L). ....	57
<b>Figura 31.</b> A) Inoculo inicial de raíces transformadas SRSDXS B) Raíces transformadas SRSDXS al término de la cinética. ....	58

<b>Figura 32.</b> Parámetros evaluados en el tratamiento 6 (A). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L). .....	59
<b>Figura 33.</b> A) Inoculo inicial de raíces transformadas M5R4 B) Raíces transformadas M5R4 al término de la cinética. ....	60
<b>Figura 34.</b> Parámetros evaluados en el tratamiento 7 (C). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L). ....	61
<b>Figura 35.</b> A) Inoculo inicial de raíces transformadas SRSDXS B) Raíces transformadas SRSDXS al término de la cinética. ....	62
<b>Figura 36.</b> Parámetros evaluados en el tratamiento 8 (A). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L). ....	63
<b>Figura 37.</b> A) Inoculo inicial de raíces no transformadas B) Raíces no transformadas al término de la cinética. ....	64
<b>Figura 38.</b> Parámetros evaluados en el tratamiento 9 (B). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L). ....	65
<b>Figura 39.</b> Cromatografía en capa fina de extractos de raíces de <i>Stevia</i> en matraz Carril A: Estándar de esteviósido B: Estándar de rebaudiósido C: Extracto de NT D: Extracto de M5R4 E: Extracto de SRSDXS. ....	73
<b>Figura 40.</b> Cromatografía en capa fina de extractos de raíces de <i>Stevia</i> en reactor. Carril A: Estándar de esteviósido, B: Estándar de rebaudiósido, C: Extracto de M5R4 (T- 3), D: Extracto de M5R4 (T-5), E: Extracto de M5R4( T-7), F: Extracto de NT (T-2) ,G: Extracto de NT (T-4), H: Extracto de NT (T9), I: Extracto de SRSDXS (T-1), J: Extracto de SRSDXS (T-6), K: Extracto de SRSDXS (T8). ....	73

## ABREVIATURAS

<b>GE</b>	Glucósidos de Esteviol
<b>Est</b>	Esteviósido
<b>Reb A</b>	Rebaudiósido A
<b>AG</b>	Ácido gálico
<b>AJ</b>	Ácido jasmónico
<b>MS</b>	Metabolitos secundarios
<b>T-ADN</b>	ADN de transferencia
<b>Ri</b>	Inductor de raíz
<b>TLC</b>	Cromatografía de capa fina
<b>vvm</b>	Volumen de aire por volumen de líquido por minuto
<b>gPF/L</b>	Gramos de peso fresco por litro
<b>g/L</b>	Gramos por litro
<b>CE</b>	Conductividad eléctrica
<b>AS</b>	Ácido salicílico
<b>mg de EAG</b>	miligramos de extracto de ácido gálico
<b>g EF</b>	gramos de extracto fresco
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>ZnO</b>	Óxido de zinc
<b>CuO</b>	Óxido de cobre

## RESUMEN

*Stevia rebaudiana*, es una planta relevante debido a los compuestos bioactivos que acumula llamados glucósidos de esteviol (GE) y que a su vez le confieren notables actividades biológicas para contrarrestar algunas afecciones como la hipertensión e hiperglucemia, también se le atribuyen propiedades anticancerígenas. El objetivo del presente trabajo experimental fue evaluar el crecimiento de raíces transformadas de *S. rebaudiana*, en matraz y biorreactor *airlift* y el efecto en la acumulación de metabolitos secundarios. Para lo cual inicialmente se evaluó el perfil de crecimiento en matraces agitados de las líneas transformadas SRSDXS, M5R4 y no transformadas (NT) durante 15 días. El índice de crecimiento que se obtuvo para M5R4 ( $4.6 \pm 0.41$ ) fue superior 1.53 y 1.39 veces respecto a las líneas no transformadas y SRSDXS. Las líneas no transformadas y SRSDXS, mostraron la mayor producción de compuestos fenólicos después de 15 días de cultivo ( $38 \pm 1.0^A$  mg AG/g de EF;  $32 \pm 4.0^A$  mg AG/g de EF) que fue 1.9 y 1.6 veces más que la línea M5R4 ( $20 \pm 1.0^B$  mg EAG/g de EF). Para conocer el desempeño de cada línea, se realizaron cinéticas en matraces agitados durante 30 días, para las líneas SRSDXS y NT, y 36 días para la M5R4. La línea M5R4 fue significativamente superior en acumulación de biomasa  $113.2 \pm 12.45$  g PF/L, que fue 1.6 y 1.34 veces más que la línea SRSDXS y la línea no transformada. Seguidamente, las líneas de raíces transformadas y no transformadas de *Stevia rebaudiana* se cultivaron en biorreactores *airlift* con capacidad volumétrica de 200 mL, utilizando un diseño experimental tipo cuadrado latino clásico, donde los factores a probar fueron: La velocidad de aireación (0.5, 0.8 y 1.0 vvm), la densidad de inóculo (2, 6 y 10 g/L) y el tipo de raíz (A=SRSDXS, B=No transformadas, C=M5R4). Después de los análisis de varianza y post-hoc se determinó que la densidad de inóculo tuvo un efecto significativo sobre la acumulación de biomasa ( $P=0.009$ ). Sin embargo, los demás factores no fueron significativos sobre las variables de respuesta ya que arrojaron valores de P que superaron la significancia. Por otro lado, la presencia de glucósidos de esteviol se siguió de manera cualitativa por cromatografía en capa fina (TLC), mostrando la acumulación en todos los tratamientos probados.

## ABSTRACT

*Stevia rebaudiana*, is a relevant plant due to the bioactive compounds that it accumulates called steviol glycosides (SG), which in turn confer to the plant remarkable biological activities to counter some conditions such as hypertension and hyperglycemia, and also anti-cancer properties. The objective of this experimental study was to evaluate the growth of transformed roots of *S. rebaudiana*, in flasks and *airlift* bioreactors, and assess the effect over the accumulation of secondary metabolites. Initially it was observed the growth profile in shaken flasks using the transformed lines SRSDXS, M5R4, and the non-transformed roots (NT) for 15 days. The growth index exhibited by M5R4 ( $4.6 \pm 0.41$ ) was higher, 1.53 and 1.39 fold, than the one showed by untransformed lines and SRSDXS. Non-transformed lines and SRSDXS, had the highest production of total phenolic compounds after 15 days of culture ( $38 \pm 1.0^A$  mg AG/gFE;  $32 \pm 4.0^A$  mg AG/gFE) which was 1.9 and 1.6 fold more than the content in line M5R4 ( $20 \pm 1.0^B$  mg AG/gFE). To know the performance of each root line, growth kinetic studies were conducted in shaken flasks for 30 days, for the lines SRSDXS and NT, and 36 days for M5R4. The M5R4 line had significantly higher biomass accumulation,  $113.2 \pm 12.45$  g FW/L, which was 1.6 and 1.34 fold more than the biomass accumulated by SRSDXS and non-transformed lines. Afterwards, transformed and non-transformed root lines of *Stevia rebaudiana* were cultivated in *airlift* bioreactors with volumetric capacity of 200 mL, using a latin square experimental design, where the factors to be tested were: the aeration speed (0.5 vvm, 0.8 vvm and 1.0 vvm), the inoculum density (2 g/L, 6 g/L, and 10 g/L) and the type of root (A=SRSDXS, B=untransformed, C=M5R4). After variance and post-hoc analysis it was determined that the inoculum density exerted a highly significant effect over the biomass accumulation ( $P = 0.009$ ). However the remaining factors were not statistically significant over the responses since their P values exceeded the significance threshold. On the other hand, the presence of steviol glycosides were qualitatively followed by thin layer chromatography (TLC), showing accumulation in all of the treatments tested.

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente las plantas medicinales tienen auge en la biotecnología, debido a su estudio y procesamiento han resultado ser fuente de principios activos llamados metabolitos secundarios; los responsables de ciertas funcionalidades como el sabor, el aroma y activos químicos que se utilizan para la formulación de productos farmacéuticos, alimenticios y cosméticos (Thiruvengadam *et al.*, 2016).

La planta *Stevia rebaudiana* nativa de Paraguay, ha sido ampliamente utilizada como un edulcorante natural en la medicina consuetudinaria, ya que es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa, esto se debe a que sintetiza una familia de compuestos diterpénicos llamados glucósidos de esteviol (GE) dentro de este grupo se encuentran de manera predominante el esteviósido y rebaudiósido A. Además, que se ha reportado tienen diversas propiedades terapéuticas: Antihiper glucémica, antihipertensiva, antiinflamatoria, anticancerígena (Yang *et al.*, 2015).

Con la finalidad de producir los compuestos de interés presentes en *Stevia*, se ha hecho uso del cultivo *in vitro* de órganos y tejidos de la planta. Específicamente las raíces transformadas representan una opción efectiva para aumentar la acumulación de biomasa y metabolitos secundarios (Ocho-Villarreal *et al.*, 2016).

Debido a las características genéticas, que le confiere la agrotransformación, las raíces transformadas pueden crecer sin complicación en diversos sistemas (Habibi *et al.*, 2018). Los biorreactores son sistemas de crecimiento que permiten el cultivo de raíces a gran escala en condiciones controladas, dado que los esfuerzos de corte sean reducidos, una opción viable es el biorreactor *airlift* (Khan *et al.*, 2018). El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de raíces transformadas y no transformadas de *Stevia* en biorreactor y el efecto de parámetros de operación en la acumulación de metabolitos secundarios.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de *Stevia rebaudiana*

*Stevia rebaudiana* es una planta perenne propia de la región tropical de Sudamérica y de la región de Amambay del noreste de Paraguay, se desarrolla como arbusto y se propaga de forma asexual para su venta en el mercado (Brandle y Telmer, 2007; Gantait *et al.*, 2015). En la Fig.1, se puede observar una planta de *Stevia rebaudiana* creciendo en un ámbito silvestre.



**Figura 1.** Planta *Stevia rebaudiana* (Tomado de HACC, 2011).

También conocida como hoja dulce *Stevia* crece de forma silvestre, puede alcanzar los 65 cm de altura, posee tallos de color verde, empinados y delgados, sus entrenudos están finamente cubiertos de pilosidad blanquecina, miden aproximadamente de 2 a 4 cm de largo. Las hojas son pequeñas, muestran venación reticulada primaria y secundaria. Las raíces de *Stevia* no profundizan en el suelo, sino que se distribuyen sobre la superficie, son fibrosas, filiformes y perennes. *Stevia* crece comúnmente en suelos del alto Paraná (Ramesh *et al.*, 2007; Angelini *et al.*, 2018). La Tabla 1, muestra la taxonomía de *S. rebaudiana*.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Stevia rebaudiana*. Tomado de Moreno, 2012

<b>Taxonomía de <i>Stevia rebaudiana</i></b>	
Súper reino	<i>Eucaryota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Sub reino	<i>Tracheobionta</i>
Súper división	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Subfamilia	<i>Asteroideae</i>
Genero	<i>Stevia</i>
Especie	<i>S. rebaudiana</i>

Por su actividad edulcorante en 1899 fue descrita científicamente por Moisés Santiago Bertoni. *Stevia rebaudiana* inicialmente era conocida como *Eupatorium rebaudiana*, sin embargo, en 1905 fue renombrada a *Stevia rebaudiana* Bertoni (Bertoni, 1905; Barriocanal *et al.*, 2008). El cultivo de estevia se ha extendido y es común en países de Asia, América y Europa destacando Japón (mercado principal), China, Singapur, Taiwán, Corea del sur, Tailandia, Malasia, Estados Unidos de América, Canadá, México, Brasil, Indonesia e India. (Brandle *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2005; Gantait *et al.*, 2015) Existen aproximadamente 230 especies del género de *Stevia*, aunque se ha reportado que *rebaudiana* y *phlebophylla* son las únicas especies que producen glucósidos de esteviol y que *rebaudiana* Bertoni es la especie más dulce (Kinghorn y Soejarto, 1985; Brandle y Telmer, 2007). *Stevia* es principalmente utilizada por sus aportaciones medicinales.

## 2.2 Propiedades medicinales de *Stevia rebaudiana*

El extracto de *Stevia* se ha utilizado durante varias décadas como un aditivo endulzante natural y ha sido aplicado en la medicina herbolaria por las poblaciones indígenas de América del Sur. Posee propiedad antihiper glucémica, en Sudamérica el extracto de *Stevia* se ha utilizado para el tratamiento de la diabetes. Sustituye perfectamente al azúcar debido a las mínimas cantidades que se requieren para endulzar, sin aportar calorías (Gantait *et al.*, 2015). Los extractos de *Stevia* pueden disminuir los niveles de glucosa en la sangre, contrarrestando la diabetes mellitus (Barriocanal *et al.*, 2008). Suzuki *et al.*, (1977) comprobaron en un experimento con ratas, que un tratamiento de *Stevia* reduce el nivel de glucosa en la sangre. Curi *et al.*, (1986) en un experimento realizado a humanos saludables reportaron que los niveles de glucosa en la sangre redujeron con un tratamiento de extracto acuoso de hojas de *Stevia*.

*Stevia* también presenta actividad antibacteriana, con propiedades anti-caries y para la cardiopatía (Ghanta *et al.*, 2007). Es un auxiliar en el control de la hipertensión y obesidad (Gantait *et al.*, 2015). Además de contrarrestar el cáncer y la depresión, también funge como un antiviral (Puri *et al.*, 2012). Se le atribuyen propiedades anti-inflamatoria y antidiarreica (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Se han realizado estudios relativamente amplios que indican que el esteviósido que posee *Stevia*, no es tóxico ni mutagénico, ni carcinogénico, y que tampoco representa un riesgo sobre la fertilidad (Gardana *et al.*, 2010). Estudios coadyuvantes demuestran que la ingesta de altas concentraciones de Rebaudiósido A, no está relacionada con ningún cuadro de toxicidad (Abou-Arab *et al.*, 2010). Sin embargo, se piensa que puede ocasionar reacciones alérgicas a personas que resulten sensibles a la planta, por lo cual no es recomendado su consumo durante el embarazo (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).

Las hojas de *Stevia* tienen mayor concentración de compuestos fenólicos, carotenoides, ácido ascórbico (vitamina c), clorofilas y compuestos que tienen alta capacidad antioxidante con beneficios potenciales en la salud, como la reducción de algunas enfermedades crónicas (Barba *et al.*, 2014).

## **2.3 Particularidades de *Stevia rebaudiana***

### **2.3.1 Metabolitos secundarios**

Se conoce como metabolitos secundarios (MS) a pequeñas moléculas orgánicas generadas por un organismo que presiden del metabolismo primario, que no son fundamentales para su crecimiento, desarrollo y reproducción, representan una fuente importante de principios activos en medicamentos y de productos químicos. Poseen propiedades de aromas, saborizantes y estimulantes (Seca y Pinto, 2018).

Los MS según su ruta biosintética pueden clasificarse en: Alcaloides (Se biosintetizan a partir de aminoácidos), compuestos fenólicos (Contienen uno o más anillos aromáticos hidroxilados, son biosintetizados en la vía del shikimato) y terpenos (Seca y Pinto, 2018). La combinación de compuestos bioactivos sintetizados en la planta permite que sea adecuada para uso terapéutico y aditivos alimentarios (Modi y Kumar, 2018).

Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides y a su vez se dividen en seis grupos; monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos y esteroides, dentro de la categoría de los diterpenos se encuentran los esteviósidos que son de gran importancia a nivel industrial y forman parte de una familia de compuestos llamados glucósidos de esteviol (Pérez y Jiménez, 2011).

### **2.3.2 Glucósidos de esteviol**

El cultivo de *Stevia* es de interés debido a las propiedades edulcorantes que posee y al ínfimo contenido calórico. Los GE son un grupo de compuestos diterpénicos de alto poder edulcorante bajo en calorías que son sintetizados en las hojas de *Stevia rebaudiana* (Modi y Kumar, 2018). Existen alrededor más de 30 glucósidos de esteviol identificados, de los principales el esteviósido y rebaudiósido A, en cantidades más bajas se encuentran: esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E, F y dulcósido (Yang *et al.*, 2015).

El poder de edulcoración de *Stevia* es aproximadamente 300 veces más que el del azúcar (González-Moralejo, 2011). Briedel y Lavieille en 1931 purificaron por primera vez el extracto de *Stevia* con el objetivo de producir esteviósido.

### **2.3.2.1 Esteviósidos**

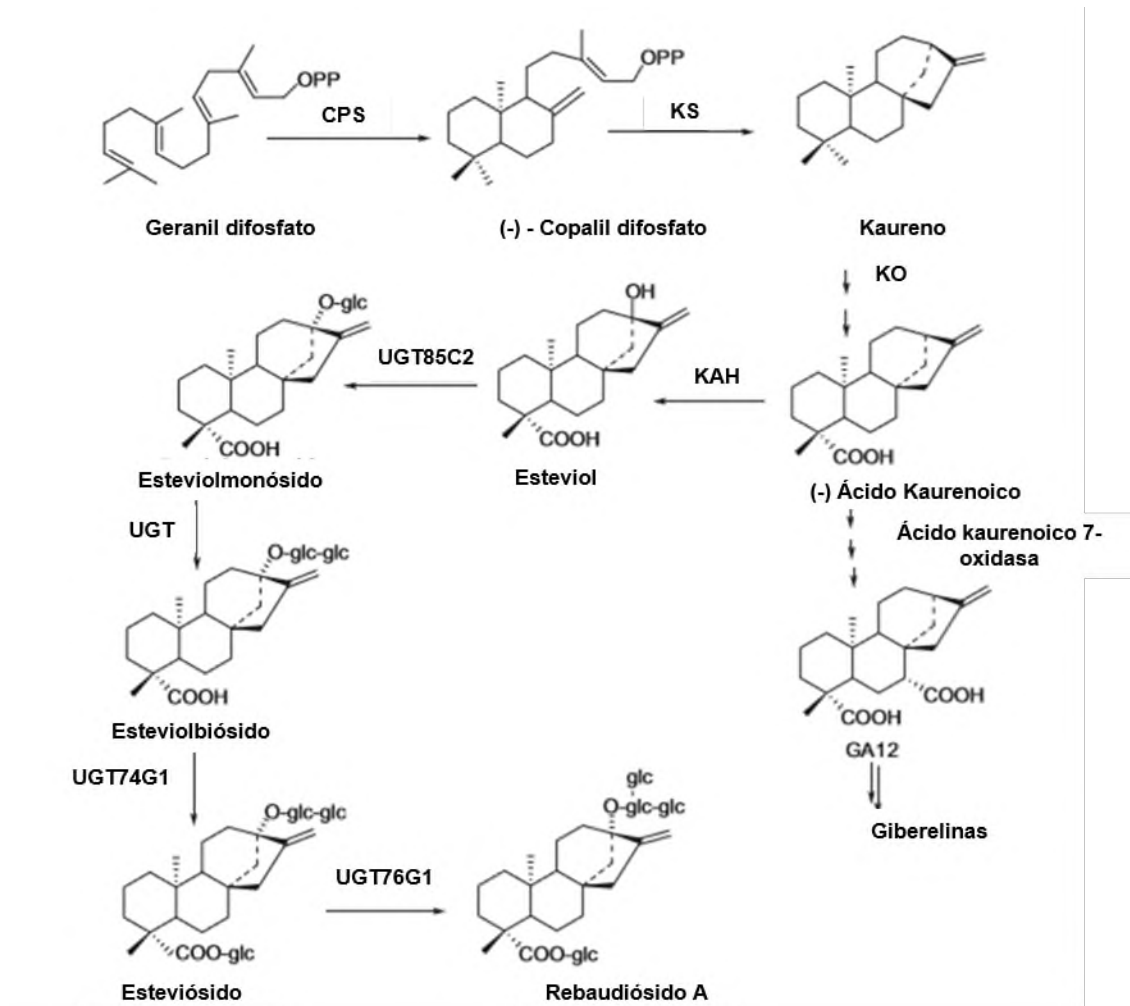
Los esteviósidos son glucósidos diterpenoides, presentes mayormente en las hojas de *Stevia rebaudiana* su poder edulcorante es alto, 300 veces más dulce que el azúcar y es uno de los ocho glucósidos de ent-Kaureno (Barriocanal *et al.*, 2008). La estructura química del esteviósido se dio a conocer en 1952 como un glucósido compuesto por tres moléculas de glucosa y aglucón esteviol (Wood *et al.*, 1955; Wood y Fletcher, 1956).

### **2.3.2.2 Rebaudiósidos**

Rebaudiósido A, es un polvo cristalino blanco, aproximadamente 180 a 400 veces más dulce que el azúcar, de alto valor comercial, la diferencia entre el rebaudiósido y los esteviósidos, es la existencia de una glucosa, que es cien por ciento natural, y tiene un aporte calórico mínimo (Jarma *et al.*, 2010). Fue aislado por Kohda *et al.*, (1976), su actividad edulcorante es superior a la del esteviósido (Barriocanal *et al.*, 2008).

### **2.3.3 Síntesis de glucósidos de esteviol**

La síntesis de GE se lleva a cabo en las hojas y se traslada a diferentes partes, Pruebas de marcado in vivo con [1 - 13C] glucosa y RMN revelaron que el precursor principal de esteviol es sintetizado en la vía MEP (Metileritrol-4-fosfato) que se ubica en el plástido. El aglucón esteviol se glucosila por glucosiltransferasas que se encuentran en el citoplasma. Esteviol cuenta con dos grupos (OH), en C-19 del carboxilo C-4 y en C-13. El esteviolmonósido se produce por una glucosilación en el C-13 dada por UGT85C2. Estudios previos reportaron que la síntesis de GE inicia con una glucosilación de 13-hidroxilo del esteviol. Seguido a esto el esteviolmonósido es glucosidado para la producción de esteviolbiósido. Se desconoce la identidad de la UGT (glucosiltransferasa dependiente de difosfato de uridina) involucrada en este paso. La producción de esteviósido es dada por UGT74G1 por una glucosilación en C-19. El rebaudiósido A se produce por esteviósido glucosidado en C-13 por UGT76G1 (Kumari y Chandra, 2017). En la Fig. 2 se muestra la síntesis de glucósidos de esteviol.



**Figura 2.** Ruta biosintética de glucósidos de esteviol (Modificado de Brandle y Telmer, 2007; Kumari y Chandra, 2017).

## **2.4 Estrategias biotecnológicas de mejora de producción de metabolitos secundarios**

### **2.4.1 Cultivo *in vitro* vegetal**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una herramienta importante de la biotecnología que aprovecha la totipotencia de las células vegetales para diversas técnicas con mismos fines; introducir, multiplicar y regenerar material vegetal (Kumar y Reddy, 2011). Permite la obtención y regeneración de plantas que sufren modificación genética, o transgénicas, aplicando técnicas de ingeniería genética (Altpeter *et al.*, 2016).

Se realiza bajo condiciones de crecimiento controladas en medio de cultivo con nutrientes y un entorno estéril que permite el crecimiento de células, órganos y tejidos vegetales. Fue establecido como cultivo celular *in vitro* por Gottlieb Haberlandt en 1902 (Das *et al.*, 2018). En la actualidad este tipo de cultivo es de suma importancia en el ambiente científico para la investigación en plantas. De forma resumida el cultivo *in vitro* es una herramienta biotecnológica que permite la generación de plantas libres de daño patológico, en la transformación de plantas, la multiplicación vertiginosa de genotipos de plantas no comunes, y para la producción de compuestos bioactivos de interés comercial (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

El cultivo *in vitro* de brotes y raíces representa una alternativa para la producción de compuestos naturales de alto valor (Ochoa- Villarreal *et al.*, 2016). Algunos de los usos del cultivo *in vitro* de plantas se muestran en la Fig. 3.

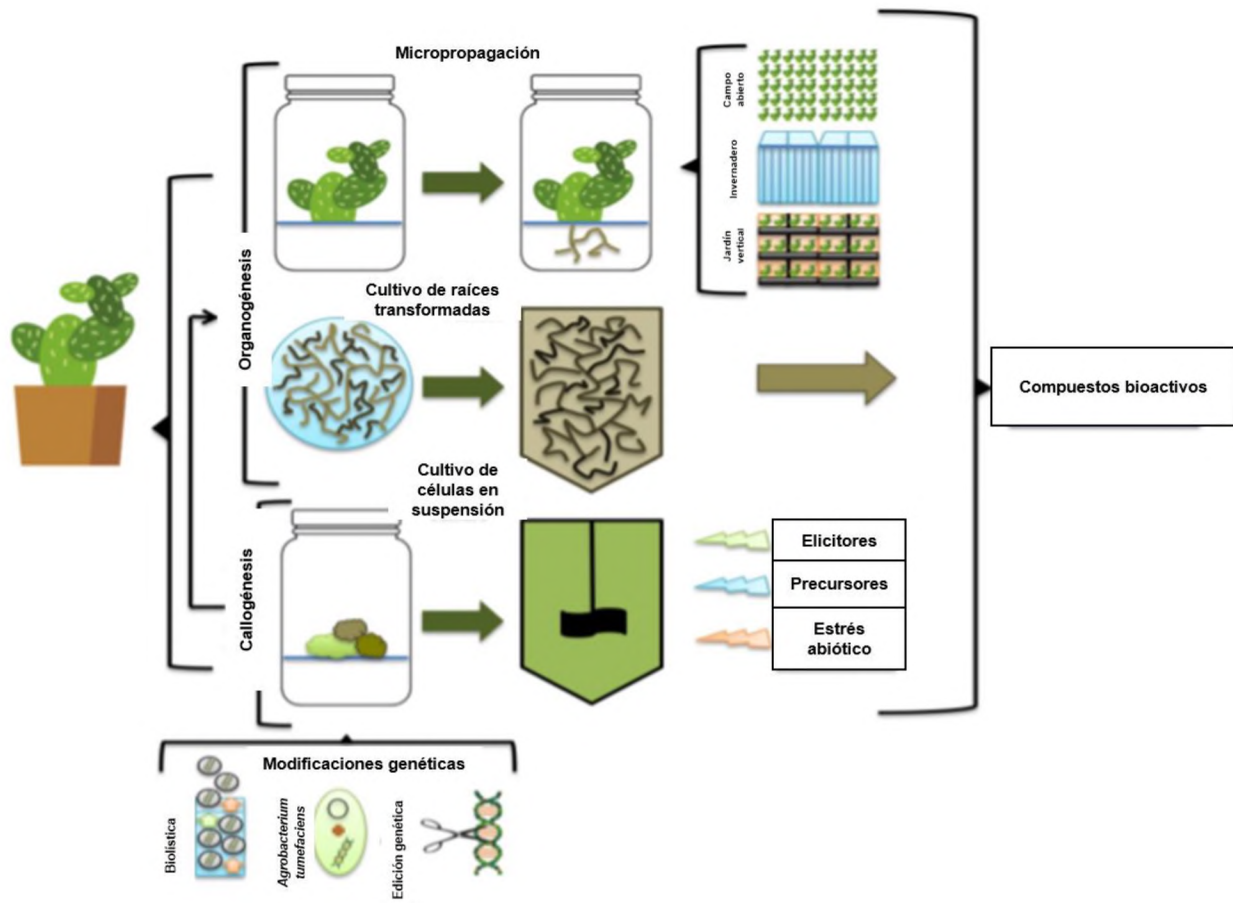


Figura 3. Usos del cultivo *in vitro* de plantas (Modificado de Espinosa-Leal *et al.*, 2018)

#### **2.4.2 Cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana***

*Stevia rebaudiana* ha sido estudiada bajo diferentes condiciones para diversos objetivos. Yamazaki *et al.*, (1991) informaron que las hojas de *Stevia* poseen compuestos diterpénicos que son utilizados como edulcorante, la aglicona de los glucósidos de esteviol (13-hidroxi-ent-ácido kaurenoico), es biosintetizada a partir de ácido kaurenoico que es intermediario para la biosíntesis de giberelinas, tras la inducción de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* estudiaron la síntesis de GE en diferentes sistemas de producción. Esteviósido y rebaudiósido A son de las pocas moléculas sintetizadas de plantas que se comercializan debido a sus propiedades farmacológicas (Philippe *et al.*, 2014). Pandey *et al.*, (2016) generaron raíces transformadas de *Stevia* por *A. rhizogenes* para conocer sus potenciales biosintéticos estudiaron cuatro rizoclonos en luz y oscuridad, dos de ellos acumularon pigmento fotosintético mayor bajo condiciones de luz la variabilidad inter-clonal permitió mostrar la síntesis de esteviósido solo en el rizoclon SRA4 en condiciones de luz. Idrees *et al.*, (2018), evaluaron la acumulación de biomasa y la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos de raíces adventicias de *Stevia*, los cultivos fueron expuestos a diferentes luces espectrales, la luz violeta proporcionó la mayor acumulación de biomasa, la luz azul ayudó a mejorar la acumulación de metabolitos secundarios. Fu *et al.*, (2014) establecieron cultivos de raíces transformadas de *Stevia* para la producción de ácido clorogénico, seleccionaron ocho raíces individuales con una tasa de crecimiento acelerada, el tratamiento tres (t3) tuvo mayor rendimiento de derivados de ácido clorogénico. Alvarado-Orea *et al.*, (2016) evaluaron el crecimiento y la producción de esteviósido y rebaudiósido A por la adición de y la influencia de nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) en cultivos de raíces de *S. rebaudiana* obtuvieron que las raíces respondieron a condiciones de estrés generadas por NPs ZnO, esto provocó un incremento en la concentración los compuestos. Calderón-Gabriel *et al.*, (2016) evaluaron el efecto de tres cepas de *Agrobacterium rhizogenes* (LB9402, K599 y AR4) sobre la transformación de plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana* para generar cultivos de raíces transformadas útiles para el estudio de la regulación metabólica dentro de la ruta, lograron establecer un protocolo de inducción de raíces transformadas a partir de plantas e hipocótilos *in vitro*, en el cual se observó que la cepa LB9402 presentaba mayor virulencia hacia *S. rebaudiana*, en cuanto al tipo de

explantes observaron que en la modalidad de planta se obtuvo el mayor número de raíces. Mthembu (2017) generó raíces transformadas de *S. rebaudiana* a partir de explantes de hoja, también realizó la sobreexpresión de genes finales UGT71G1 y UGT76G1 con el objetivo de aumentar la acumulación de glucósidos de esteviol.

Por su parte Kaur (2018) evaluó la efectividad de las cepas R1000 y R1022 para inducir raíces transformadas de *Stevia*, optimizando algunos factores. Concisamente, los estudios reportados de raíces de *S. rebaudiana* se han realizado, con finalidades de explorar a profundidad su biosíntesis, aumentar su potencial para acumular biomasa bajo condiciones de crecimiento estudiadas, con el objetivo de aumentar la producción de sus compuestos bioactivos. La elicitación en plantas es una herramienta que también es aplicada para maximizar la acumulación de compuestos bioactivos (Madanakumar y Kumaraswamy, 2018).

### **2.4.3 Elicitación**

La elicitación es una estrategia que explota el potencial de las plantas para mejorar la producción, productividad y rendimientos de metabolitos secundarios en las células vegetales (Liu *et al.*, 2018). Hace uso de moléculas señales de naturaleza química o natural, como respuesta a estrés en plantas (Madanakumar y Kumaraswamy, 2018). Se conoce como elicitor a cualquier tipo de estimulador que puede activarse a través de producción de especies reactivas de oxígeno y de la respuesta hipersensible (Alvarado-Orea., *et al* 2016).

El Ácido jasmónico (AJ), es uno de los elicitores de mayor uso para el mejoramiento en la producción de MS; AJ estimuló simultáneamente las rutas metabólicas de la síntesis de flavonoides y compuestos fenólicos en callos de *O. ficus-indica* y *O. megacantha* (Camarena-Rangel *et al.*, 2017).

El proceso de elicitación permite que las moléculas induzcan la producción de metabolitos secundarios, siendo un estímulo externo, provoca cambios en las células de la planta, que conduce a una serie de reacciones lo cual favorece drásticamente la acumulación de metabolitos secundarios. Se unen a una proteína receptora en la membrana plasmática, donde eventualmente se lleva a cabo la activación de genes como una parte de la respuesta de defensa de la planta mediante vías de transducción

de señales esto conlleva a la síntesis de metabolitos secundarios. La elicitación de cultivos con sustancias químicas ha resultado ser un método confiable y una herramienta de la biotecnología útil para mejorar la producción de MS en cantidades elevadas de metil jasmonato (MJ) y ácido salicílico (AS). Se encuentran documentados como sustancias eficaces para el aumento en la producción de MS; saponinas triterpenoides en cultivos vegetales, MJ se ha identificado como una molécula de señalización en estrés biótico y abiótico, ayuda a la formación de compuestos de defensa implicados en vías de transducción que favorece la inducción particular de enzimas para la producción de esas moléculas. AS ha sido ampliamente estudiado por su intervención en la resistencia a patógenos en plantas, como compuesto clave involucrado en la activación de respuestas de defensa. Tanto MJ como SA son utilizados para el mejoramiento de producción de MS, en un extenso número de especies vegetales; cultivo de células en suspensión de *Catharanthus roseus*, callos de *Rosa hibryda*, plántulas de *Solenostemon scutellarioides*, raíces adventicias de *Eleutherococcus koreanum*, raíces transformadas de *Glycine max* (Largia *et al.*, 2015).

La elicitación con nanopartículas (NPs) es una herramienta emergente en la actualidad. Las NPs poseen propiedades fisicoquímicas muy particulares, en su morfología, el tamaño de poro, área superficial alta. Pueden servir como vehículo que contenga herbicida, nanopesticidas o genes, cuyo objetivo es liberar su contenido en los órganos celulares de la planta y potencial para aumentar su metabolismo. Causan cambios morfológicos y fisiológicos, con efectos positivos y negativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Siddiqui *et al.*, 2015).

Para el mejoramiento de la producción de MS, el uso de NPs es una alternativa. Su rango de tamaño es de aproximadamente de 1- 100 nm, sus propiedades dependen en gran medida del método utilizado para su elaboración. NPs de ZnO y CuO han sido aplicadas en cultivo de callos de *Stevia rebaudiana* en sistema *in vitro* (Javed *et al.*, 2017). La elicitación con NPs es una novedosa alternativa, así como otras estrategias biotecnológicas útiles para el aumento de MS en plantas.

#### **2.4.4 Ingeniería metabólica**

El sistema metabólico y el sistema celular forman un todo, lo que consecuentemente permite que el sistema sea manipulado sin olvidar la eficiencia del bioprocesamiento general, lo que difiere de la ingeniería genética simple. La ingeniería metabólica en plantas implica la modificación de vías internas para el re direccionamiento de reacciones enzimáticas involucradas en la producción de compuestos. Además, pretende el aumento de compuestos determinados en diversas especies vegetales productoras normales. Haciendo uso de la manipulación genética permite la transferencia de rutas específicas a otras plantas, o la producción de nuevos compuestos. Para cumplir con el objetivo de incrementar la acumulación de compuestos se han reportado en general dos enfoques: (1) La implementación de técnicas que permiten lograr cambios en la expresión de genes omitiendo algunas limitaciones; de velocidad en la ruta, suspensión de la ruta competitiva y la reducción del catabolismo del producto que se busca. (2) También se han realizado experimentos para cambiar la expresión de los genes reguladores (Kumar, 2015). La sobreexpresión de genes en algunas especies vegetales de tipo transgénico puede conducir a la producción de metabolitos nuevos (He-Xianzhi *et al.*, 2017).

La obtención de metabolitos secundarios de interés farmacéutico es de suma importancia, sin embargo, su producción es limitada. Debido a que las vías que sintetizan estos compuestos en la gran mayoría de los casos son enzimáticamente complejas, se encuentran reguladas por factores ambientales y factores de desarrollo. Actualmente se han clonado y caracterizado una gran cantidad de genes que codifican a enzimas biosintéticas, estructurales y constitutivas, algunos factores de transcripción y de transporte que intermedian en las vías de síntesis. La ingeniería metabólica pretende mejorar la producción de MS, llevando un nuevo enfoque sobre las plantas; Cultivo celular, plantas heterogéneas y raíces transformadas (Tang y Pan, 2017).

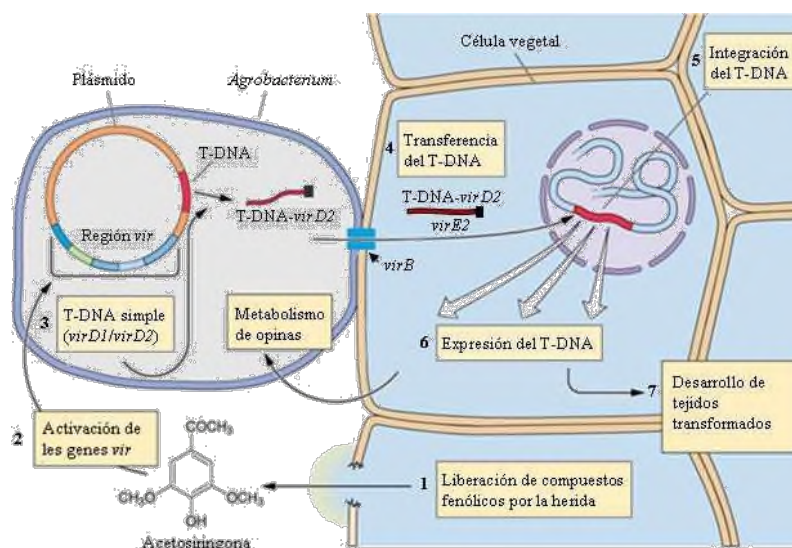
#### **2.4.5 Raíces transformadas y su proceso de agrotransformación**

Los cultivos de raíces transformadas representan una alternativa para cubrir la demanda de metabolitos secundarios de interés industrial; fármacos, alimentos y cosméticos. Es considerado un sistema biotecnológico potencial debido a que presenta rápido crecimiento, estabilidad genética, y a que exhibe una mayor producción de

biomasa y compuestos bioactivos sin la necesidad de recurrir a hormonas de crecimiento (Thiruvengadam *et al.*, 2016).

Para el fitomejoramiento de especies vegetales, se realiza la agrotransformación de plantas mediante *Agrobacterium rhizogenes*, que es una bacteria gram negativa presente en el suelo y que fue identificada en la década de 1930 como causante de la infección o enfermedad de raíces transformadas en las plantas. En las lesiones que presenta la planta, las bacterias se trasladan mediante la quimiotaxis que provoca la infección y en consecuencia la transferencia e integración de su material genético en el genoma de la planta. *Agrobacterium rhizogenes* y *Agrobacterium tumefaciens* (causante de la formación de tejidos tumorales en plantas) con un tamaño de aproximadamente 200 kb, se consideran ingenieros genéticos con mecanismos propios completamente naturales por su potencial para exportar e integrar en el genoma de la planta huésped un fragmento de su ADN presente en un plásmido Ri (Inductor de raíz) siendo el caso de *rhizogenes* (Singh *et al.*, 2018).

Cuándo el T-ADN de *Agrobacterium* es exportado al genoma de la planta, se activan los genes de virulencia (*vir*) (*rol A*, *rol B* y *rol C*) que de forma individual o conjuntamente estimulan la inducción de raíces y la síntesis de compuestos bioactivos (Habibi *et al.*, 2018). El proceso de agrotransformación puede observarse en la Fig. 4.



**Figura 4.** Proceso de transferencia e integración de T-DNA de *Agrobacterium* a el genoma de la planta huésped (Tomado de Wahby, 2007).

De manera resumida la agrotransformación comienza cuándo *Agrobacterium spp* recibe señales químicas (azúcares neutros, ácidos, hidrocarburos aromáticos mono cíclicos como la acetosiringona,  $\alpha$ -hydroxyacetosiringona, coniferyl alcohol y vainillina; y algunos monosacáridos neutros o ácidos; glucosa y ácido glucorónico) de las células lesionadas en la planta, como respuesta a la virulencia. Los compuestos fenólicos liberados sirven como conductores de los genes bacterianos. La acetosiringona es un tipo de compuesto fenólico, es percibida por la proteína sensora VirA. La proteína VirA es auto-fosforilada después ocurre la transfosforilación de la proteína VirG, esto genera la activación de transcritores de los genes vir. Después de que las bacterias invaden las células de la planta ocurre el procesamiento de plásmido Ri (inductor de raíces) o Ti (inductor de tumores) y de forma sucesiva se lleva a cabo la transferencia e integración del T-ADN de la bacteria a la planta (Blanco *et al.*, 2003).

A diferencia de la planta entera, el cultivo de raíces transformadas brinda mayores ventajas, dentro de las ya mencionadas; respecto a la biomasa y acumulación de compuestos. Además de su fácil establecimiento en distintos sistemas de crecimiento: Placas petri, matraces agitados y biorreactores (Habibi *et al.*, 2018).

#### **2.4.6 Crecimiento en biorreactor**

Un biorreactor es un sistema o dispositivo monitoreado que ofrece un entorno estéril y proporciona la optimización de condiciones de cultivo, es utilizado para llevar a cabo una o diversas reacciones bioquímicas, partiendo de cualquier material biológico para la obtención de un producto. La configuración del biorreactor puede afectar de forma significativa los resultados del cultivo, logrando y controlando el ambiente adecuado para el crecimiento celular y la producción de sustancias bioactivas (Eibl y Eibl, 2008; Georgiev y Weber, 2014).

##### **2.4.6.1 Regímenes de operación de los biorreactores**

Los biorreactores operan en tres modos distintos: Lote (batch), lote alimentado (Fed-batch) y continuo, el modo de operación por lote es discontinuo (Rodríguez, 2003).

##### **2.4.6.2 Operación por lote (Batch)**

La operación por lote o batch se realiza sin intercambio de materia con sus alrededores excepto en lo que respecta a los gases que se suministran y retiran de manera

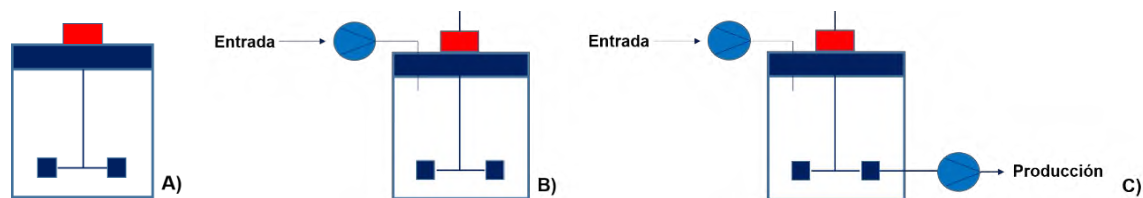
continua (aireación, producción de CO<sub>2</sub> y otros), la operación por lote es la mayormente utilizada (Caicedo *et al.*, 1998).

#### 2.4.6.3 Operación por lote alimentado (Fed- Batch)

Es una técnica que permite la obtención de altas concentraciones celulares en menor tiempo, es comúnmente utilizada para mejorar la productividad y al mismo tiempo minimizar los problemas de inhibición por sustrato y limitaciones de oxígeno disueltos en cultivos aeróbicos (Caicedo *et al.*, 1998).

#### 2.4.6.4 Operación por sistema continuo

La operación en continuo da lugar a que parte del producto generado en el cultivo, abandone el biorreactor disminuyendo así los efectos de los mecanismos de inhibición por producto, la operación continua tiene varias ventajas en comparación con los cultivos discontinuos (Sánchez *et al.*, 2002). En la Fig. 5 se muestran los sistemas de operación. La geometría, el funcionamiento y modo de operación en cada reactor varía.



**Figura 5.** Regímenes de operación: A) Lote (batch), B) Lote alimentado (Fed batch), C) Continuo (Modificado de Bradley, 2016).

#### 2.4.7 Biorreactores utilizados en biotecnología vegetal para el cultivo *in vitro* de raíces.

Los biorreactores utilizados para el cultivo a gran escala de raíces transformadas pueden ser clasificados en tres tipos: reactores de fase gaseosa, reactores de fase líquida y reactores híbrido. En lo que compete a los reactores de fase líquida, las raíces se mantienen sumergidas en el medio líquido todo el tiempo. En este tipo de reactores la transferencia de masa de los medios gaseosos es una limitante de la velocidad, algunos reactores que pertenecen a esta clasificación: *Airlift*, columna de burbujas, tanque agitado, reactor de flujo convectivo sumergido (Khan *et al.*, 2018). Dentro de esta misma clasificación de reactores de fase líquida sumergidos, para el cultivo de

raíces transformadas se encuentra también el sistema de inmersión temporal RITA (Mehrotra *et al.*, 2016).

En los reactores de fase gaseosa como el reactor de lecho de goteo, reactor de fase de gota, reactor de niebla de nutrientes, las raíces son expuestas a una mezcla de aire y medio líquido. En la manipulación de esta clase de reactores es importante controlar la velocidad de suministro de aire. La transferencia de masa en fase líquida de oxígeno y de algunos nutrientes mejora de manera considerable. Aunque la distribución uniforme de las puntas de las raíces en un tipo de reactor de fase gaseosa representa un problema. Es sugerible crecer inicialmente en un sistema de fase líquida hasta que las puntas de las raíces se distribuyan de manera uniforme en toda la matriz de empaquetamiento y posterior ejecutar el sistema en la fase gaseosa (Khan *et al.*, 2018). Para un crecimiento adecuado de raíces en biorreactor se deben tomar en cuenta ciertos requerimientos que debe cubrir el sistema a utilizar (Tabla 2).

**Tabla 2.** Propiedades deseables en un biorreactor para el crecimiento de raíces transformadas. Modificado de Khan *et al.*, 2018

---

Características del sistema
<ul style="list-style-type: none"><li>• Debe imponer un mínimo esfuerzo de cizallamiento hidrodinámico</li><li>• Debe mantener un ambiente libre de contaminación</li><li>• Si los cultivos son mixotrópicos o fototrópicos, debería haber una disposición eficiente de la luz y el CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis.</li><li>• Debería proporcionar un ambiente de cultivo homogéneo para la producción constante y continua de moléculas bioactivas.</li><li>• No debe tener una restricción en la disponibilidad de nutrientes, así como el suministro de nutrientes u oxígeno a la biomasa (sin limitación de transferencia de masa).</li><li>• Se debe considerar el requisito de la matriz de soporte para las raíces.</li></ul>

---

El comportamiento en biorreactor de ciertos cultivos de raíces de especies vegetales variadas, incluyendo *Stevia* ha sido evaluado por diversos autores.

A continuación, en la Tabla 3, se muestran estudios específicos de raíces de *Stevia rebaudiana* crecidas en biorreactor.

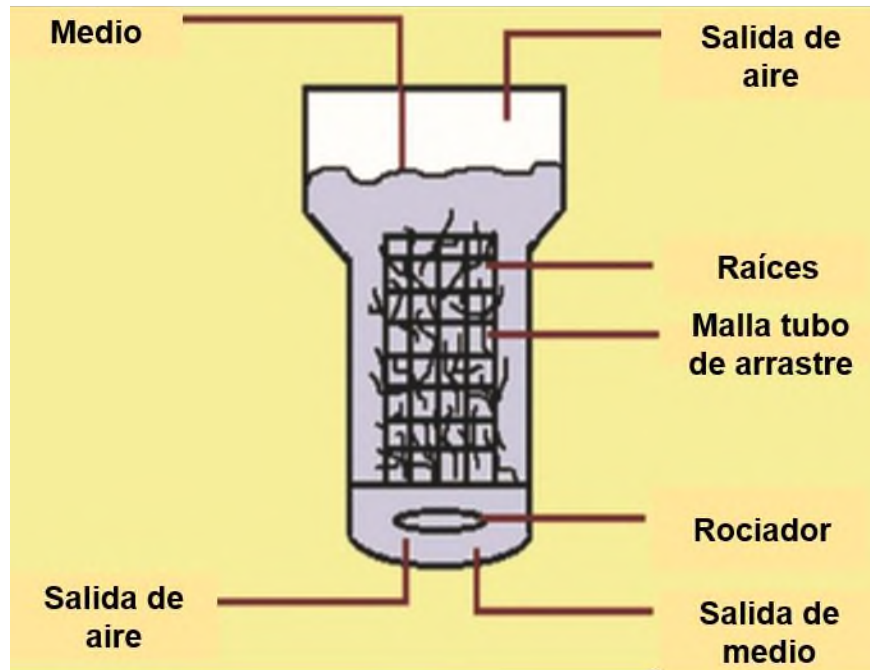
**Tabla 3.** Cultivo de raíces de *S. rebaudiana* en biorreactor

Tipo de raíz	Tipo de biorreactor	Referencia
Raíces adventicias	Sistema de botella de rodillo	Reis <i>et al.</i> , 2011
Raíces adventicias	Sistema de botella de rodillo	Sanches-Lopes, <i>et al.</i> , 2016
Raíces Transformadas (M5R4) y no transformadas	Sistema de inmersión temporal (RITA)	Calderón (2018)

Particularmente los reactores *airlift* han sido ampliamente utilizados para el cultivo de raíces de diferentes especies de plantas, debido a las primacías de su diseño.

#### 2.4.8 Biorreactor *airlift*

El sistema *airlift* utiliza el mismo método de entrada de masa y energía por agitación neumática, que un reactor de columna de burbujas, con la diferencia de que posee un tubo de aspiración que ayuda a separar el flujo hacia arriba y hacia abajo como componentes del tubo de subida y bajada. La diferencia de densidad del tubo de subida (elevador) y el extremo inferior facilita que el caldo circule con una mayor turbulencia. Impone un estrés de corte significativamente bajo a diferencia de un tanque agitado, los costos operacionales son bajos y la agitación no genera calor (Khan *et al.*, 2018). En la Fig. 6, se puede observar un diseño general de un reactor *airlift*. En la parte inferior de la jarra del sistema *airlift* un aireador suministra aire comprimido humedecido con medio líquido a velocidades relativamente lentas. El reactor está compuesto por dos cámaras; una superior ancha para el crecimiento y una inferior de menor tamaño para la mezcla. Puede ser empleado para hacer crecer cualquier tipo de células.



**Figura 6.** Biorreactor *airlift* (Modificado de Khan *et al.*, 2018).

El reactor *airlift* es una invención útil para el cultivo de células y fermentaciones. En cultivos de células vegetales presenta ventajas en la acumulación de biomasa y MS debido a sus características de diseño.

Utiliza una corriente de gas suave que genera una agitación ligera que a su vez favorece a la célula reduciendo el daño por corte sin tener que utilizar piezas mecánicas que dañen los cultivos (Familleti, 1987; Sun *et al.*, 2016; Mehrotra *et al.*, 2016). Además, es de importancia referir que los biorreactores *airlift* se han utilizado de forma recurrente para el cultivo de raíces y producción de metabolitos secundarios como puede observarse en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Cultivo de raíces en biorreactor *airlift*

Especie	Tipo de raíz	Metabolito secundario	Actividad biológica	Aireación	Referencia
<i>Artemisia annua L.</i>	Raíces transformadas	Artemisinina	Contra <i>Plasmodium falciparum</i> , malaria cerebral	1.6 vvm	Liu <i>et al.</i> , 1998
<i>Beta vulgaris</i>	Raíces transformadas	Betacianina	Pigmento natural	0.3 vvm	Shin <i>et al.</i> , 2002
<i>Pueraria phaseloides</i>	Raíces transformadas	Puerarina	Hipotérmica, espasmolítica, antiarritmicas	(Biorreactor <i>airlift</i> desechable)	Kintzios <i>et al.</i> , 2004
<i>Echinacea purpurea</i>	Raíces adventicias	Ácido cicórico, ácido cafáico, ácido clorogénico	Antifúngica, antibacterial, antioxidativa y antiviral	0.1 vvm	Wu <i>et al.</i> , 2007
<i>Echinacea purpurea</i>	Raíces adventicias	Derivados de ácido cafáico	Antifúngica, antibacterial, antioxidativa y antiviral	0.1 vvm	Jeong <i>et al.</i> , 2009
<i>Echinacea purpurea</i>	Raíces transformadas	Ácido cicórico	Antifúngica, antibacterial, antioxidativa y antiviral	0.14 vvm	Abbasi <i>et al.</i> , 2009
<i>Hypericum perforatum</i>	Raíces adventicias	Hipericina	Antiviral, anticancerígena, bactericida, sedante	0.1 vvm	Wu <i>et al.</i> , 2014
<i>Oplopanax elatus</i>	Raíces adventicias	Compuestos bioactivos (polisacáridos, fenoles, flavonoides)	Anticancerígena, anti-inflamatoria, antioxidante y analgésica.	0.02 vvm	Jiang <i>et al.</i> , 2015
<i>Panax ginseng</i>	Raíces adventicias	Ginsenosidos	Antialérgica, antidiabética, anticarcinogénica, anti-inflamatoria, antienvjecimiento	0.02 vvm	Song <i>et al.</i> , 2017

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los metabolitos secundarios o productos naturales de origen vegetal son de gran importancia en las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias; estos pueden ser responsables de aromas, sabores y también ser principios activos para la elaboración de fármacos. La planta *Stevia rebaudiana* es conocida por su capacidad de producir una familia de compuestos llamados glucósidos de esteviol; que se han hecho relevantes en la actualidad debido a su poder edulcorante, ínfimo aporte calórico y a propiedades terapéuticas como la regulación de niveles de glucosa en sangre. En estudios previos del grupo de trabajo de cultivo de células vegetales de la Universidad del Papaloapan se establecieron cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* vía agrotransformación con el objetivo de estudiar su biosíntesis y aumentar su productividad en condiciones controladas. Dichos cultivos han mostrado características deseables desde el punto de vista de bioprocesos como crecimiento acelerado y producción de glucósidos de esteviol en cantidades equiparables al cultivo de plántulas. Los cultivos de raíces son uno de los principales cultivos vegetales *in vitro* que tienen como peculiaridad crecer adecuadamente en biorreactores de diversas geometrías, dado que los esfuerzos de corte se mantengan minimizados, consecuentemente las configuraciones tipo *airlift* son opciones viables para el estudio de su desempeño en este sistema de crecimiento. Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se propone evaluar el efecto de factores de operación y condiciones de cultivo para determinar su efecto en el crecimiento de los cultivos bajo condiciones controladas y de esta manera, aprovechar el potencial de las raíces transformadas de *Stevia* como una alternativa de producción de metabolitos secundarios y particularmente de glucósidos de esteviol.

#### **4. HIPOTESIS**

Las condiciones de crecimiento en biorreactor aumentarán la acumulación de biomasa y de metabolitos secundarios en raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* comparadas con las condiciones de cultivo en matraz.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivos generales**

Evaluar el crecimiento de líneas transformadas y no transformadas de *Stevia rebaudiana* y la producción de metabolitos secundarios en matraces agitados.

Evaluar el crecimiento de líneas transformadas y no transformadas de *Stevia rebaudiana* y la producción de metabolitos secundarios en biorreactor *airlift*.

##### **5.2 Objetivos específicos**

- Realizar cinéticas de crecimiento en matraz de raíces transformadas y no transformadas de *Stevia rebaudiana*
- Realizar cinéticas de crecimiento en biorreactor tipo *airlift* de raíces transformadas y no transformadas de *Stevia rebaudiana*
- Determinación de la acumulación de biomasa, semicuantificación de glucósidos de esteviol por TLC y cuantificación de fenoles totales en las muestras de las cinéticas.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DEL PROYECTO

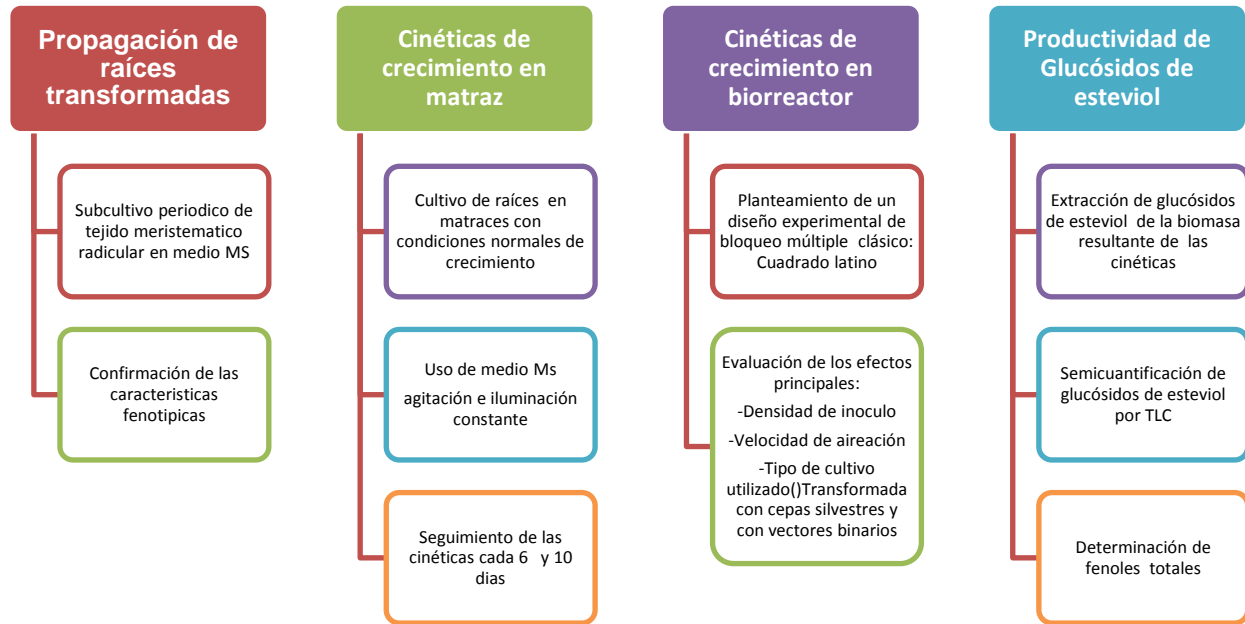


Figura 7. Diagrama experimental del proyecto.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material vegetal

Se utilizaron raíces transformadas de la línea M5R4 y pC1105.1 (SRSDXS), previamente establecidas en el grupo de trabajo (Calderón-Gabriel *et al.*, 2016), que portan genes silvestres de *Agrobacterium rhizogenes* y un T-DNA del vector pCAMBIA1105.1, respectivamente y raíces no transformadas.

### 7.2 Medios de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para el crecimiento de las raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* es el propuesto por Murashige y Skoog (1962), 2.2 g/L de MS con vitaminas, adicionado con 20 g/L sacarosa y 2.0 g/L fitagel como agente gelificante. Después de solubilizados los componentes del medio de cultivo en agua desionizada, se ajustó el pH a 5.8 para después esterilizarse en autoclave en condiciones estándares, 15 min a 121°C de temperatura y 120 libras de presión (Calderón- Gabriel, 2018). Para el cultivo de raíces no transformadas, el medio que se utilizó fue MS 2.2 g/L, sacarosa 20 g/L, adicionado con IBA (Ácido indol butírico) 0.5g/L. Se ajustó el pH a 6.0, se distribuyó en matraces y se esterilizó bajo el procedimiento antes mencionado (Alvarado, 2017). Las raíces se inocularon a razón de 1/100 p/v en frascos de cultivo de 125 mL que contenían 25 mL de medio MS. Los cultivos se Incubaron a 25±2°C con fotoperiodo 16h luz/8 h oscuridad y mantenidos en agitación orbital de 110 rpm hasta alcanzar el peso de biomasa fresca necesario para su uso como inóculo de cinéticas y como matraz semilla para los biorreactores. Los subcultivos se realizaron cada 15 días.

### 7.3 Evaluación de las características fenotípicas de raíces transformadas

Se realizó una evaluación del cultivo sobre las características fenotípicas propias de las raíces transformadas: Excesiva pilosidad, crecimiento acelerado, falta de geotropismo (Häkkinen y Oksman-Caldentey, 2018).

#### **7.4 Cinéticas de crecimiento en matraz**

Las cinéticas de crecimiento en matraz se tomaron como condiciones de cultivo de referencia, pero no como comparación directa con lo observado en el sistema de biorreactor, donde las condiciones experimentales estuvieron fuera del diseño experimental principal. Para comenzar estas cinéticas se utilizaron fragmentos meristemáticos de las raíces transformadas y no transformadas correspondientes, se inocularon en los matraces de 125 mL con 25 mL de medio líquido, a razón de 20 g/L de biomasa fresca. Las cinéticas se extendieron por un tiempo de 30 y 36 días con muestreos por triplicado sin reemplazo cada seis días para el caso de M5R4 y con muestreos por triplicado cada 10 días para los casos de SRSDXS y no transformadas (Kwok y Doran, 1995; García *et al.*, 2014). Al momento del muestreo se registró el peso fresco de la totalidad de la biomasa, se congeló y conservó a 80°C hasta su posterior procesamiento, de igual manera se colectaron muestras de 10 mL de medio de cultivo para determinar el consumo de fuente de carbono por el método de fenol sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956).

#### **7.5 Preparación del biorreactor**

Para las cinéticas de crecimiento en biorreactor *airlift* se ajustaron los volúmenes de aireación a 0.5, 0.8 y 1.0 vvm. La preparación de los biorreactores se llevó a cabo de la siguiente manera. Primeramente, se preparó el medio de cultivo suficiente para llenar la jarra hasta el 70% del volumen nominal del reactor (volumen de operación). Posteriormente el biorreactor se preparó, ajustando todos los puertos y sellando las entradas y salidas de medio de cultivo al pinzar las tuberías correspondientes (Rodríguez y Orozco *et al.*, 2015). Las salidas de aire no fueron cerradas herméticamente, no obstante, se mantuvieron aisladas de la humedad del entorno para evitar el humedecimiento excesivo de las membranas de los filtros de aire (García *et al.*, 2014). Los biorreactores preparados y llenos de medio de cultivo se esterilizaron en autoclave con las condiciones de esterilización estándares.

### 7.5.1 Cinéticas de crecimiento en biorreactor

Los reactores se inocularon utilizando diferentes densidades de inóculo previamente cultivado bajo las condiciones antes mencionadas, se conectó a la consola de control y por 7 días. Las condiciones experimentales se evaluaron utilizando un diseño experimental del tipo cuadrado latino clásico, es decir que todos los factores son principales y que sus niveles pueden ser aleatorizados, los factores y niveles propuestos se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Esquema general del diseño experimental de cuadrado latino que se utilizó para las cinéticas de crecimiento en biorreactor *airlift*.

Densidad de inóculo	0.5 vvm	0.8 vvm	1 vvm
2 g/L	A (1)	B(4)	C(7)
6 g/L	B(2)	C(5)	A(8)
10 g/L	C(3)	A(6)	B(9)

Nota: Los factores a seguir son la velocidad neumática, la densidad de inóculo y el tipo de línea de raíz es denotado por las letras A: SRSDXS, B: NT, C: M5R4; los números identifican a los tratamientos.

### 7.5.2 Determinación de azúcares totales

Con el método fenol-sulfúrico propuesto por DuBois *et al.*, (1956) se determinó el consumo de azúcares totales. Se realizaron diluciones 1:1000 para los primeros 15 días y 1:100 para los otros 15 días. Se tomaron 500  $\mu$ L de las diluciones de cada muestra y se colocaron en tubos de ensayo de 20 mL, a cada tubo se añadieron 500  $\mu$ L de fenol al 5% v/v, posteriormente se agregaron 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se dejaron reposar en hielo durante 30 minutos. Los tubos fueron agitados en un vortex. De manera consecutiva se realizó la lectura de absorbancia de las muestras a una longitud de 490 nm en un espectrofotómetro (Optizen POP UV/VIS, Mecasys). Se utilizó agua desionizada como blanco. La concentración de azúcares totales fue calculada con una curva patrón de 0- 130  $\mu$ g/mL.

### 7.5.3 Determinación de parámetros cinéticos

Para la determinación de parámetros cinéticos se utilizaron las siguientes ecuaciones

#### 1. Índice de crecimiento

$$IC = x - \frac{x}{x_0} \quad \text{ec. 1}$$

Dónde:

**X<sub>0</sub>**: Valor de la biomasa inicial

**X**: Valor de la biomasa en un tiempo determinado

#### 2. Velocidad de crecimiento

Para conocer la velocidad de crecimiento se realizó una gráfica linealizada de biomasa respecto al tiempo, de acuerdo a la ecuación de Monod (Quintero, 1981):

$$\ln(x/x_0) = Vc * t + x_0 \quad \text{ec. 2}$$

$$y = m * X + b \text{ (analogía a la ecuación de la recta)}$$

Dónde:

**X<sub>0</sub>**: Valor de la biomasa inicial

**X**: Valor de la biomasa en un tiempo determinado

**t**: tiempo (d)

**Vc**: Velocidad de crecimiento

El tiempo de duplicación (td) indica el tiempo en que el cultivo tarda en duplicar la biomasa respecto al inóculo inicial: 2 X<sub>0</sub>.

Con base en la definición de tiempo de duplicación, se expresan las siguientes formulas:

$$2x_0 = x_0 + Vc * td$$

$$2x_0 - x_0 = Vc * td$$

$$td = x_0/Vc$$

ec. 3

### 3. Rendimiento de biomasa con base a sustrato

El rendimiento de biomasa con base a sustrato ( $Y_{x/s}$ ), se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$y_{x/s} = \frac{x - x_0}{s_0 - s}$$

ec. 4

Dónde:

$S_0$ : Concentración inicial de la fuente de carbono

$S$ : Concentración de fuente de carbono en un tiempo determinado

## 7.6 Determinación de la productividad de glucósidos de esteviol

### 7.6.1 Extracción de GE

Para realizar la extracción de GE, se utilizó la metodología de Bondarev *et al.*, (2001) con ligeras modificaciones. Se tomaron 0.5 g del extracto fresco de raíces *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, se maceraron con nitrógeno líquido utilizando un mortero con pistilo. La biomasa se resuspendió en MeOH: Agua (80:20 v/v), en tubos cónicos de 15 mL a peso constante. Consecuentemente se llevó a sonicación durante 30 minutos, y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante y el extracto se puso a secar a 35°C durante 7 días, se pesó y se resuspendió en MeOH para su posterior uso. Además, se apartó una cantidad adecuada de extracto para la cuantificación de fenoles totales.

### 7.7 Cromatografía en capa fina (TLC)

El extracto de raíces de *S. rebaudiana* fue resuspendido en 100µl de MeOH al 80% (v/v). Se utilizaron placas de silica gel 60 F25, y se puntearon 90 µg de cada extracto. Se corrió la placa con la fase móvil seleccionada: Acetato de etilo: EtOH: Acetona: Agua (15:3:6:6, v/v/v/v) (Londhe y Nanaware, 2013).

Los estándares que se utilizaron fueron, Rebaudiósido A (Reb A, 1432 Sigma-Aldrich) y Esteviósido (Est, 50956 Sigma-Adrich). Para el revelado se utilizó una solución de orcinol al 0.5% (p/v) en MeOH: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95:5 (v/v)) (Dacome *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2011). Después de revelar, utilizando una parrilla de calentamiento las placas se expusieron a calor durante 25 s, hasta observarse una coloración morada, tonalidad característica de compuestos glucosidados.

### **7.8 Extracción y cuantificación de fenoles totales**

La determinación de fenoles totales se realizó siguiendo la metodología descrita por Singleton *et al.* (1999) con ligeras modificaciones. Se resuspendieron los extractos de raíces en metanol: H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) quedando a una concentración final de 15 mg/mL. La mezcla de reacción fue de manera consecutiva: 150 µL de agua desionizada, 2.5 µL del extracto preparado, 10 µL de reactivo de folin-Ciocalteu (F9252-Sigma Aldrich) y se dejó en reposo 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 30 µL de carbonato de sodio (20% p/v) y se incubó a 37°C por un lapso de 15 minutos, en seguida se colocó en hielo durante el mismo tiempo. Las muestras se hicieron por triplicado. Se realizó la lectura de absorbancia a 750 nm (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004). La concentración de fenoles totales, se reportó en equivalentes de ácido gálico/miligramo de extracto fresco.

### **7.9 Análisis estadístico**

El diseño experimental cuadrado latino fue analizado con el programa MINITAB 16 utilizando un modelo lineal general y análisis post anova (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Establecimiento de cultivo *in vitro* de raíces de *S. rebaudiana* transformadas SRSDXS y no transformadas en medio líquido

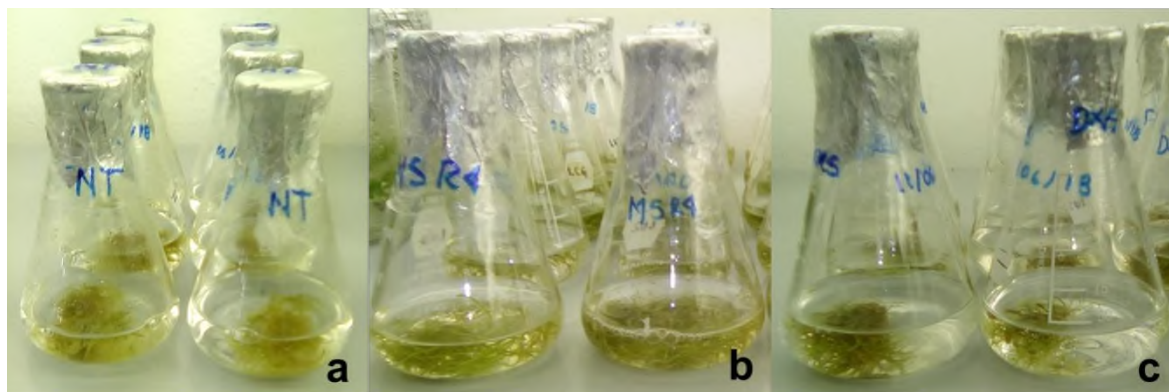
Para la implementación de los cultivos se tomaron inicialmente raíces de plántulas transformadas DXS y No transformadas de *Stevia* crecidas en medio semisólido, y se inocularon en matraces con medio líquido MS ½, adicionado con sacarosa al 2% e IBA (0.5g/L). En condiciones previamente descritas (7.2). En la Fig. 8. Se muestran los cultivos de partida para la obtención de material vegetal.



**Figura 8.** A) Plántulas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* línea transformada SRSDXS, y línea no transformada B) Raíces SRSDXS y no transformada en medio líquido.

### 8.2 Perfil de crecimiento de líneas transformadas M5R4, SRSDXS y no transformadas

Las líneas transformadas tienen características propias como crecimiento acelerado y excesiva pilosidad por otra parte los cultivos con raíces no transformadas crecen sin estas dos cualidades. Los tres cultivos (NT, M5R4 y SRSDXS) (Fig. 9) fueron incluidos en el diseño experimental para el escalado en biorreactor. Las líneas han mostrado diferencias entre sus índices de crecimiento (Tabla 6).



**Figura 9.** Cultivos *in vitro* de raíces a) no transformadas (NT), b) línea M5R4 y c) línea SRDXS después de 15 días de crecimiento.

**Tabla 6.** Comparación de índices de crecimiento en los diferentes cultivos de raíces *in vitro* de *Stevia rebaudiana* después de 15 días.

	No transformadas	M5R4	SRSDXS
<b>Índice de crecimiento</b>	3±0.25 <sup>B</sup>	4.6±0.41 <sup>A</sup>	3.3±0.26 <sup>B</sup>
<b>Acumulación de biomasa (gPF)</b>	0.8±0.06 <sup>B</sup>	1.12±0.10 <sup>A</sup>	0.87±0.07 <sup>B</sup>

Nota: Las letras diferentes indican las familias de significancia dentro de la variable de respuesta de acuerdo a la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ .

El índice de crecimiento calculado para la línea M5R4 fue similar al reportado por Calderón (2018),  $5.46 \pm 0.49$ . No obstante el índice de crecimiento calculado para las raíces no transformadas fue superior al reportado ( $1.49 \pm 0.16$ ), probablemente debido al efecto positivo que fue crecer en medio MS a la mitad de sales basales con vitaminas, a diferencia del medio completo que utilizó Calderón (2018), aunque dicho efecto no se vio replicado para las raíces de la línea M5R4.

El cultivo SRSDXS no había sido estudiado previamente, pero resulta interesante que su índice de crecimiento es intermedio, numéricamente, entre los mencionados anteriormente, aunque después del análisis de comparación múltiple de medias (Tukey  $p < 0.5$ ) resulta estadísticamente igual al de las raíces no transformadas en las condiciones actuales de cultivo. El mismo comportamiento se observó cuando se agruparon los valores de acumulación de biomasa. De acuerdo a las características de las raíces transformadas era de esperarse que fuera más alto que el de las raíces no transformadas, pero no se podía asegurar que fuera más alto que el de la línea M5R4 que sí está transformada genéticamente.

La principal causa de las diferencias entre los índices de crecimiento, y por ende de la acumulación de biomasa, es la diferencia metabólica entre cultivos debido a los eventos únicos de transformación que originaron a cada línea de raíces (Tzfira y Citovsky, 2006).

### 8.3 Efecto de la concentración del medio de cultivo MS sobre raíces transformadas

Por otro lado, utilizando la línea M5R4, se evaluó el efecto de la concentración del medio de cultivo MS en el crecimiento de las raíces pilosas para definir una composición de medio de cultivo para ser utilizada en los estudios cinéticos en biorreactor. El efecto fue evaluado utilizando tres concentraciones; medio MS; a la mitad de sales basales con vitaminas, sales completas con vitaminas y sales completas sin vitaminas, todos adicionados con 20 g/L de sacarosa.

Se determinó el índice de crecimiento, acumulación de biomasa (Tabla 7) y conductividad eléctrica (Tabla 8), esta última determinación como una medida indirecta de la cantidad de sales y metabolitos ionizables residuales en el medio de cultivo.

**Tabla 7.** Comparación de índices de crecimiento y acumulación de biomasa de raíces M5R4 de *Stevia rebaudiana* a 6 días en diferentes medios de cultivos.

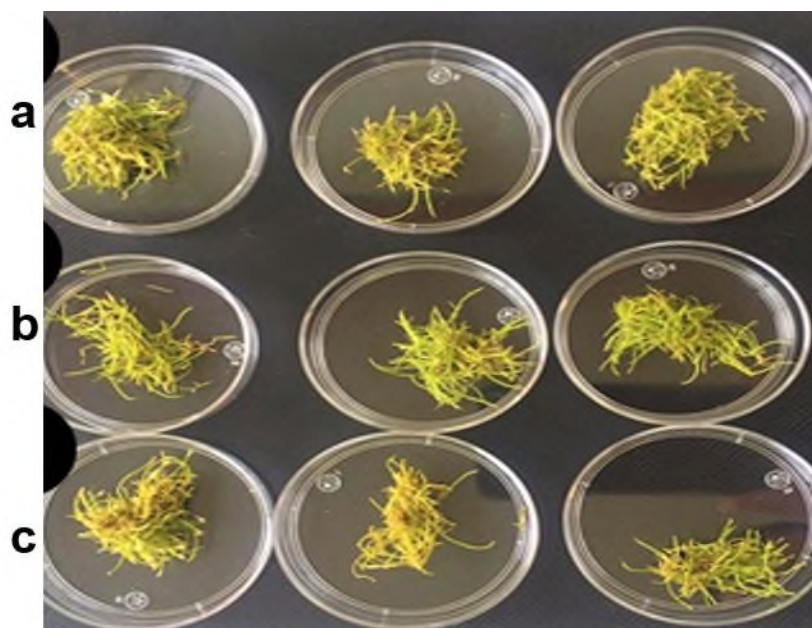
Concentración de medio de cultivo	Índice de crecimiento	Acumulación de biomasa (gPF)
Mitad de sales MS con vitaminas	0.88±0.07 <sup>a</sup>	0.94±0.02 <sup>A</sup>
Sales completas de MS con vitaminas	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.51±0.01 <sup>B</sup>
Sales completas de MS sin vitaminas	0.06±0.00 <sup>b</sup>	0.53±0.04 <sup>B</sup>

Nota: Las letras diferentes indican las familias de significancia de acuerdo a la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ .

El tratamiento que causó la mayor acumulación de biomasa de la línea transformada fue el de medio MS a la mitad de sales con vitaminas y fue significativamente mejor a los otros tratamientos: índice de crecimiento de 0.88±0.07, 44 y 14.7 veces más; y acumulación de biomasa 0.94 ± 0.02 gPF, 1.84 y 1.77 veces, comparados a sales completas con vitaminas y sales completas sin vitaminas respectivamente.

Cui *et al.*, (2010) evaluaron el crecimiento de raíces adventicias de *Hypericum perforatum* durante cinco semanas, en diferentes diluciones de medio: MS a mitad de sales basales, MS a un cuarto de sales basales, MS a tres cuartos de sales basales, MS completo y MS 2x; y observaron el mayor incremento en la biomasa en MS a mitad de sales basales. Resultados similares a los de este estudio fueron encontrados por Yu *et al.*, (2001) utilizando raíces adventicias de ginseng (*Panax ginseng*) reportaron que el medio MS a mitad de sales basales fue la mejor condición para el crecimiento de las raíces y la productividad de ginsenósidos; adicionalmente, en un estudio utilizando raíces adventicias de *Echinacea* la utilización de medio MS a mitad de sales también fue la más adecuada para la acumulación de biomasa y metabolitos (Wu *et al.*, 2006). Una de las principales explicaciones para este efecto de la fuerza de las sales del medio de cultivo es que altas concentraciones de sales, en numerosos sistemas vegetales, inhiben el crecimiento muy probablemente debido a un bajo potencial de agua que a su vez inhibe la absorción de agua y minerales del medio de cultivo (Cui *et al.*, 2010).

Las raíces transformadas M5R4 no mostraron cambios fisiológicos aparente después del tiempo de incubación, no se observó oxidación del tejido ni reducción de la coloración verde de las raíces (Fig. 10). Por otro lado, el menor valor de conductividad medido fue en el medio MS a mitad de sales basales con vitaminas (Tabla 8). Este valor se redujo 18.3% comparado a la medida inicial de conductividad, seguido de la caída en conductividad del medio MS con sales completas sin vitaminas (12.8%) y sales completas de MS con vitaminas (3.4%). Esto sugiere, que los cultivos creciendo en la condición de mitad de sales de MS tienen una tasa mayor de consumo de sales y componentes en el medio de cultivo que se ve reflejada en los aumentos de acumulación de biomasa mostrados anteriormente. El medio de cultivo MS a mitad de sales con vitaminas mostró un mayor consumo de nutrientes (indirectamente de la medición de conductividad) aproximadamente 5.4 veces más que el medio con sales completas de MS con vitaminas y 1.42 veces mejor que el medio con sales completas de MS sin vitaminas de acuerdo a los análisis estadísticos.



**Figura 10.** Raíces de *Stevia* después de 6 días de crecimiento en a) mitad de sales de MS con vitaminas, b) Sales completas de MS con vitaminas y c) Sales completas de MS sin vitaminas. La figura muestra biomasa de tres unidades experimentales.

**Tabla 8.** Conductividad eléctrica inicial y final de las raíces transformadas M5R4 de *Stevia rebaudiana* en diferentes concentraciones de medio MS después de 6 días de cultivo.

Concentración de medio de cultivo	Conductividad eléctrica inicial (mS/cm)	Conductividad eléctrica final (mS/cm)	Reducción porcentual en conductividad (%)
Mitad de sales MS con vitaminas	3.18±0.12	2.60±0.01	18.3 <sup>A</sup>
Sales completas de MS con vitaminas	6.20±0.18	5.99±0.02	3.4 <sup>C</sup>
Sales completas de MS sin vitaminas	6.13±0.26	5.35±0.21	12.8 <sup>B</sup>

Nota: Las letras diferentes indican las familias de significancia de acuerdo a la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ .

Los valores de acumulación de biomasa e índice de crecimiento observados fueron superiores en la condición de medio MS a la mitad de sales con vitaminas, de acuerdo a lo observado también con los datos de conductividad que fueron significativamente menores (Tukey  $p < 0.05$ ) a los de las otras condiciones indicando una correlación entre

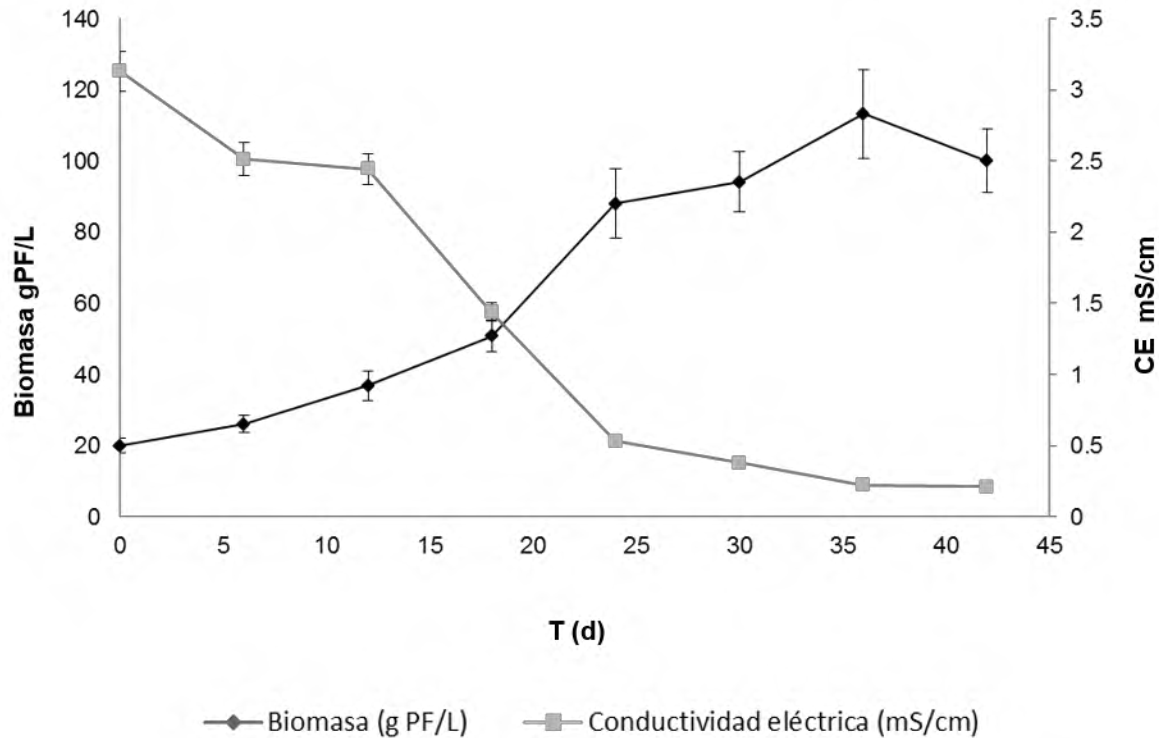
el consumo de las sales del medio y el aumento de la biomasa. Estas condiciones de crecimiento serán usadas en los posteriores experimentos cinéticos en matraz y biorreactor.

#### **8.4 Cinéticas de crecimiento, conductividad, y consumo de sacarosa de las líneas NT, m5R4 y SRSDXS en matraz.**

##### **8.4.1 Cinética M5R4**

Del pasado experimento se encontró una posible correlación entre el crecimiento y la reducción de la conductividad del medio de cultivo. Dado que los experimentos cinéticos en biorreactor están planeados para realizarse como crecimiento el lote y a la dificultad de obtener una muestra significativa de la biomasa de raíces en el reactor, se planteó realizar una cinética de crecimiento en matraz usando nuevamente la línea M5R4 que permitiera estudiar la relación entre estas variables respuesta y, de ser posible tener una manera indirecta de estimar la acumulación de biomasa en el reactor a través de la medición de conductividad con un nivel aceptable de incertidumbre. El estudio cinético en matraz tuvo como principal finalidad generar el perfil de conductividad vinculado al crecimiento y la definición de períodos de seguimiento para los estudios en biorreactor.

Así, para el experimento cinético de crecimiento se inocularon matraces con 0.5 gPF de raíces M5R4 en matraces de 125 mL con un volumen de medio de 25 mL durante 42 días y se muestrearon 3 matraces cada 6 días. Las raíces se desarrollaron de manera satisfactoria en el medio establecido en el experimento anterior, mostrando coloración verde y ausencia de oxidación. Adicionalmente a la determinación de biomasa se realizó la medición de conductividad en el medio de cultivo de cada unidad experimental para obtener los perfiles mostrados en la Fig. 11.



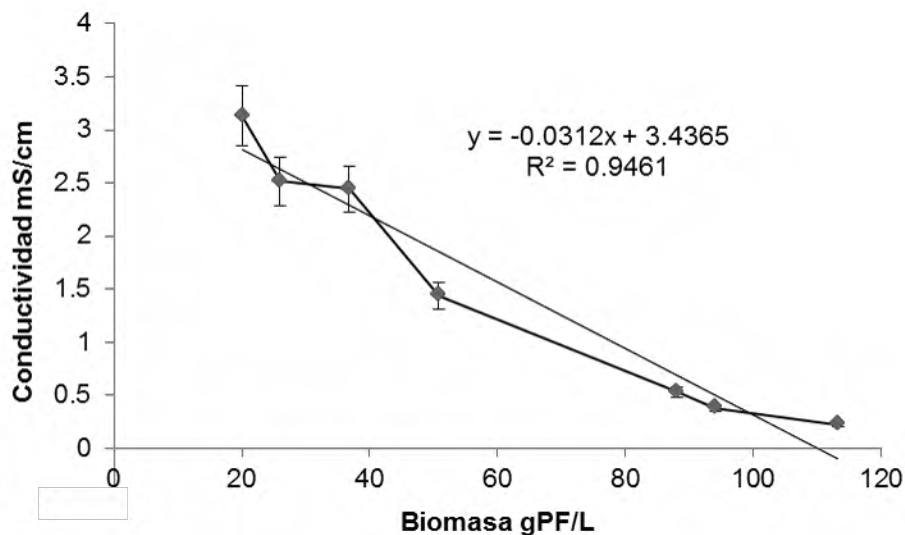
**Figura 11.** Cinética de crecimiento de raíces transformadas M5R4 y perfil de conductividad eléctrica en el medio de cultivo.

El perfil de acumulación de biomasa siguió el comportamiento típico de curva sigmoidea que indica una fase de adaptación, una fase de crecimiento lineal y la desaceleración del mismo para llegar a la fase estacionaria. El perfil de crecimiento fue muy similar a lo reportado por Calderón (2018) para este mismo cultivo. El máximo valor de acumulación de biomasa obtenido en este estudio fue  $113.2 \pm 12.45$  gPF/L, muy similar a los  $128.3 \pm 14.1$  gPF/L reportado por Calderón (2018). Adicionalmente a lo anteriormente reportado por el grupo de trabajo, en este estudio se encontró que el perfil de conductividad eléctrica es, de manera aproximada, inversamente proporcional al de la acumulación de biomasa. En la Fig.11, puede observarse que durante los primeros días de cultivo se tienen los mayores valores de conductividad y estos van disminuyendo de manera proporcional conforme aumenta la biomasa, hasta mantenerse estables en los últimos días de cultivo, y que corresponde con los tiempos en los que el cultivo alcanza la fase estacionaria de crecimiento. En el trabajo de Calderón (2018) se determinó el perfil de consumo de sacarosa y resulta interesante que la comparación de ese perfil con el de conductividad determinado en este trabajo siguen aproximadamente el mismo comportamiento sigmoideal inverso al del crecimiento, no obstante se observa un mejor ajuste del comportamiento de la

conductividad con el crecimiento que lo observado para el consumo de sacarosa que tuvo una tendencia muy lineal durante los primeros 18 días de cultivo en el trabajo de Calderón (2018).

Uno de los parámetros más usados para estimar el crecimiento de un cultivo vegetal es el consumo de sacarosa, sin embargo, la conductividad tiene también un gran potencial de estimar correctamente el crecimiento. Las mayores dificultades encontradas para usarla con esta finalidad han sido los factores que afectan a la correlación entre crecimiento y conductividad; por ejemplo, el metabolismo de la especie vegetal que se estudia y las densidades de inóculo usadas, sobre todo en suspensiones celulares (Kwok y Doran,1995). Para muchas especies se ha visto que las relaciones comúnmente son complejas, aunque por lo general se ha encontrado que una variación de biomasa ( $\Delta x$ ) es proporcional con una variación de conductividad ( $\Delta C$ ) (Suresh *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que el tipo de correlaciones utilizadas también son variables, por ejemplo, se pueden usar correlaciones logarítmicas, de inversos, de variaciones ( $\Delta$ ) y correlaciones lineales directas. Tal es el caso del comportamiento observado para la relación de la conductividad y el crecimiento de raíces de *Stevia rebaudiana* donde se encontró una correlación lineal inversa con un alto grado de correlación ( $r^2=0.94$ ) superior a las demás correlaciones (Fig. 12), similar a lo reportado por Condori *et al.* (2010) en raíces transformadas de cacahuate donde su correlación alcanzó un índice  $r^2=0.98$ .

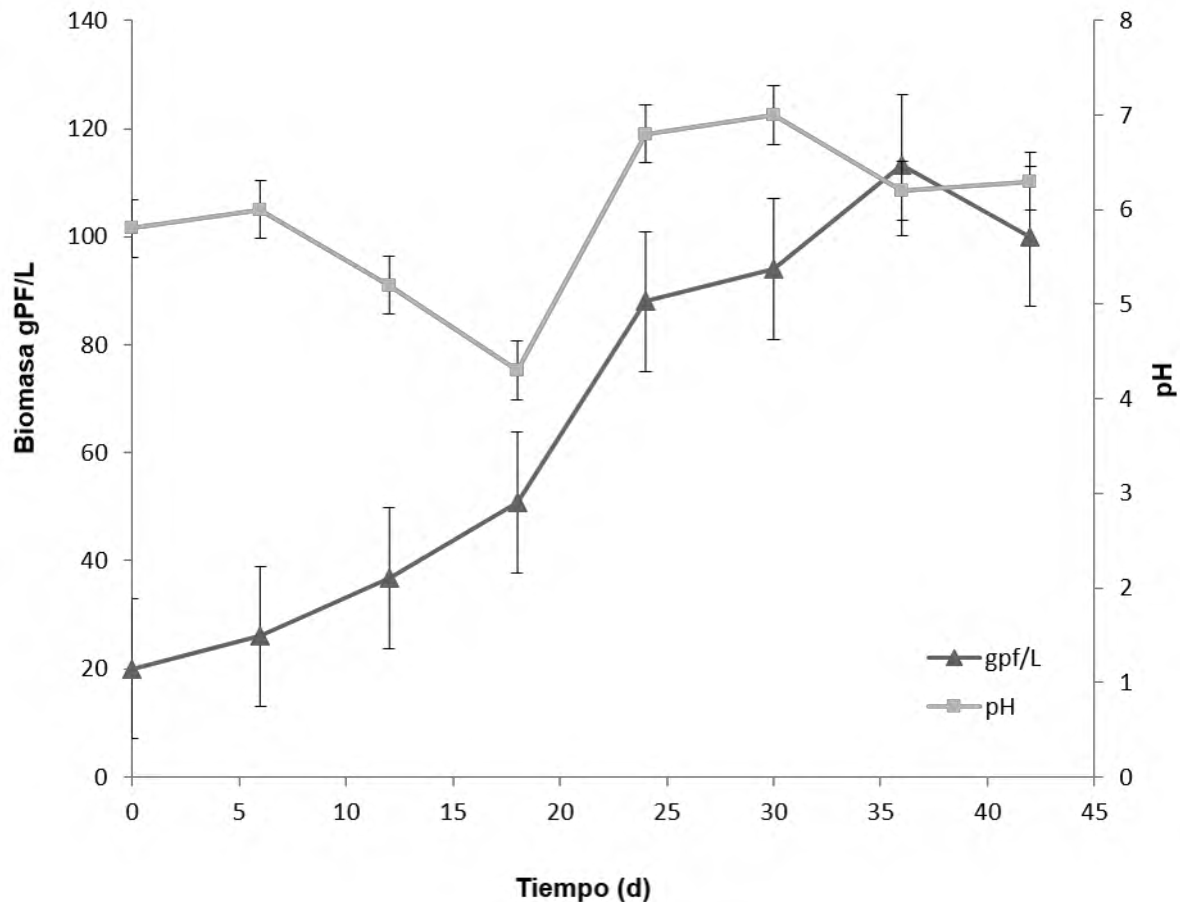


**Figura 12.** Correlación entre la conductividad y la acumulación de biomasa de raíces transformadas de *S. rebaudiana*.

Los resultados encontrados sugieren que la ecuación de correlación permitirá hacer estimaciones confiables de la acumulación de biomasa en los siguientes experimentos en biorreactor, además de ser una alternativa rápida a la determinación de fuente de carbono. Sivakumar *et al.*, (2010) evaluaron el crecimiento de raíces transformadas de *A. hypogaea* durante 20 días donde el nivel de conductividad disminuyó a 2.18 mS, y se relacionó con el aumento de biomasa. Jeong *et al.*, (2009) estudiaron el comportamiento de cultivos de raíces adventicias de *Echinacea purpurea* en biorreactores *airlift* para producir derivados de ácido caféico que son de importancia farmacéutica y terapéutica, observaron un aumento en la biomasa de hasta 10 veces, mencionaron que hubo una relación entre la concentración de biomasa, la sacarosa y la tasa de consumo de iones, encontraron que con una densidad de inóculo de 7g/L y una velocidad de aireación de 0.1 vvm son las adecuadas para la acumulación de biomasa y la producción de metabolitos secundarios de los derivados de ácido caféico evaluados, la concentración más alta fue la de ácido cicórico (26.64mg/g Peso seco). Liu *et al.*, (2006) realizaron la inducción de raíces transformadas de *Echinacea purpurea* para la producción de derivados de ácido caféico, evaluaron su crecimiento y observaron en el día 40 que la medida de conductividad disminuyó y la acumulación de biomasa incrementó con 12.2 g/L, también en el día 45 para ambos factores respectivamente.

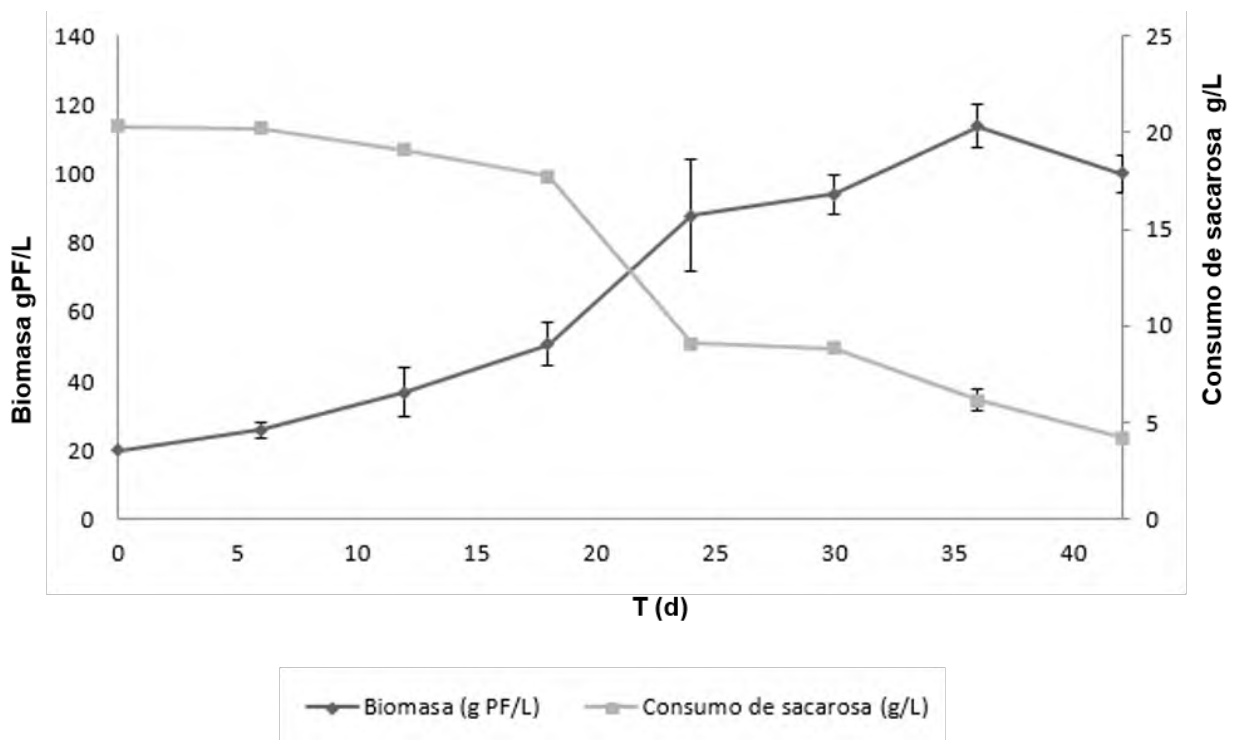
Pavlov *et al.*, (2005) estudiaron el crecimiento de raíces transformadas de *Beta vulgaris L.* para la producción de betalaínas y observaron un aumento en la acumulación de biomasa de 1,4 g / mL a los 12 días de cultivo y a su vez una disminución de la conductividad eléctrica.

Durante el seguimiento de la cinética el pH se mantuvo relativamente ácido entre 4-6, con un pH inicial de 5.8 (Fig.13). Durante los días 24 a 42 la concentración de iones hidronio disminuyó, por lo tanto, el pH se hizo menos ácido esto podría deberse a un cambio metabólico en el cultivo y a la utilización de algunos de ácidos orgánicos producidos en la fase inicial del crecimiento (día 1-18) este es un comportamiento que comúnmente presenta un sistema vegetal (Kaur y Pati, 2018).



**Figura 13.** Medida de pH durante la cinética de crecimiento de raíces transformadas M5R4.

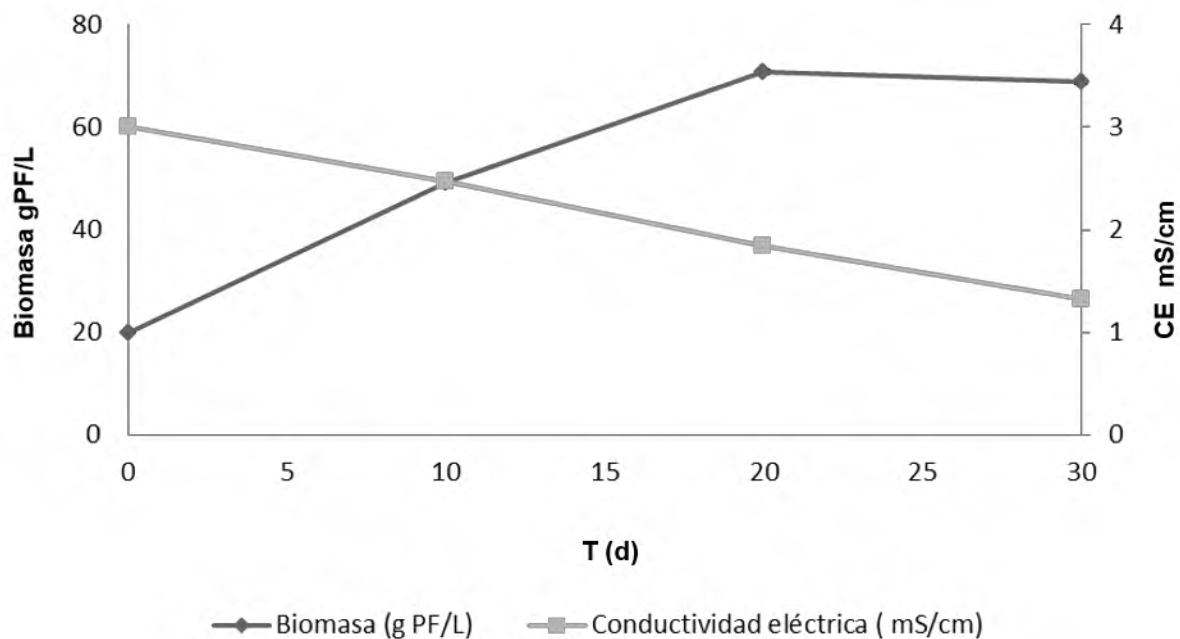
Evaluando la concentración de sacarosa en el medio (Fig.14), se observó que en los primeros 18 días hubo un consumo lineal moderado del sustrato, y en el día 24 la concentración de sacarosa llegó hasta 9.11 g/L, a partir del mismo hasta finalizar la cinética se mantuvo un perfil lineal de consumo, 4.22 g/L. El rendimiento con base a sustrato fue de  $Y_{x/s} = 4.974$  g biomasa/g azúcares consumidos. Un comportamiento similar al reportado por Calderón (2018) que obtuvo un  $Y_{x/s} = 5.589$  g biomasa/g azúcares consumidos.



**Figura 14.** Correlación de consumo de fuente de carbono con el crecimiento de raíces de *Stevia rebaudiana* M5R4.

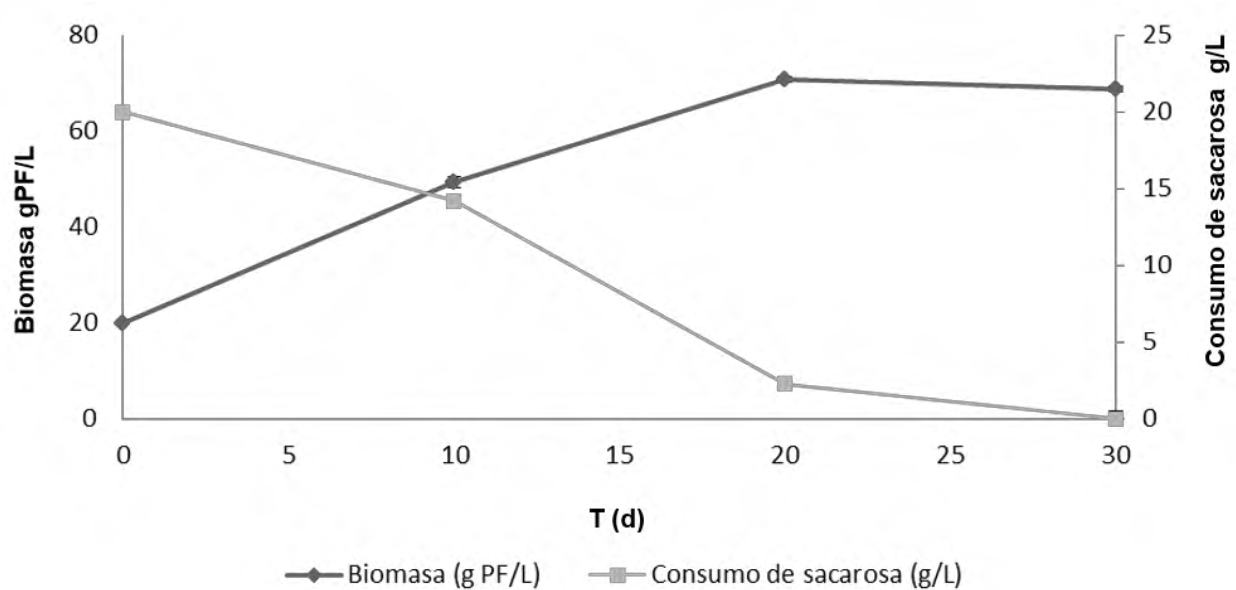
#### 8.4.2 Cinética de crecimiento de la línea transformada SRSDXS

Raíces de la línea SRSDXS previamente transformada por Jiménez-Brigada (2017), fueron escindidas de plántulas y crecidas en medio líquido bajo condiciones antes descritas (Apartado 7.2). Se evaluó el comportamiento cinético a nivel matraz en un lapso de 30 días, periodo que permitiera conocer un poco del sistema en esta condición de cultivo, similar al tiempo utilizado por Calderón (2018). En la Fig.15 se observa un comportamiento cinético relativamente normal, salvo que no muestra una fase de adaptación, probablemente debido a los tiempos de muestreo utilizados. El crecimiento fue lineal durante los primeros 20 días hasta que se alcanzó el máximo crecimiento registrado al día 20. Al mismo tiempo, se corroboró la correlación inversa existente entre la biomasa y la conductividad eléctrica que disminuyó de 3 a 1.326 mS/cm. La cinética de los cultivos SRSDXS, tuvo comportamiento similar al observado en las raíces transformadas M5R4.



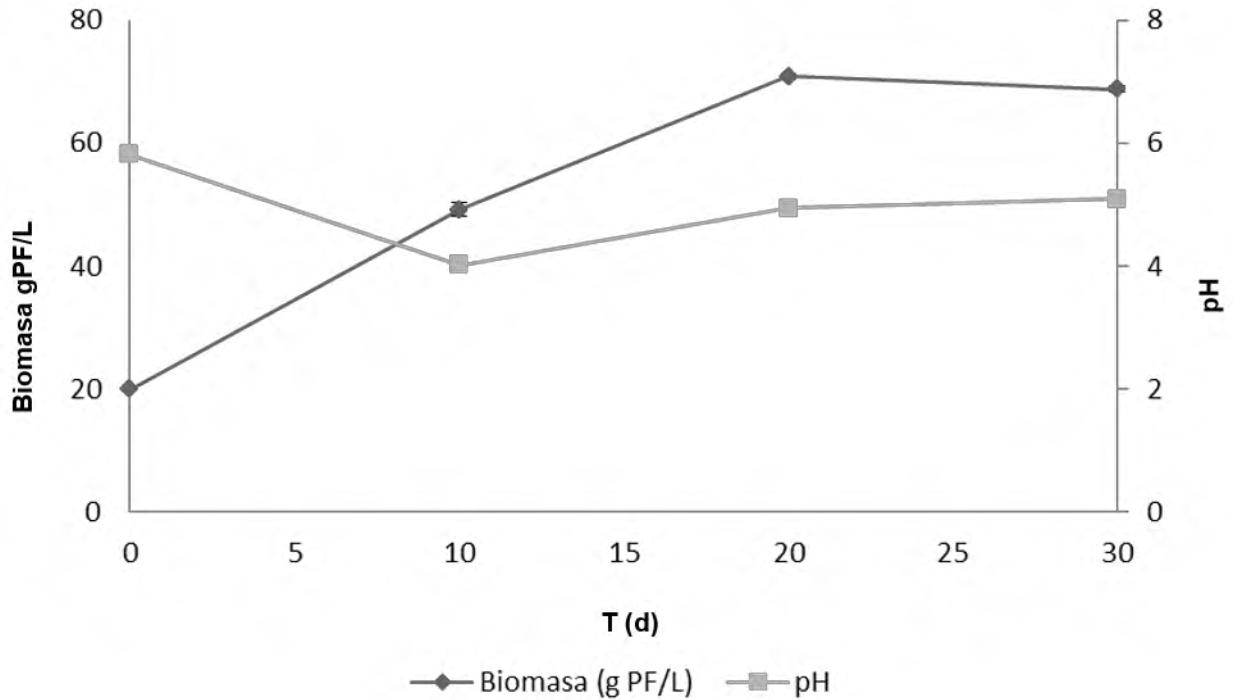
**Figura 15.** Cinética de crecimiento y conductividad en el medio del cultivo de raíces transformadas SRSDXS.

El consumo de sacarosa tuvo un comportamiento lineal hasta el día 20 de cultivo (Fig.16) y a partir de ese punto hubo un repunte en el consumo hasta llegar a la estabilización alrededor de 2.25 g/L remanentes. El rendimiento con base a sustrato de las raíces transformadas SRSDXS fue de  $Y_{x/s} = 1.43$  g de biomasa/g azúcares consumidos.



**Figura 16.** Acumulación de biomasa y consumo de sacarosa en la cinética de raíces transformadas SRSDXS.

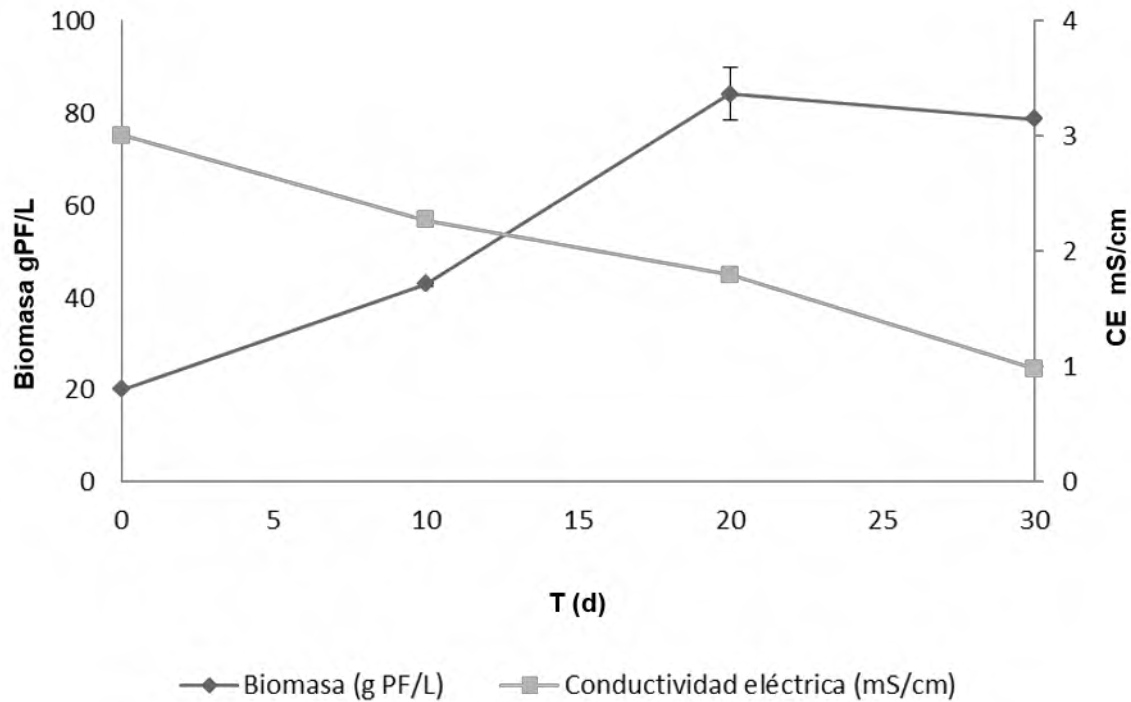
Durante el tiempo de cinética el pH se mantuvo en el espectro ácido, entre 4-6, con un pH inicial de 5.8 (Fig.17). En el día 10 el pH llegó al valor más bajo, 4.0, que coincide con la etapa de crecimiento lineal del cultivo e indicando una actividad metabólica intensa debido al consumo de la fuente de carbono y su transformación en ácidos orgánicos; este comportamiento es relativamente normal.



**Figura 17.** pH y acumulación de biomasa durante la cinética de crecimiento de raíces transformadas SRSDXS.

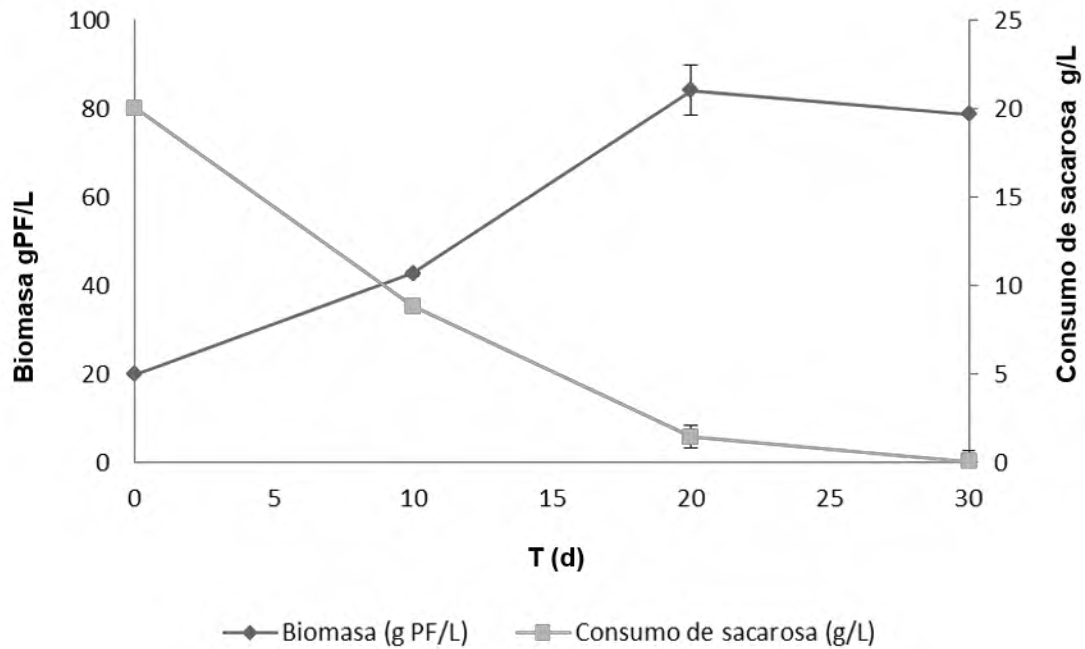
### 8.4.3 Cinética de crecimiento de la línea NT

Las raíces no transformadas, fueron escindidas de plántulas y crecidas en medio líquido bajo las condiciones previamente descritas (Apartado 7.2) y se llevaron a cinética en matraz en un periodo de 30 días, mismo tiempo que se consideró para la cinética anterior. Como puede observarse en la Fig.18 los cultivos tuvieron un comportamiento normal, con una fase de adaptación de los primeros días (0-9), mostrando su etapa de crecimiento de los días 10 a 20, alcanzándose aproximadamente 84 gPF/L de acumulación máxima. A partir de este punto se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. Además, se encontró una correlación de la conductividad eléctrica con el aumento de biomasa similar a la encontrada en las cinéticas anteriores, donde hubo una reducción constante hasta llegar a un valor final de 0.982 mS/cm.



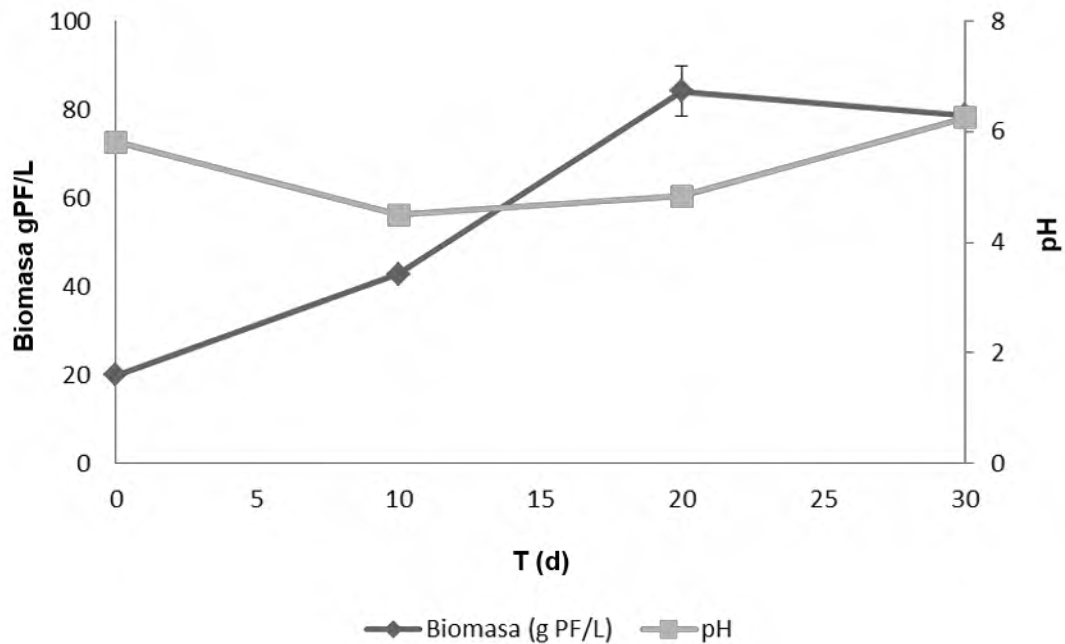
**Figura 18.** Cinética de crecimiento y conductividad en el medio del cultivo de raíces no transformadas.

El consumo de sacarosa se muestra en la Fig. 19 y tuvo un comportamiento lineal hasta el día 20 de cultivo en el cuál llego a 1.45 g/L de azúcar residual. El rendimiento con base a sustrato de la línea no transformada fue de  $Y_{x/s} = 2.93$  g de biomasa/g azúcares consumidos.



**Figura 19.** Acumulación de biomasa y consumo de sacarosa en la cinética de raíces no transformadas.

La concentración de iones hidronio se mantuvo ácida entre 4.5-6 con un pH inicial de 5.8 (Fig. 20), en el día 10 la medida fue menos ácida 4.5, debido probablemente al cambio metabólico.



**Figura 20.** Medida de pH durante la cinética de crecimiento de raíces no transformadas.

Los cultivos evaluados permitieron la determinación de algunos parámetros cinéticos, como se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Parámetros cinéticos de cultivos *in vitro* de *Stevia rebaudiana*

Cultivos	X <sub>0</sub> (g PF/L)	X <sub>max</sub> (g PF/L)	Ic	Vc	Td	Y <sub>x/s</sub>
Raíces no transformadas	0.5	84±4.00	3.2	0.067	7.41	2.93
Raíces transformadas SRSDXS	0.5	70.8±0.40	2.54	0.036	13.73	1.43
Raíces transformadas M5R4	0.5	113.2±12.45	4.66	0.051	9.80	4.97

Nota: X<sub>0</sub>: Biomasa inicial; X<sub>max</sub>: Biomasa máxima alcanzada; Ic: Índice de crecimiento Vc: Velocidad de crecimiento; Td: Tiempo de duplicación; Y<sub>x/s</sub>: Rendimiento de biomasa con base a sustrato

En lo que respecta a la acumulación de biomasa la línea transformada M5R4 fue significativamente superior a los otros cultivos: índice de crecimiento de 4.66, 1.83 y 1.46 veces más, respecto a las raíces SRSDXS y NT; en cuanto a la acumulación de biomasa 113.2 ± 12.45 g PF/L, 1.6 y 1.34 veces mayor en comparación a las raíces transformadas SRSDXS y no transformadas respectivamente. Yamazaki *et al.*, (1991) evaluaron el crecimiento de dos líneas transformadas de *S. rebaudiana* donde una de ellas alcanzó un peso fresco 3.3 veces mayor respecto al otro cultivo. Fu *et al.*, (2014) analizaron ocho líneas transformadas de *Stevia*, solo una fue superior, la mayor acumulación de biomasa fue en los días 24-27 y alcanzó 150 gPF/L que fue 48 veces mayor respecto al inóculo inicial cercanamente similar a lo obtenido por la línea transformada M5R4. Pandey *et al.*, (2016) determinaron el potencial de crecimiento de diez rizoclonos, solo uno designado como SRA4 mostró un crecimiento superior en el día 60 de cultivo. Alvarado (2017) evaluó el perfil cinético de raíces no transformadas de *Stevia rebaudiana* y determinó que la acumulación máxima de biomasa fue a los 20 días con 90 g PF/L con una velocidad de crecimiento de 0.09 d<sup>-1</sup>, cabe mencionar que utilizó una concentración de sales diferente en el medio. Por otro lado, Calderón (2018) estudió la línea M5R4 donde la acumulación de biomasa fue de 128 g PF/L, sin embargo, los resultados obtenidos fueron mayores a lo reportado por Alvarado (2017) y

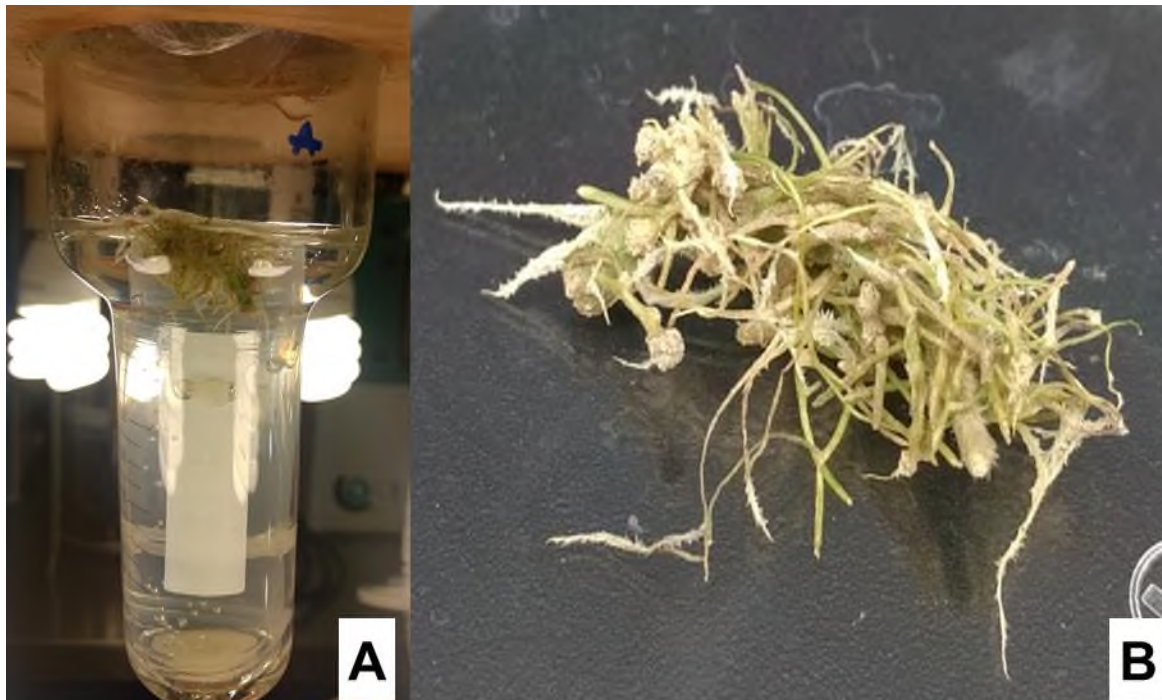
muy acercado a lo reportado por Calderón (2018), esto muestra la superioridad en cuanto al potencial de acumulación de biomasa de la línea transformada M5R4. Mthembu (2017) estudió la capacidad de iniciar el cultivo de raíces vellosas con dos cepas de *rhizogenes* de manera preliminar (A4T y LBA9402) después de dos o tres semanas de la inoculación se observó que la cepa LBA9402 produjo más raíces vellosas por explante además de crecer con mayor vigor que la cepa A4T. Kumari y Chandra, (2017) determinaron el crecimiento de biomasa de raíces transformadas de *S. rebaudiana* durante 21 días, la biomasa máxima alcanzada fue de  $527.33 \pm 0.35$  mg. Kaur (2018) evaluaron el crecimiento de raíces transformadas de *Stevia*, la producción de biomasa tuvo un aumento de 7.5 veces en comparación con las raíces no transformadas. Por lo tanto, a partir de los estudios reportados y retomando los resultados obtenidos de las cinéticas, la línea transformada M5R4 demuestra tener el mejor potencial de crecimiento respecto a las otras líneas evaluadas en este estudio. Dado que los cultivos de líneas transformadas exhiben mayor producción de biomasa, mayor ramificación y crecimiento acelerado en contraste la línea SRSDXS no mostró el perfil que se esperaba por ser una línea transformada, esto podría deberse desde la inducción ya que las cepas utilizadas para la infección pueden variar en su capacidad para producir raíces vellosas (Kumari y Chandra, 2017; Mthembu, 2017).

En general los cultivos de raíces transformadas son una alternativa para la producción masiva de raíces en menor tiempo sin la necesidad de utilizar reguladores de crecimiento y para obtener altas cantidades de metabolitos secundarios.

#### 8.4.4 Cinéticas de crecimiento, conductividad, consumo de sacarosa y pH de las líneas NT, M5R4 y SRSDXS en biorreactores *airlift*

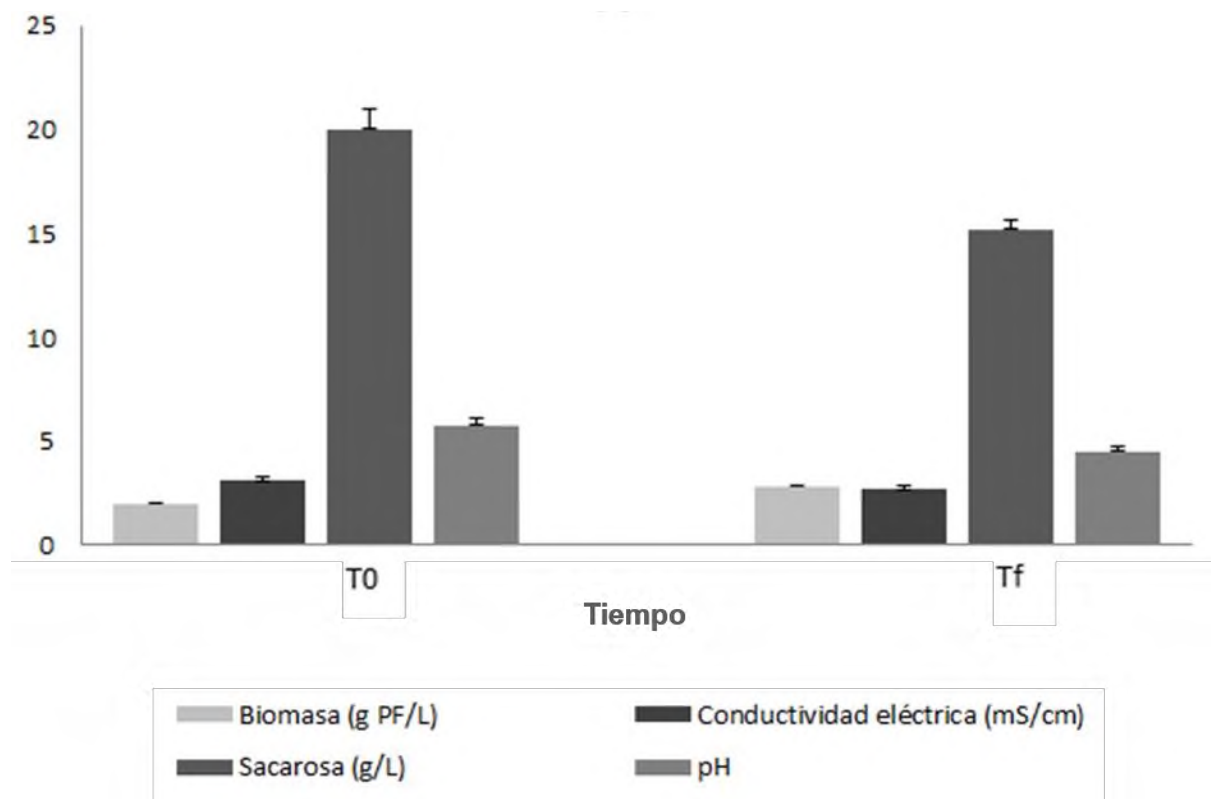
En el presente estudio se evaluó el crecimiento de raíces de *Stevia rebaudiana* en biorreactores *airlift* en régimen de lote, en donde el sistema es agitado neumáticamente; permitiendo la circulación del oxígeno y el contacto directo del medio con el cultivo. El experimento se ejecutó siguiendo un diseño experimental de cuadrado latino (3x3) con tratamientos numerados como se muestra en la sección de metodología. Se hizo uso de este diseño para evaluar el comportamiento de los diferentes cultivos de raíces de *Stevia* a las diferentes velocidades de aireación y densidades de inóculo propuestas.

En el tratamiento 1 (Fig. 21 A), cultivo de raíces transformadas SRSDXS con una densidad de inóculo de 2 g/L y una velocidad de aireación de 0.5 vvm, se observó elongación de los meristemos apicales durante el tiempo de cinética, así como la formación de callosidades en algunos meristemos (Fig. 21B).



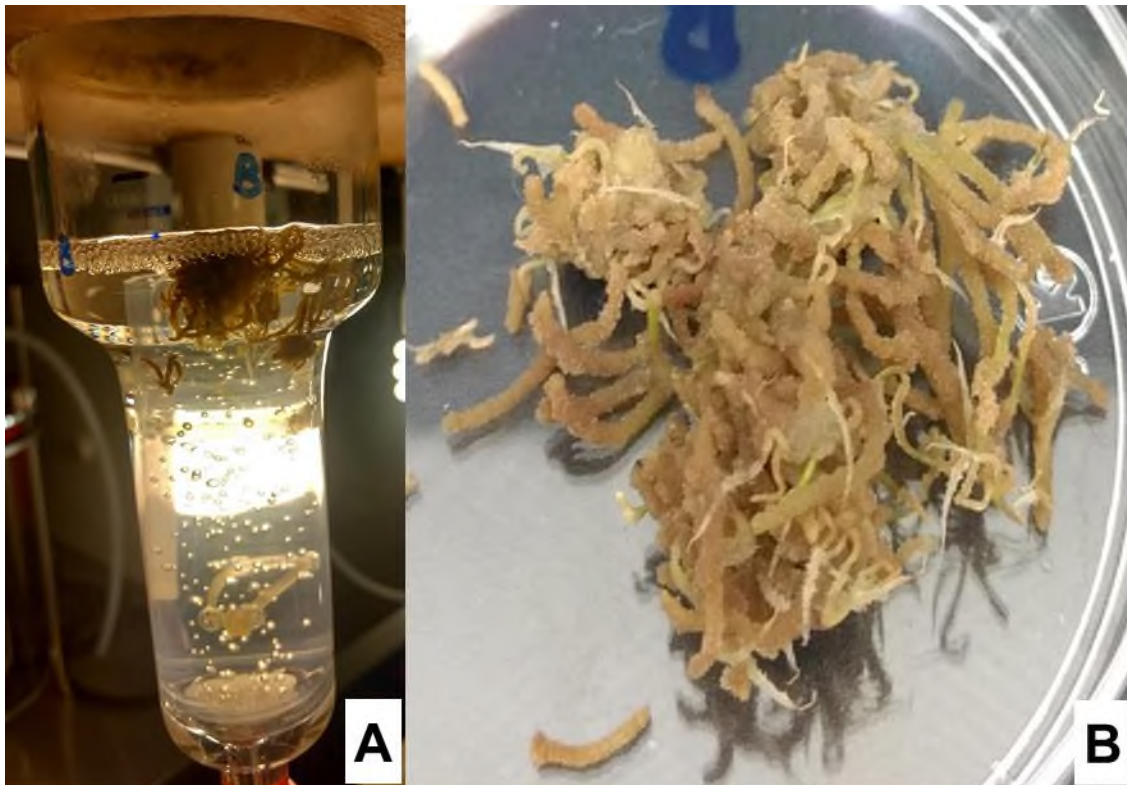
**Figura 21.** A) Inóculo inicial de raíces SRSDXS en el reactor *airlift* B) Raíces SRSDXS al final de la cinética.

En relación a la biomasa, se obtuvo una acumulación final de 2.85 g PF/L que fue 1.425 veces mayor respecto al inoculo inicial. La conductividad eléctrica disminuyó de 3.13 a 2.70 mS/cm. La concentración final de sacarosa llegó a 15.19 g/L y el rendimiento con base a sustrato de este tratamiento fue de  $Y_{x/s} = 0.17$  g de biomasa/g azúcares consumidos. El pH inicial fue de 5.8 y la medida final se estabilizó en 4.5, la concentración de iones hidronio en el medio tiende a variar durante el crecimiento, debido a los cambios metabólicos que experimenta la célula (Shibli *et al.*, 1999) (Fig. 22). En términos generales, las raíces crecieron y los parámetros tuvieron comportamientos relativamente normales.



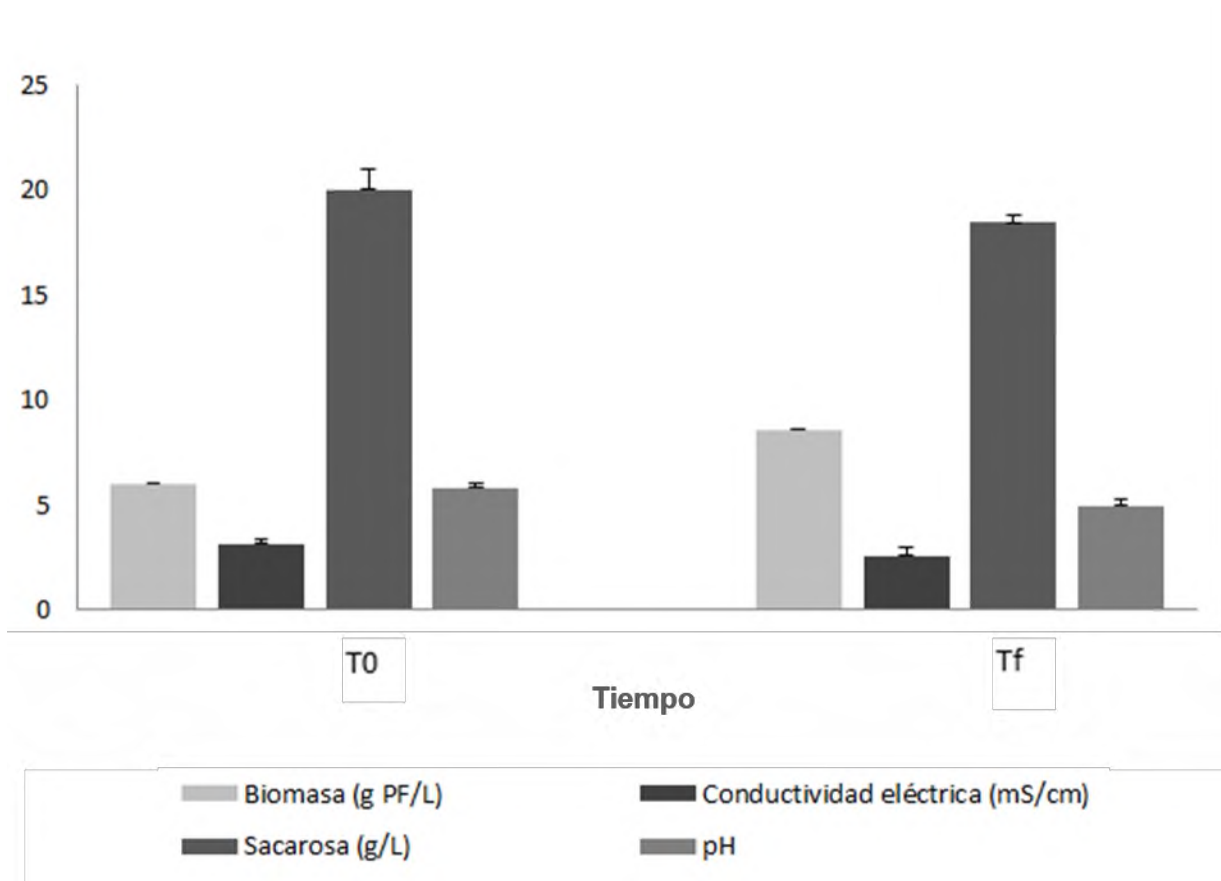
**Figura 22.** Parámetros evaluados en el tratamiento 1 (A). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L).

El tratamiento 2 (B), cultivo de raíces no transformadas con una densidad de inóculo de 6 g/L y una velocidad de aireación de 0.5 vvm, mostró oxidación ligera y callosidad (Fig. 23 B) misma que se adjudica al estado de cultivo del inóculo inicial (Fig. 23 A), también pudo observarse elongación de los meristemos apicales al concluir la cinética.



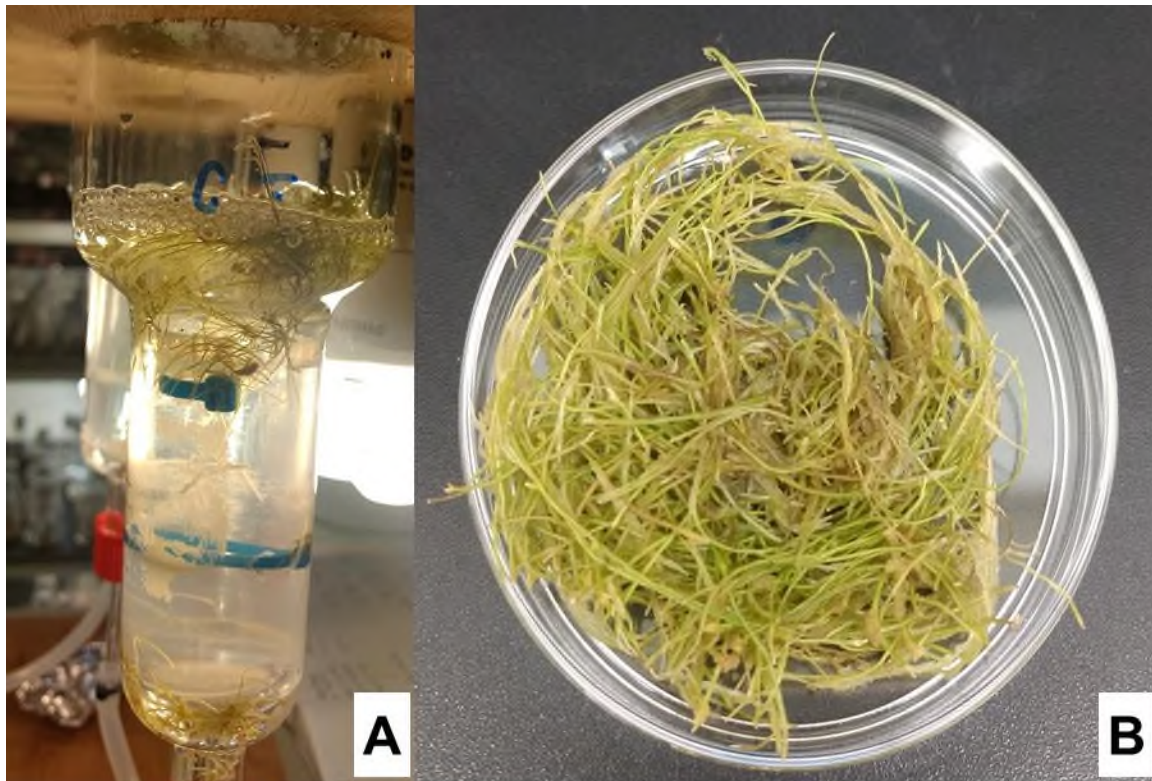
**Figura 23.** A) Inóculo inicial de raíces no transformadas en el reactor *airlift* B) Raíces no transformadas al final de la cinética.

La biomasa alcanzó una acumulación final de 8.57 g PF/L que resultó 1.429 veces mayor que el inóculo. La conductividad eléctrica disminuyó de 3.13 a 2.57 mS/cm. La concentración final de sacarosa llegó a 18.41 g/L. El rendimiento con base a sustrato de este tratamiento fue de  $Y_{x/s} = 1.61$  g de biomasa/g azúcares consumidos. El pH disminuyó de 5.8 a 4.9 (Fig. 24). En términos generales, las raíces crecieron y los demás parámetros tuvieron comportamientos relativamente normales.



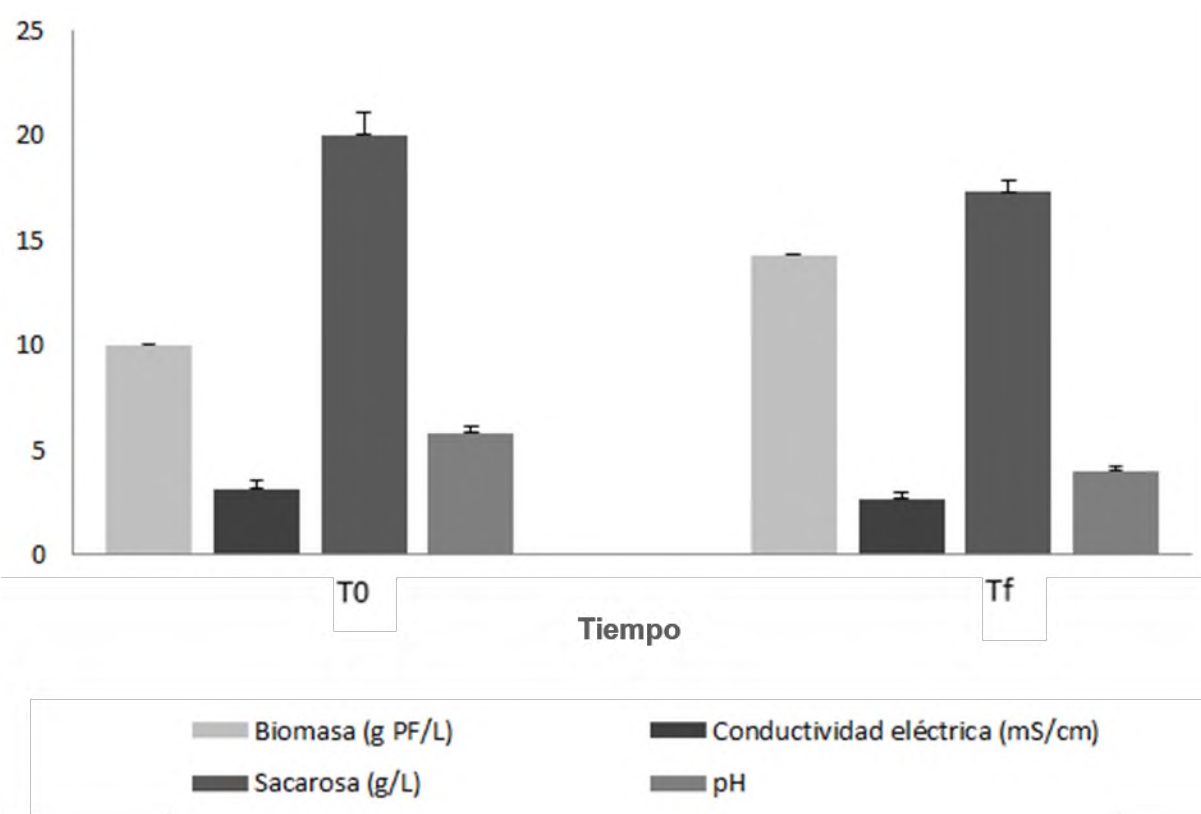
**Figura 24.** Parámetros evaluados en el tratamiento 2 (B). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L).

El tratamiento 3 (C) cultivo de raíces transformadas M5R4 con una densidad de inóculo de 10 g/L a una velocidad de aireación de 0.5 vvm, se muestra en la Fig. 25. Presentó ligera oxidación y se pudo observar la elongación de meristemos apicales pasados los 7 días de cultivo.



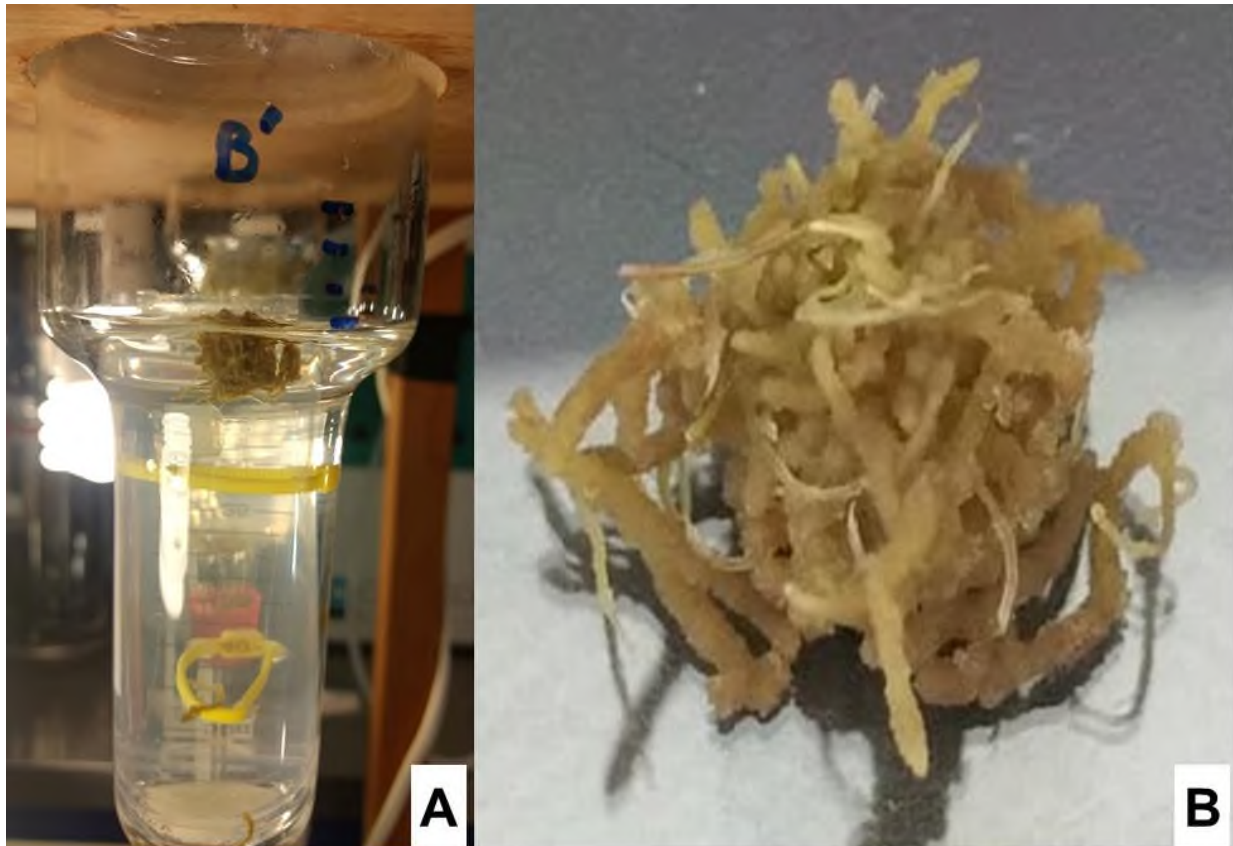
**Figura 25.** A) Inóculo inicial de raíces M5R4 B) Raíces M5R4 al final de la cinética.

En cuanto al crecimiento de biomasa el cultivo alcanzó una acumulación máxima de 14.28 g PF/L, 1.428 veces mayor que el inóculo inicial. La conductividad eléctrica se redujo de 3.13 a 2.67 mS/cm. La concentración de sacarosa final llegó a 17.29 g/L. El rendimiento con base a sustrato de este tratamiento fue de  $Y_{x/s} = 1.58$  g de biomasa/g azúcares consumidos. Con respecto al pH en el medio, hubo disminución que mantuvo el valor en el rango ácido de la escala, con una medida final de 4.0 (Fig. 26).



**Figura 26.** Parámetros evaluados en el tratamiento 3 (C). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L).

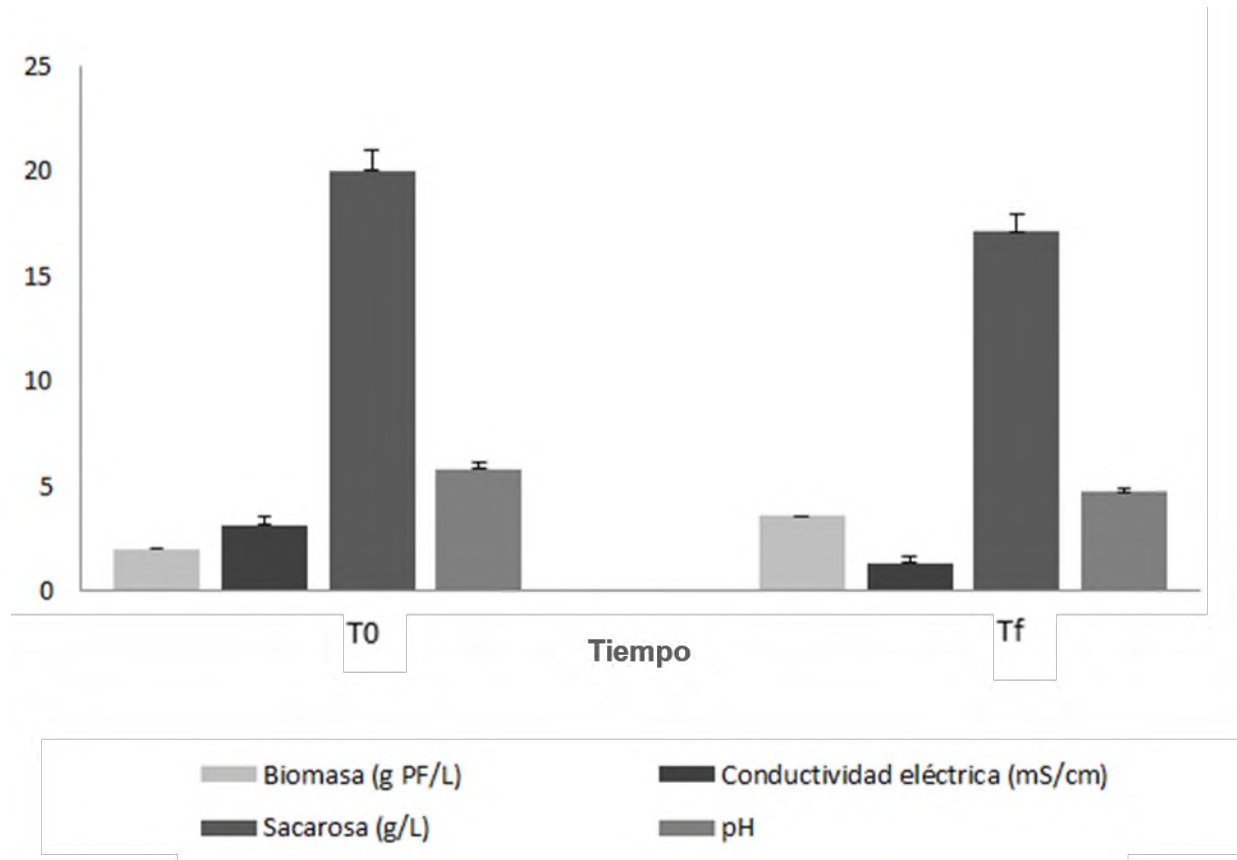
El tratamiento 4 (B), raíces no transformadas con una densidad de inoculo de 2 g/L a una velocidad de aireación de 0.8 vvm, se muestra en la Fig. 27. Este tratamiento produjo elongación de los meristemos apicales pasados los 7 días de cultivo y callosidad proveniente del inoculo inicial.



**Figura 27.** A) Inoculo inicial de raíces no transformadas B) Raíces no transformadas al término de la cinética.

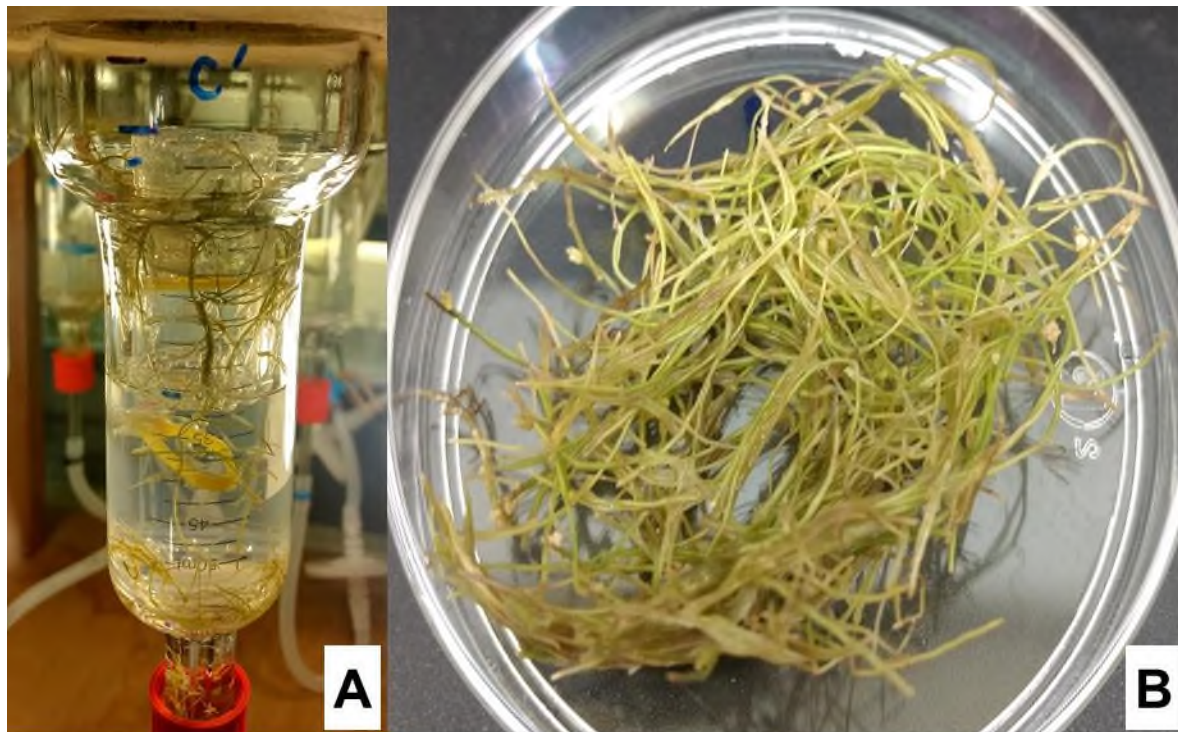
La biomasa alcanzó una acumulación máxima de 3.57 g PF/L, 1.785 veces más que el inoculo inicial. La medida de conductividad eléctrica disminuyó de 3.13 a 1.32 mS/cm. Similar a los resultados obtenidos por Jeong *et al.*, (2009), en raíces adventicias de *Echinacea purpurea* cultivadas en biorreactor *airlift* aireado a 0.1 vvm donde la conductividad en el medio disminuyó desde la primera semana de cultivo y tuvo correlación con la acumulación de biomasa. La concentración final de sacarosa llegó a 17.08 g/L. El rendimiento con base a sustrato de este tratamiento fue de  $Y_{x/s} = 0.53$  g de biomasa/g azúcares consumidos. En relación al pH en el medio, tuvo cierta disminución que sigue siendo ácida, con una medida final de 4.7 (Fig. 28).

Este tratamiento generó la mayor cantidad de biomasa y la mayor disminución de conductividad eléctrica de entre todos los tratamientos.



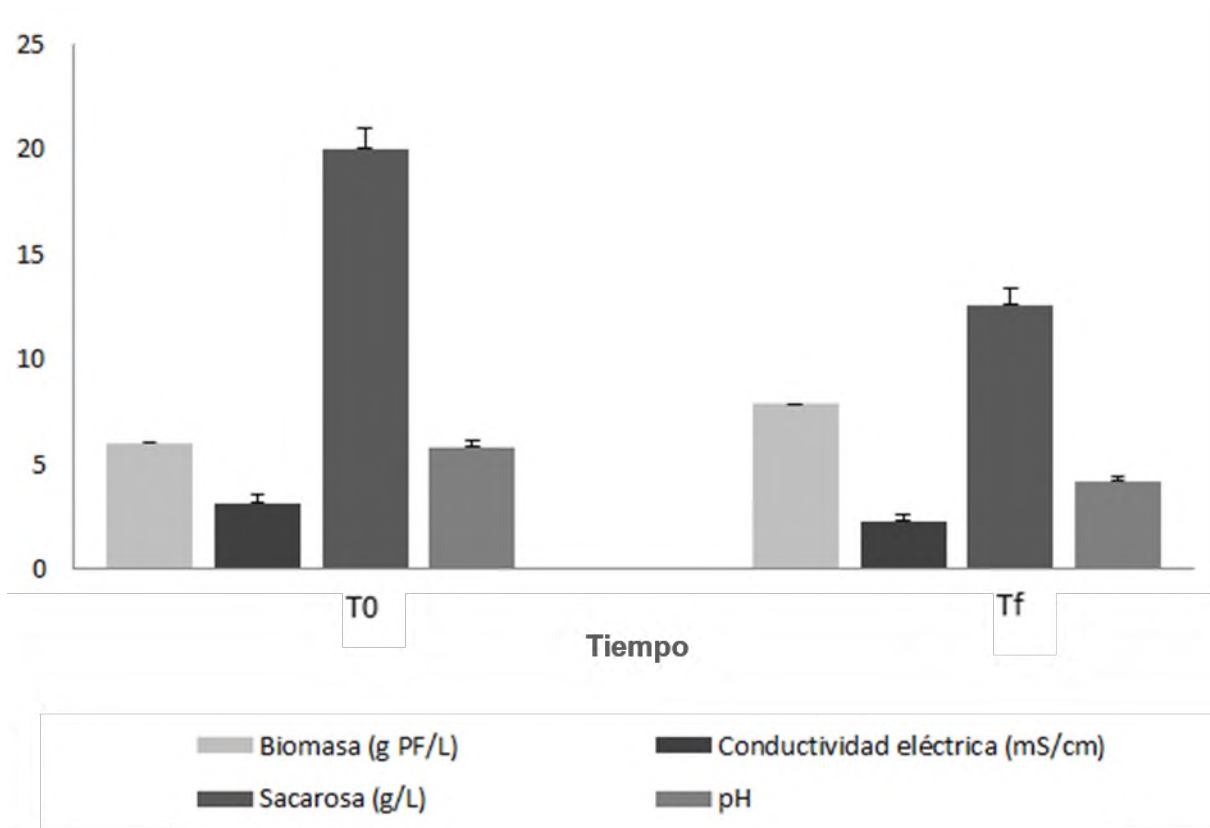
**Figura 28.** Parámetros evaluados en el tratamiento 4 (B). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L).

El tratamiento 5 (C) cultivo de raíces transformadas M5R4 con una densidad de inóculo de 6 g/L y una velocidad de aireación de 0.8 vvm, como puede observarse en la Fig. 29. Las raíces sufrieron una ligera oxidación y el crecimiento de meristemos apicales.



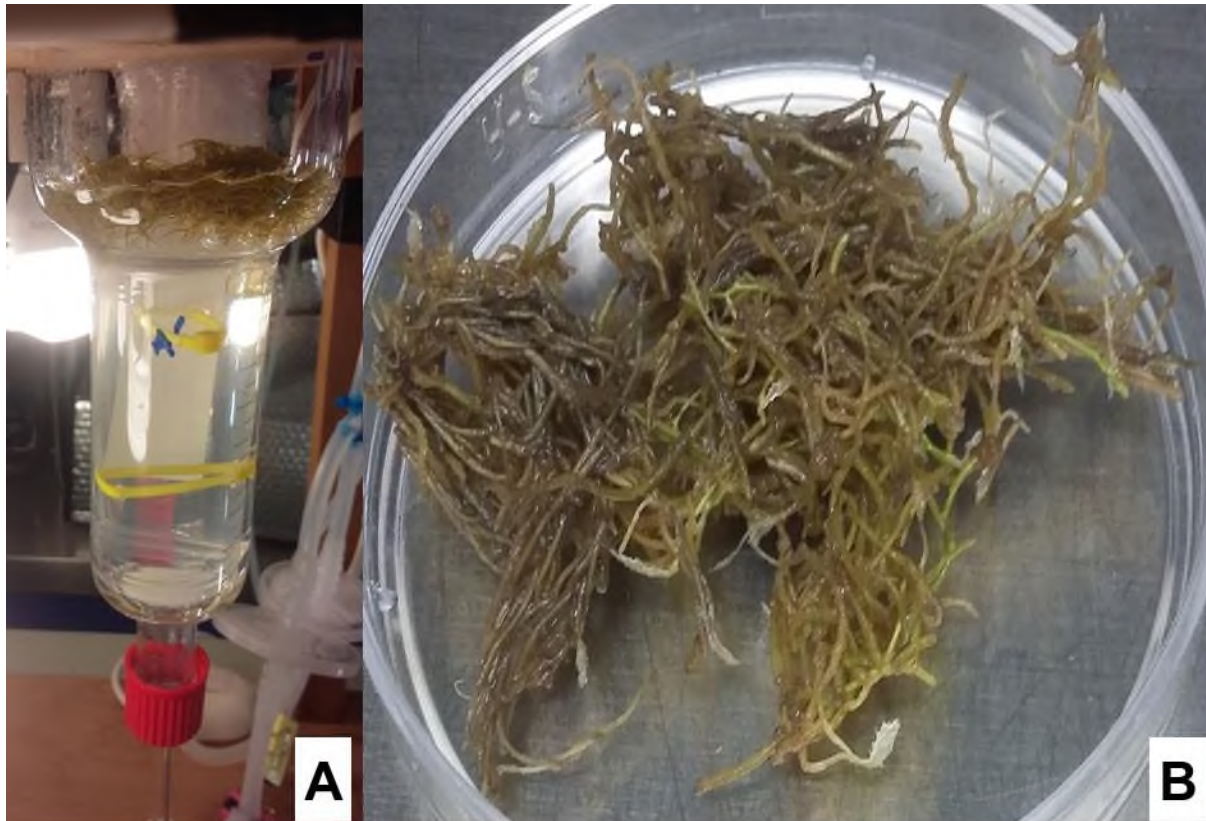
**Figura 29.** A) Inoculo inicial de raíces transformadas M5R4 B) Raíces transformadas M5R4 al término de la cinética.

La biomasa del cultivo alcanzó una acumulación máxima de 7.85g PF/L, 1.30 veces mayor respecto al inóculo inicial. La conductividad eléctrica disminuyó de 3.13 a 2.29 mS/cm. La concentración de sacarosa final se estableció en 12.58 g/L En relación al pH en el medio, tuvo cierta disminución que sigue siendo ácida, con una medida final de 4.2 (Fig.30).



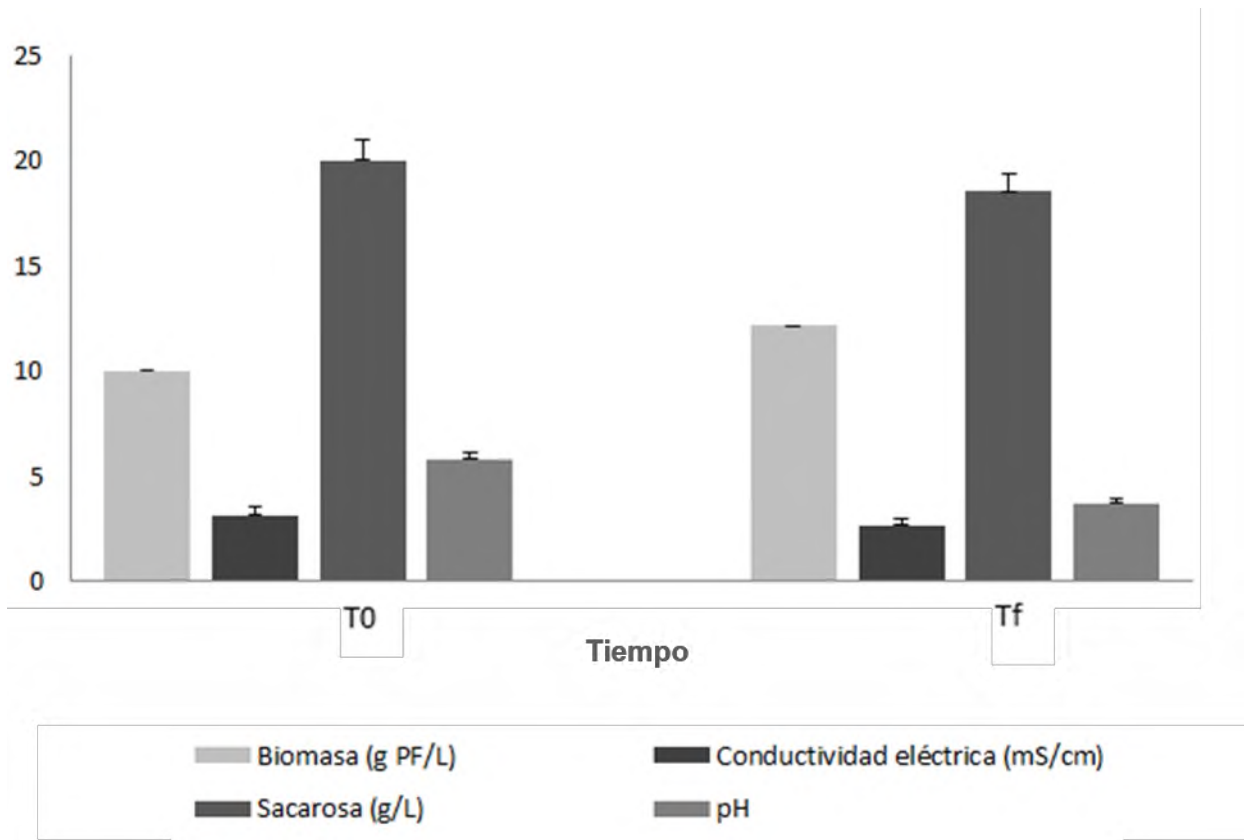
**Figura 30.** Parámetros evaluados en el tratamiento 5 (C). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L).

El tratamiento 6 (A) cultivo de raíces transformadas SRSDXS con una densidad de inóculo de 10 g/L y una velocidad de aireación de 0.8 vvm, como puede observarse en la Fig. 31. Las raíces sufrieron oxidación severa y durante el tiempo de cultivo fue visible el crecimiento de los meristemos apicales.



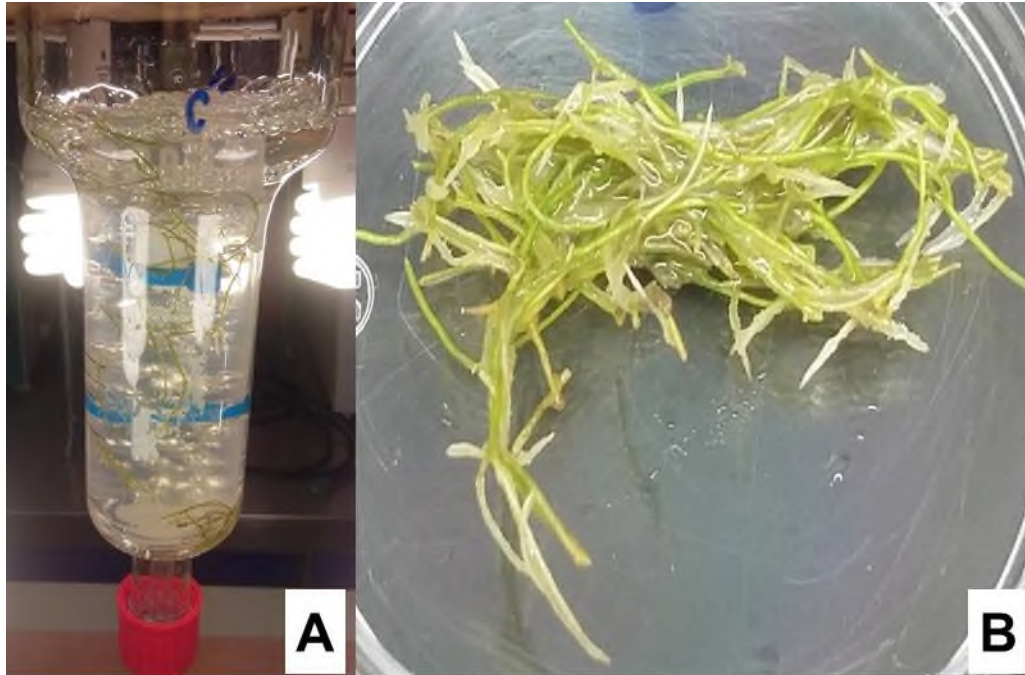
**Figura 31.** A) Inóculo inicial de raíces transformadas SRSDXS B) Raíces transformadas SRSDXS al término de la cinética.

La biomasa alcanzó una acumulación máxima de 12.14 g PF/L, 1.214 veces mayor que el inóculo inicial. La medida de conductividad eléctrica disminuyó de 3.13 a 2.69 mS/cm. La concentración de sacarosa llegó a 18.51 g/L, el rendimiento con base a sustrato de este cultivo fue de  $Y_{x/s} = 1.43$  g de biomasa/ g de azúcares consumidos. En relación al pH la medida final fue de 3.7 (Fig. 32).



**Figura 32.** Parámetros evaluados en el tratamiento 6 (A). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L).

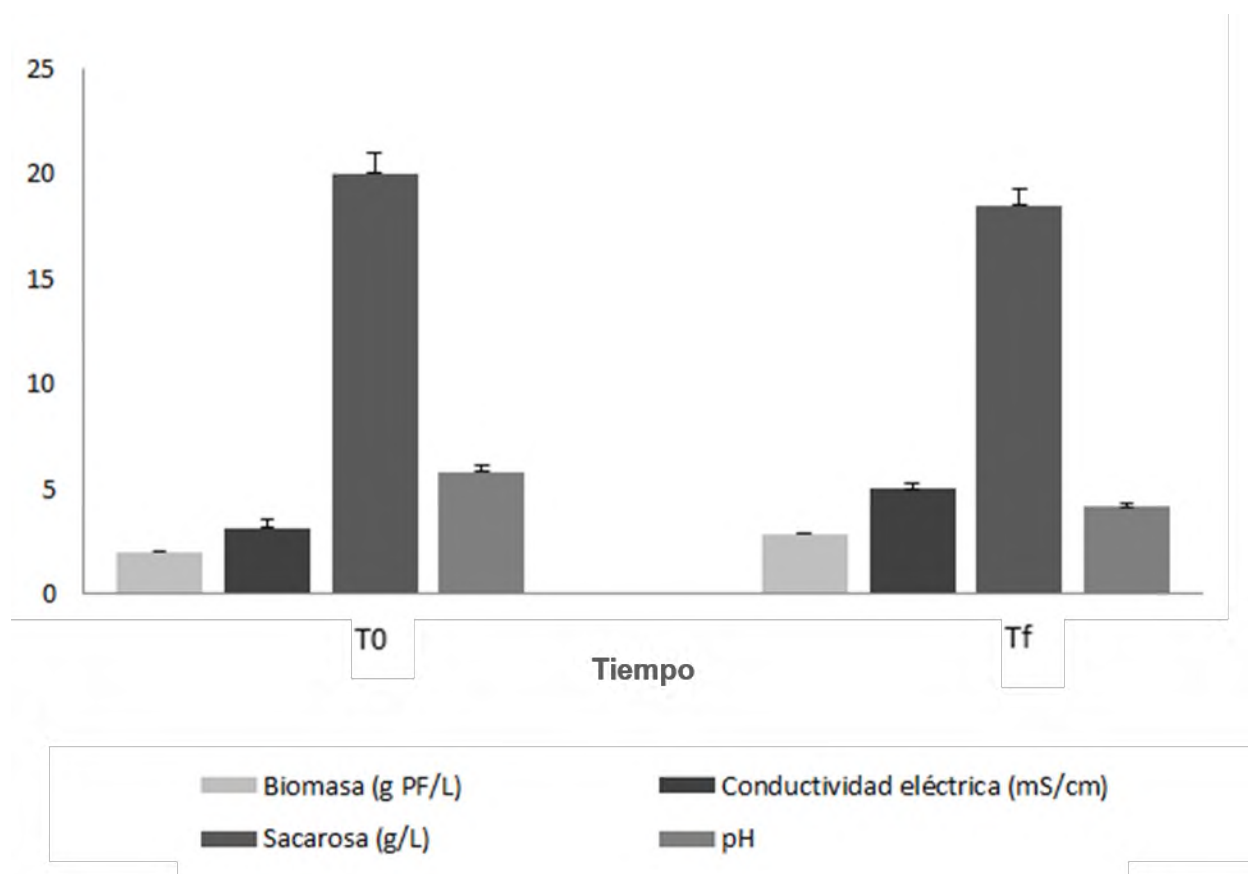
El tratamiento 7 (C) cultivo de raíces transformadas M5R4 con una densidad de inóculo de 2 g/L y una velocidad de aireación de 1 vvm, como puede observarse en la Fig. 33. Las raíces no sufrieron oxidación y se observó el crecimiento de los meristemos apicales.



**Figura 33.** A) Inóculo inicial de raíces transformadas M5R4 B) Raíces transformadas M5R4 al término de la cinética.

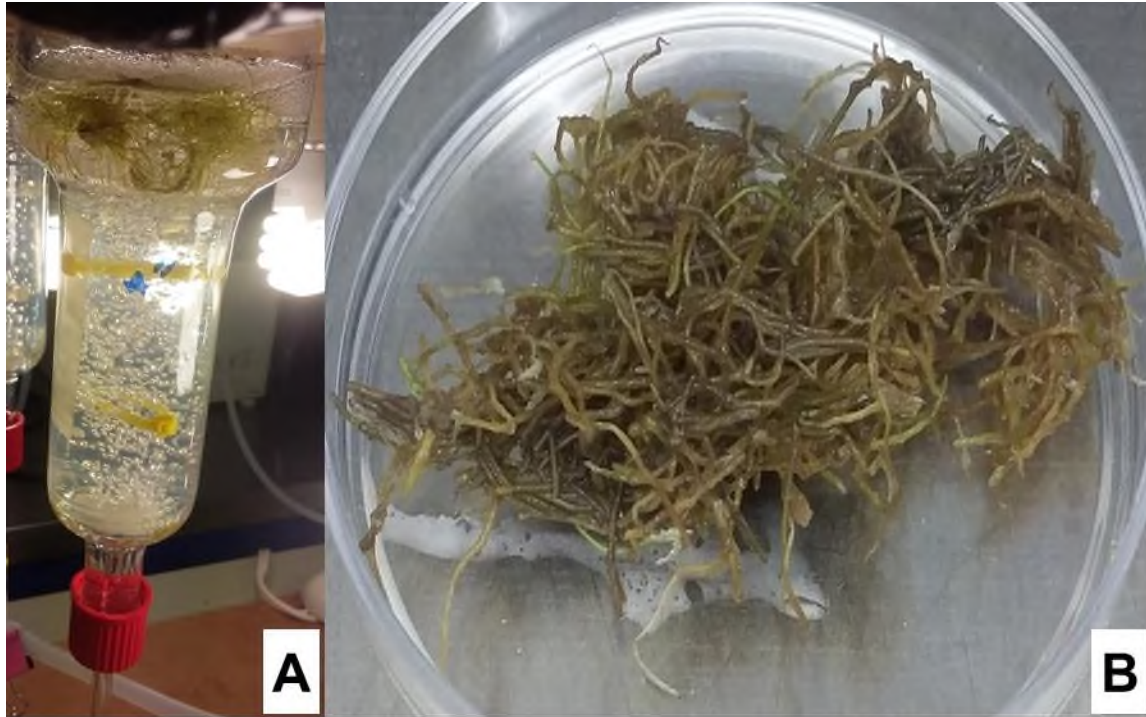
La biomasa alcanzó una acumulación máxima de 2.85 g PF/L, que fue 1.425 veces mayor respecto al inóculo inicial. La medida de conductividad eléctrica aumentó de 3.13 a 4.99 mS/cm. Este resultado concuerda con hallazgos previos de Shibli *et al.*, (1999) en cultivos de brotes de papa, pera y almendra la conductividad eléctrica del medio aumento al transcurrir el tiempo y atribuyeron que el aumento podría ser el resultado de la pérdida de agua y en consecuencia el incremento de la acumulación de más sales en el medio de cultivo.

La concentración de sacarosa llegó a 18.49 g/L, el rendimiento con base a sustrato de este cultivo fue  $Y_{x/s} = 0.56$  g de biomasa / g de azúcares consumidos. Con respecto al pH la medida final fue de 4.1 (Fig. 34).



**Figura 34.** Parámetros evaluados en el tratamiento 7 (C). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L).

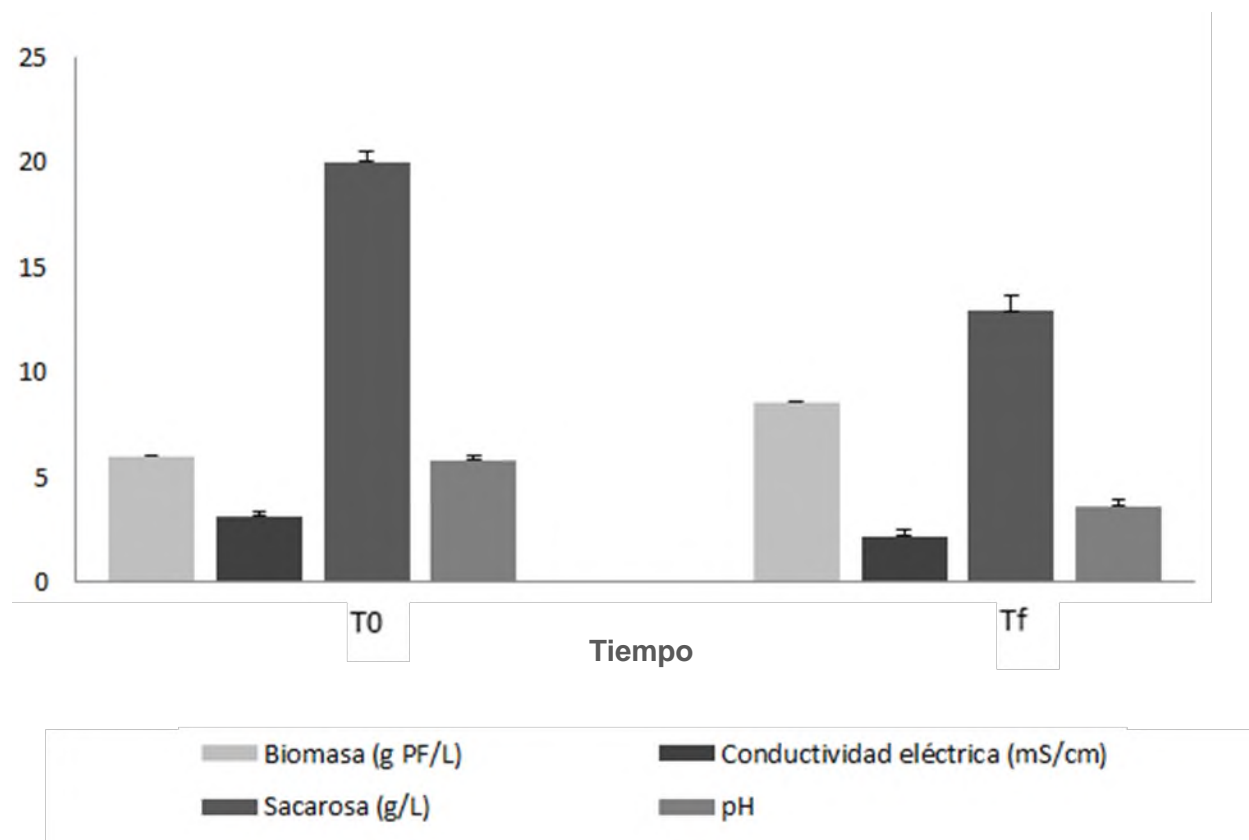
El tratamiento 8 (A) cultivo de raíces transformadas SRSDXS con una densidad de inóculo de 6 g/L y una velocidad de aireación de 1 vvm, como puede observarse en la Fig. 35. Las raíces sufrieron oxidación y se observó el crecimiento de los meristemos apicales durante el tiempo de cultivo.



**Figura 35.** A) Inóculo inicial de raíces transformadas SRSDXS B) Raíces transformadas SRSDXS al término de la cinética.

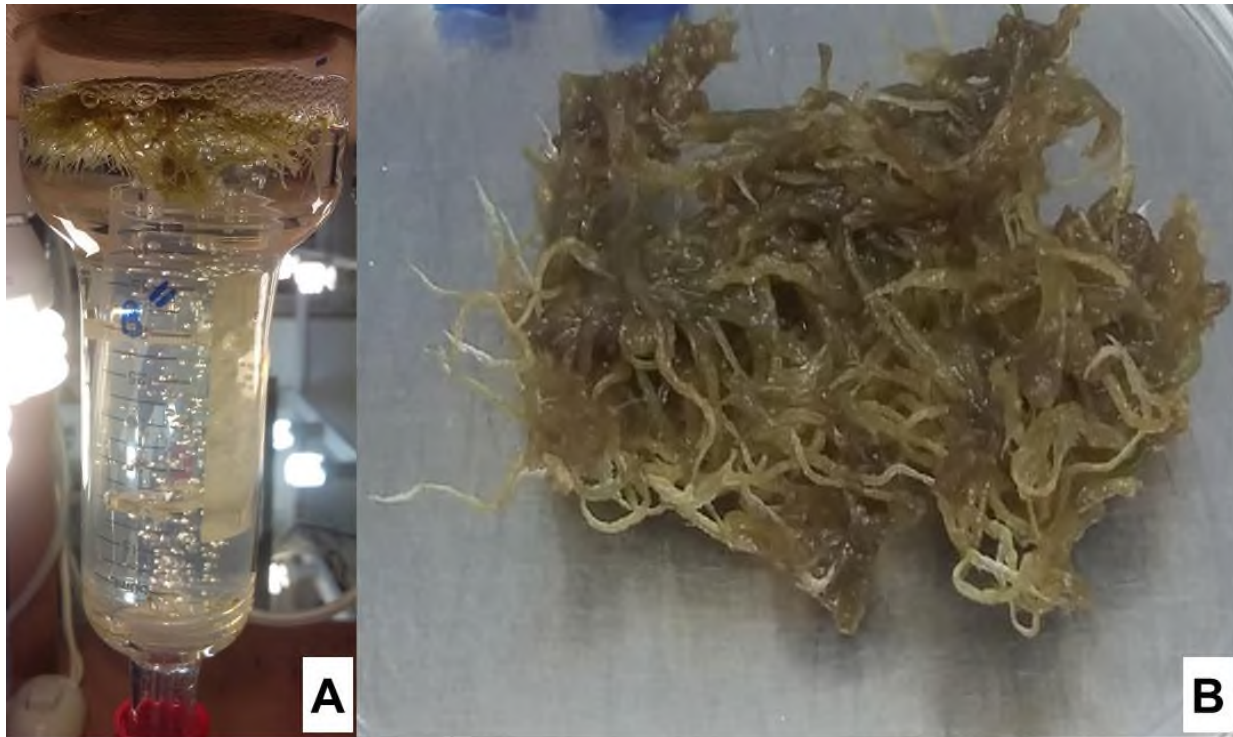
La biomasa alcanzó una acumulación máxima de 8.57 g PF/L, 1.429 veces mayor respecto al inóculo inicial. La medida de conductividad eléctrica disminuyó de 3.13 a 2.21 mS/cm. La concentración de sacarosa final llegó a 12.92 g/L.  $Y_{x/s} = 0.36$  g de biomasa/g de azúcares consumidos. Respecto al pH la medida final fue de 3.6. Algunos resultados de estudios previos indican que la disminución de iones hidrógeno decrece durante la asimilación de amoníaco, y que la medida de pH sugiere de manera específica las etapas de crecimiento; en la fase estacionaria del cultivo puede presentarse un pH de 6.5 a 7.0 (Jeong *et al.*, 2009). Jeong *et al.* Añadieron que el aumento de las lecturas de pH en la etapa tardía de crecimiento en cultivos en biorreactor de raíces adventicias de *E. purpurea* estaban relacionadas con el consumo casi total de nutrientes en el medio y la acumulación de metabolitos secundarios. Sin embargo, dado que el tiempo de crecimiento del presente experimento fue de 1 semana de cultivo y que solo se monitorearon los puntos

iniciales y finales, no se tiene un perfil amplio del pH para hacer mayores comparaciones (Fig.36).



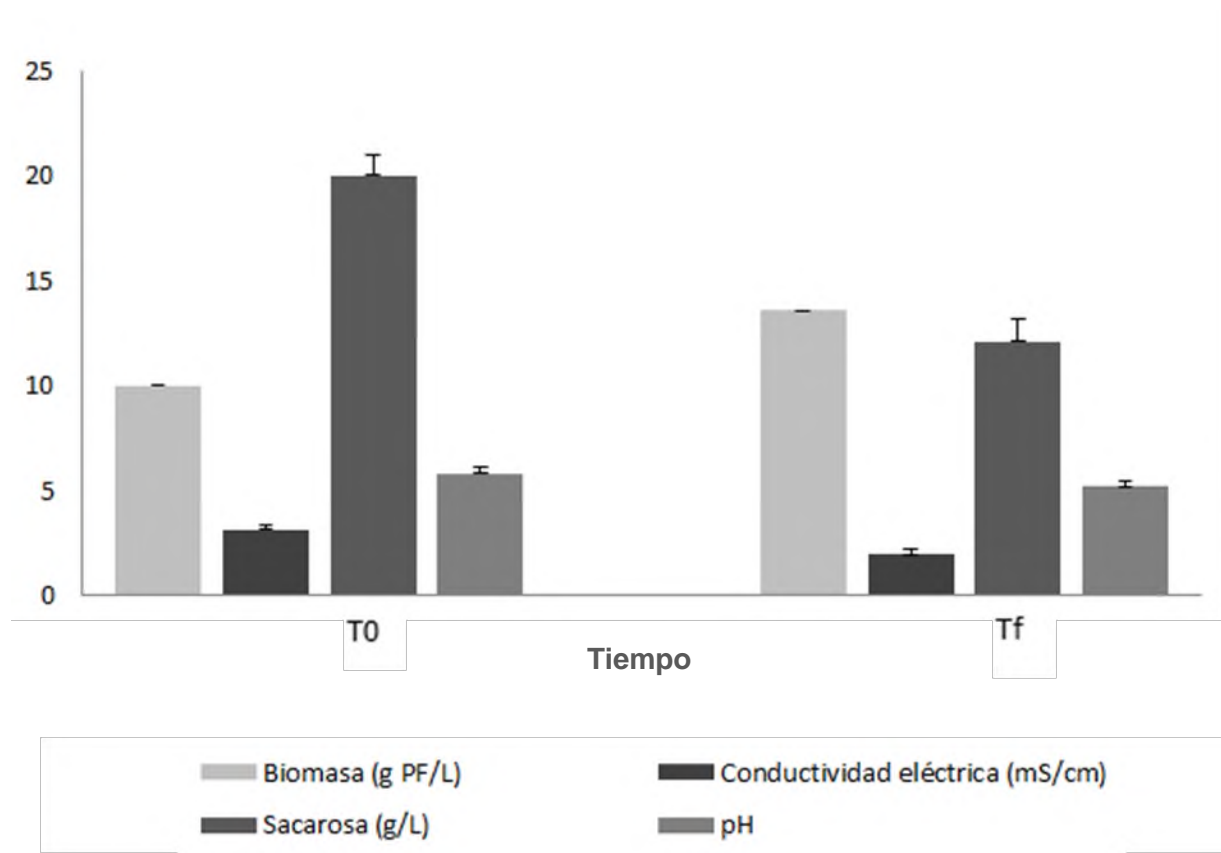
**Figura 36.** Parámetros evaluados en el tratamiento 8 (A). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L).

El tratamiento 9 (B) cultivo de raíces no transformadas con una densidad de inóculo de 10 g/L y una velocidad de aireación de 1 vvm, como puede observarse en la Fig. 37. Las raíces sufrieron oxidación y se observó el crecimiento de los meristemos apicales durante el tiempo de cultivo.



**Figura 37.** A) Inóculo inicial de raíces no transformadas B) Raíces no transformadas al término de la cinética.

La biomasa alcanzó una acumulación máxima de 13.57 g PF/L, que fue 1.357 veces más que el inóculo inicial. La medida de conductividad eléctrica disminuyó de 3.13 a 1.94 mS/cm. La concentración final de sacarosa llegó a 12.09 g/L, el rendimiento con base a sustrato de este cultivo fue de  $Y_{x/s} = 0.45$  g de biomasa /g de azúcares consumidos. Un hallazgo similar fue reportado por Jeong *et al.*, (2009) en cultivos de raíces adventicias de *Echinacea purpurea* crecidas en biorreactor *airlift* donde la concentración de sacarosa disminuyó durante el periodo de crecimiento, con una fuerte caída de 5 a 1.35 % después de la semana 1 de cultivo. En lo que respecta al pH la medida final fue de 5.2 (Fig. 38). El cultivo creció en correlación con los parámetros evaluados en el sistema.



**Figura 38.** Parámetros evaluados en el tratamiento 9 (B). T0: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L) y Tf: Biomasa (g PF/ L), Conductividad eléctrica (mS/cm), Sacarosa (g/L).

Dado el régimen de operación utilizado se logró solo la determinación de algunos parámetros cinéticos de los cultivos; el índice de crecimiento y el rendimiento de biomasa con base a sustrato (Tabla 10).

**Tabla 10.** Características de los cultivos comparados creciendo en biorreactor *airlift* durante 7 días.

Tratamiento	Densidad de inóculo (g/L)	Flujo de aireación (vvm)	Biomasa final (gPF/L)	Sustrato residual (g/L)	IC	Rendimiento $Y/x_s$ (g/g)
T1(A)	2 g/L	0.5	2.85	15.19	0.42	0.17
T2(B)	6 g/L	0.5	8.57	18.41	0.42	1.61
T3(C)	10 g/L	0.5	14.28	17.29	0.42	1.58
T4(B)	2 g/L	0.8	3.57	17.08	0.78	0.53
T5(C)	6 g/L	0.8	7.85	12.58	0.30	0.25
T6(A)	10 g/L	0.8	12.14	18.51	0.21	1.43
T7 (C)	2 g/L	1.0	2.85	18.49	0.42	0.56
T8 (A)	6 g/L	1.0	8.57	12.92	0.42	0.36
T9 (B)	10 g/L	1.0	13.57	12.09	0.35	0.45

Nota: A: Raíces SRSDXS, B: Raíces no transformadas, C: Raíces M5R4

Después de los análisis de varianza para cada una de las variables de respuesta que fueron consideradas: biomasa, consumo de sacarosa, y producción de fenoles se observó que el único factor que tuvo un efecto significativo fue la densidad de inóculo (Anexo 2), particularmente sobre la acumulación de biomasa con un valor de  $P = 0.009$  y no tuvo efecto sobre la acumulación de fenoles con un valor de  $P=0.067$  ( $\alpha=0.05$ ) presentada en la siguiente sección. Los restantes factores (tipo de cultivo y velocidad de aireación) no tuvieron efectos significativos sobre las variables de respuesta ya que se obtuvieron valores de  $P$  superiores a la significancia (Anexo 3, 4).

Dicho lo anterior, existen factores que influyen sobre el crecimiento y la productividad de los metabolitos secundarios, como la densidad de inóculo (Kanokwaree y Doran, 1997). En el presente diseño experimental se evaluaron tres densidades: 2 g/L, 6 g/L y 10 g /L de PF (Tabla 5). Los cultivos en biorreactor que alcanzaron una biomasa final superior en comparación a los demás fueron iniciados con una relación de inóculo de 10 g /L de raíces transformadas y no transformadas (T3 (C) 14.28 gPF/L, T6 (A) 12.14 gPF/L, T9 (B) 13.57 g PF/L respectivamente).

Otro factor que puede influir en el crecimiento de raíces en un sistema de biorreactor *airlift* es la velocidad de aireación, que a su vez tiende a favorecer la transferencia de oxígeno (Sajc *et al.*, 2000). En este estudio se evaluaron tres velocidades: 0.5 vvm, 0.8 vvm y 1.0 vvm, los resultados obtenidos reflejan que las tasas de aireación utilizadas

no tuvieron efecto significativo sobre la acumulación de la biomasa, sin embargo, se pudo observar que las raíces aireadas a 0.8 vvm y 1.0 vvm presentaron oxidación como reflejo de daño en el tejido. Esto pudiera ser debido a la pérdida de oxígeno, CO<sub>2</sub> y etileno que forman una composición de gases primordiales en el cultivo *in vitro* vegetal y que pueden tener efectos fisiológicos significativos sobre el crecimiento celular y la producción de MS, ya que no todas las especies responden de forma positiva a este tipo de estrés (Jeong *et al.*, 2006). Además, se ha reportado en diversas especies vegetales que bajas tasas de aireación (0.1-0.3 vvm) son adecuadas para el crecimiento óptimo de la raíz y la producción de compuestos bioactivos (Shin *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2009). También se evaluó el desempeño de diferentes líneas de raíces, transformadas y no transformadas, y evaluar su influencia sobre la acumulación de biomasa, se utilizaron las líneas transformadas M5R4 (C), SRSDXS (A) y la línea no transformada de fenotipo silvestre (B). Los resultados determinaron que el tipo de raíz no influyó significativamente en la acumulación de biomasa, esto muy probablemente debido al corto periodo de la cinética. Calderón-Gabriel (2018) y Jiménez-Brigada (2018) reportaron diferencias en la velocidad de crecimiento de los cultivos evaluados en este estudio, línea M5R4 y SRSDXS respectivamente, en tiempos de cultivo superiores a 15 días. Probablemente la falta de efecto del tipo de cultivo en este experimento, con las mismas líneas, se debió a que los cultivos no pudieron pasar de la fase de adaptación durante el período de 7 días de cultivo, comportamientos similares fueron observados por los autores antes citados.

Por otro lado, el comportamiento de un cultivo crecido en biorreactor puede variar según el tipo de sistema y especie de planta. Están reportados estudios de raíces de diferentes especies crecidas en sistemas *airlift*; Liu *et al.*, (1998) reportaron que los cultivos de raíces de *Artemisia annua* en biorreactor *airlift* mostraron crecimiento rápido, y que alcanzaron el peso máximo y la producción de artemisinina en el día 20 de cultivo, también estudiaron el efecto de la velocidad de aireación (0.4 a 1.6 vvm) sobre el crecimiento y la acumulación de artemisinina en los cultivos de raíces transformadas, los cuales aumentaron con la elevación de flujo de aire, por lo que utilizaron tasas de aireación altas para obtener la máxima producción de biomasa y artemisinina, y añadieron que las posibles razones de los resultados obtenidos en *A. annua* se debe a que el aumento del flujo de aire mejora la transferencia de nutrientes del medio y el abastecimiento de oxígeno dentro de los cultivos de raíces en la etapa de crecimiento

tardía. Shin *et al.*, (2002) reportaron que cultivos de raíces transformadas de *Beta vulgaris* crecidas en biorreactor *airlift* tipo cono durante 15 días, alcanzaron su biomasa máxima seca. También probaron el efecto de distintas tasas de aireación sobre el crecimiento y la acumulación de betacianina en las raíces, donde la acumulación de betacianina fue mayormente afectada que el rendimiento celular, y la mayor cantidad se obtuvo en los cultivos aireados a 0.3 vvm. Estudios como los citados anteriormente muestran, al igual que los obtenidos en este trabajo, que los cultivos vegetales responden de manera diferente a las condiciones de cultivo en biorreactor, pero existen efectos positivos sobre el crecimiento y acumulación de metabolitos.

Wu *et al.*, (2014) observaron que una densidad de inóculo de 5.0 g/L y una velocidad de aireación de 0.1 vvm eran condiciones adecuadas para la producción de hipericina. Retomando los resultados obtenidos del comportamiento de los factores utilizados en el presente experimento, estos proponen que una densidad de inóculo de 10 g/L de peso fresco es apropiada para la acumulación de biomasa. Además, que fue el único factor que tuvo un efecto significativo particularmente sobre la acumulación de biomasa.

En términos generales los cultivos transformados y no transformados en los biorreactores *airlift* mostraron crecimiento, sin embargo, debido a que fue un periodo de crecimiento corto no se obtuvo un perfil cinético amplio del comportamiento de las raíces que permitiera realizar una comparación con los cultivos crecidos en matraces agitados. Se considera, que bajo condiciones de crecimiento optimizadas como la densidad de inóculo de 10 g/L, velocidades de aireación menores a 0.5 vvm y un tiempo de crecimiento relativamente amplio puede mejorar de forma significativa los rendimientos de biomasa y acumulación de MS en las raíces de *Stevia*.

### 8.5 Acumulación de fenoles totales en raíces transformadas M5R4, SRSDXS y no transformadas de *Stevia rebaudiana*.

Con fines comparativos se determinó la acumulación de compuestos fenólicos en extractos de raíces transformadas y no transformadas crecidas en matraz, después de 15 días de cultivo (Tabla 11).

**Tabla 11.** Contenido de fenoles en cultivos en matraz de raíces transformadas M5R4, SRSDXS y no transformada de *Stevia rebaudiana* a 15 días.

Tipo de raíz	Contenido de Fenoles totales (mg AG/g EF)
M5R4	20±1.0 <sup>B</sup>
SRSDXS	32±4.0 <sup>A</sup>
No transformada	38±1.0 <sup>A</sup>

Nota: La denotación de letras representa la agrupación dada por Tukey  $p > 0.05$  (n=3), "A" fue el cultivo que fue diferente significativamente y con mayor efecto.

Por otro lado, se realizó la cuantificación de fenoles de los tratamientos de raíces cultivadas en biorreactor a 7 días.

**Tabla 12.** Contenido de fenoles totales de tratamientos de raíces transformadas M5R4 (C), SRSDXS (A) y no transformadas de *Stevia rebaudiana* (B) en reactor *airlift*.

Tratamiento	Contenido de Fenoles totales (mg AG/g EF)
T1(A)	5.94±0.01 <sup>A</sup>
T2(B)	26.99±0.02 <sup>A</sup>
T3(C)	25.89±0.03 <sup>A</sup>
T4(B)	11.37±0.01 <sup>A</sup>
T5(C)	26.27±0.01 <sup>A</sup>
T6(A)	20.49±0.04 <sup>A</sup>
T7 (C)	11.72±0.02 <sup>A</sup>
T8 (A)	34.18±0.03 <sup>A</sup>
T9 (B)	24.01±0.01 <sup>A</sup>

Nota: Las letras A, B, C son las familias que arroja Tukey, donde las medias que no comparten la misma letra son diferentes significativamente, y donde la agrupación A es la que tiene mayor efecto (Tukey  $p < 0.05$  (n=3)).

En los cultivos en matraz a 15 días, las raíces no transformadas acumularon  $8 \pm 1.0$  mg AG/g EF de fenoles siendo 1.18 y 1.9 veces más respecto a las líneas SRSDXS y M5R4, lo cual indica que probablemente las condiciones de cultivo induzcan condiciones de estrés más severas sobre los cultivos no transformados que sobre los transformados. Resultados donde el entorno de crecimiento influyó sobre la acumulación de metabolitos secundarios fueron observados por Weremczuk-Jeżyna *et al.*, (2016), en raíces transformadas de *Dracocephalum forrestii* donde una composición de medio suplementado con 3% de sacarosa y un periodo de cultivo de 30 días mostró la mayor producción de compuestos fenólicos respecto a la línea sin transformar. Por otra parte, la luz puede también influir sobre el comportamiento de cultivos vegetales. Idrees *et al.*, en 2018 reportaron que la mayor acumulación de fenoles (6.56 mg AG/g-PS) en raíces adventicias de *Stevia rebaudiana* ocurrió con una luz espectral azul a diferencia de las otras. En lo que respecta a la temperatura. Kumari y Chandra, (2017) informaron que una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  fue óptima para el incremento de biomasa y no afectó de manera significativa la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana*. En relación a la agitación, el oxígeno disuelto en cultivos vegetales es de suma importancia para el crecimiento de tejido y la acumulación de compuestos bioactivos sin embargo en el caso de raíces transformadas de *Brugmansia candida* los cultivos que no fueron sometidos a agitación mostraron mayor desempeño para la producción de alcaloides que los cultivos agitados (Pitta-Alvarez y Giulietti, 2001). Referente a las cinéticas en reactor, como se mencionó en la sección anterior, no hubo diferencias significativas en la acumulación; sin embargo, la línea SRSDXS en el tratamiento T8 (A) tuvo una mayor acumulación de compuestos fenólicos  $34.18 \pm 0.03$  mg AG/g EF que fue 1.66 y 5.75 respecto a T6 (A), T1(A). Para la línea M5R4 el T5(C) produjo la mayor cantidad de fenoles  $26.27 \pm 0.01$  mg AG/g EF que fue 1.01 y 2.24 veces más que el T3(C); T7(C). Concerniente a la línea no transformada el T2 (B) acumuló  $26.99 \pm 0.02$  mg AG/g EF 1.12, 2.37 veces mayor que T9 (B) y T4 (B). Calderón (2018) reportó que los cultivos de raíces de *Stevia* en medio semisólido acumularon la más alta concentración de fenoles totales ( $0.72 \pm 0.15$  mg

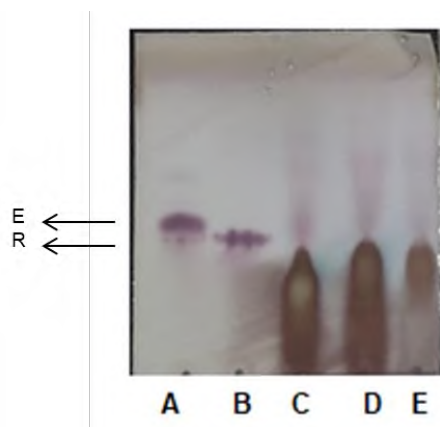
ECq/mgExt), añadió que los cultivos no transformados en sistema de crecimiento RITA y los cultivos transformados M5R4 crecidos en matraces agitados no tuvieron diferencia significativa en la acumulación de fenoles. Los cultivos en matraz, no transformados acumularon mayor cantidad de fenoles y los cultivos transformados tuvieron una acumulación de compuestos fenólicos mayor en biorreactor. Alvarado (2017) informó que el contenido de fenoles en raíces de *S. rebaudiana* desde el día de cultivo 1 aumentó 0.35 veces más que el cultivo control (546.09  $\mu\text{g}_{\text{ECq}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$ ) cabe mencionar que adicionó  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Y al aumentar la concentración incrementó la acumulación de fenoles en el día 5 de cultivo que fue 0.42 veces más respecto al control (421.93  $\mu\text{g}_{\text{ECq}}/\text{mg}_{\text{Ext}}$ ). Realizando una comparación de las líneas utilizadas, el contenido de fenoles totales fue con la línea SRSDXS del tratamiento T8 (A)  $34.18 \pm 0.03 \text{ mg AG/g EF}$  que es 1.26 y 1.30 veces superior que los tratamientos que produjeron más; línea no transformada T2 (B)  $26.99 \pm 0.02 \text{ mg AG/g EF}$ ; línea M5R4 T5(C)  $26.27 \pm 0.01 \text{ mg AG/g EF}$ .

En lo que respecta a otras especies y el efecto de factores similares sobre acumulación de metabolitos de interés, Kintzios *et al.*, (2004) obtuvieron una acumulación mayor ( $p < 0.00001$ ) de puerarina en los cultivos de tres semanas de raíces transformadas de *Pueraria phaseoloides* en biorreactor *airlift* de 2.5 L que fue 200 veces más que en cultivos de matraces agitados. Wu *et al.*, (2007) determinaron que las raíces adventicias de *Echinacea purpurea* cultivadas en biorreactores *airlift* a escala piloto aireados a 0.1 vvm no presentaron disminución en la producción de biomasa ni en la productividad de los derivados de ácido caféico en comparación con los cultivos en biorreactor *airlift* de 20 L. Jeong *et al.*, (2009) encontraron en cultivos de raíces adventicias de *Echinacea purpurea* cultivadas en reactor *airlift* durante 7 semanas de cultivo, que una densidad de inóculo de 7 g/L PF y una velocidad de aireación de 0.1 vvm era ideal para una acumulación óptima de biomasa y de compuestos fenólicos y flavonoides. Abbasi *et al.*, (2009) evaluaron el comportamiento de cultivos de raíces transformadas de *Echinacea purpurea* en biorreactor *airlift* con una velocidad de aireación de 0.14 vvm y concluyeron que era la adecuada para la acumulación de biomasa y producción de ácido cicórico. Cui *et al.*, (2013) encontraron que algunas de las

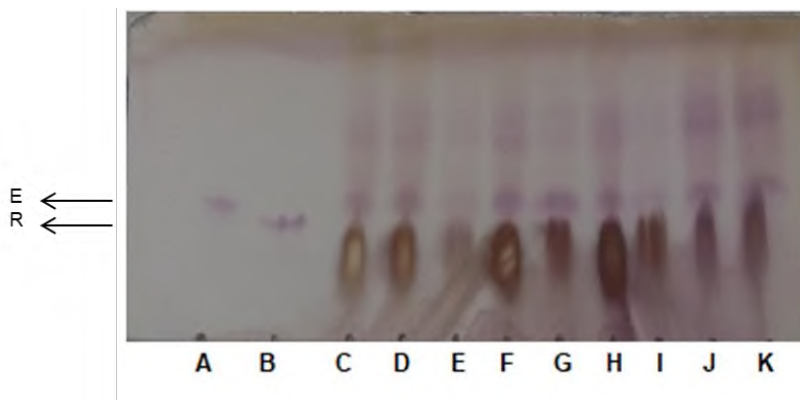
condiciones óptimas para la generación de biomasa y la producción de compuestos derivados de ácido caféico en cultivos de raíces adventicias de *Echinacea angustifolia* en biorreactor *airlift* es; una densidad de inóculo de 7 g/L PF y una velocidad de aireación de 0.1 vvm.

## 8.6 Perfiles de acumulación de Glucósidos de esteviol por TLC

El seguimiento de los glucósidos de esteviol de las muestras provenientes de los cultivos en matraz y en biorreactor se realizó hasta el momento de manera cualitativa por cromatografía en capa fina. Se puede observar en las imágenes 39 y 40 la presencia de compuestos glucosidados con una distintiva coloración morada en las regiones de migración de los compuestos estándares.



**Figura 39.** Cromatografía en capa fina de extractos de raíces de *Stevia* en matraz Carril A: Estándar de esteviósido B: Estándar de rebaudiósido C: Extracto de NT D: Extracto de M5R4 E: Extracto de SRSDXS.



**Figura 40.** Cromatografía en capa fina de extractos de raíces de *Stevia* en reactor. Carril A: Estándar de esteviósido, B: Estándar de rebaudiósido, C: Extracto de M5R4 (T-3), D: Extracto de M5R4 (T-5), E: Extracto de M5R4(T-7), F: Extracto de NT (T-2), G: Extracto de NT (T-4), H: Extracto de NT (T9), I: Extracto de SRSDXS (T-1), J: Extracto de SRSDXS (T-6), K: Extracto de SRSDXS (T8).

Solo se pudo determinar cualitativamente la presencia de glucósidos de esteviol en las muestras, sin embargo, la calidad en la definición de las placas cromatográficas y/o la calidad de los extractos no permitió hacer una cuantificación.

Resultados como los reportados por Jiang *et al.*, (2015) usando raíces adventicias de *Oplopanax elatus* cultivadas en biorreactor *airlift* tipo balón, tuvieron un comportamiento superior en el crecimiento de biomasa y en la acumulación de compuestos bioactivos en comparación con cultivos sólidos y en matraz agitado en el día 40 de cultivo. Además, Song *et al.*, (2017) reportaron que en raíces adventicias de *Panax ginseng* crecidas en un biorreactor *airlift* de 5 L, mantenido con una velocidad de aireación de 0.02 vvm, el contenido de ginsenósidos aumentó en el día 9 de la fermentación.

## 9. CONCLUSIONES

Las raíces transformadas crecieron significativamente mejor en medio MS a mitad de sales basales con vitaminas respecto a las otras condiciones cuando se comparó su acumulación de biomasa, índice de crecimiento y conductividad.

De los tratamientos en biorreactor se obtuvo efecto significativo con el factor de densidad de inóculo sobre la acumulación de biomasa y ligeramente sobre la producción de fenoles, mientras que los demás factores resultaron ser no significativos.

.

## 10. RECOMENDACIONES

Hacer adecuaciones al diseño de reactor para evitar la pérdida de medio y la presurización del contenedor, para tener mejor control sobre la contaminación que permita realizar cinéticas más largas.

Las modificaciones propuestas son las siguientes:

Diseñar e implementar sellos que mantengan firmemente cerrados los reactores y que soporten presiones mínimas internas de aire correspondientes a 2 vvm.

Modificar las tapas de los biorreactores para aumentar el diámetro del puerto de venteo y separarlos del puerto de toma de muestra.

Reducir la longitud de los tubos de toma de muestra.

## 11. PERSPECTIVAS

Cuantificar los glucósidos de esteviol de los extractos obtenidos de los tratamientos en matraz y en biorreactor por HPLC o espectrometría de masas.

Validar los efectos encontrados en este estudio usando un sistema de biorreactor *airlift* implementando los cambios de diseño sugeridos en este estudio.

Probar diferentes configuraciones en biorreactor, como biorreactor agitado con canastilla o de nebulización.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Abbasi, B. H., Liu, R., Saxena, P. K., & Liu, C. Z. (2009). Cichoric acid production from hairy root cultures of *Echinacea purpurea* grown in a modified *airlift* bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(11), 1697-1701.
- Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A., & Abu-Salem, M. F. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4(5), 269-281.
- Alvarado-Orea, Itzel Vianney, Montes-Palmeros Mauro, Vera-Reyes Ileana, Lira-Saldívar Ricardo Hugo, Pavón-Orozco Patricia, Huerta-Heredia Ariana Arlene (2016). Producción de glucósidos de esteviol a partir de raíces in vitro de *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Mexican Journal of Biotechnology*,
- Alvarado-Orea, I. V. (2017). Respuesta enzimática y no enzimática en cultivo de raíces de *Stevia rebaudiana* (Tesis de Maestría, Tuxtepec Oaxaca: Universidad del Papaloapan).
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., ... & Lemaux, P. G. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, 28(7), 1510-1520.
- Angelini, L. G., Martini, A., Passera, B., & Tavarini, S. (2018). Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and associated challenges. *Sweeteners: Pharmacology, Biotechnology, and Applications*, 35-85.
- Barba, F.J., Grimi, N., Vorobiev, E. (2014). Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves, *Journal of Food Engineering*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.028>
- Barriocanal, L. A., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J. T., Jimenez, N., & Rojas, V. (2008). Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 51(1), 37-41.
- Bertoni, M. S. (1905). Le Ka'a he'e Sa nature et ses proprietes. *An. Cient. Paraguay Ser. I*, 5(1).

- Blanco, M., & Valverde, R., & Gómez, L. (2003). Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense*, 27 (1), 19-28.
- Bondarev, N., Reshetnyak, O., & Nosov, A. (2001). Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science*, 161(1), 155-163.
- Brandle, J.E., A.N. Starratt, and M. Gijzen. 2000. *Stevia rebaudiana*: its biological, chemical and agricultural properties. Retrieved June 28, 2000, from [http://res2.agr.ca/london/pmrc/faq/stevia\\_rev.html](http://res2.agr.ca/london/pmrc/faq/stevia_rev.html).
- Brandle, J. E., & Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14), 1855-1863.
- Bradley, (2016). Biorreactores para células vegetales y animales. <https://slideplayer.com/slide/10633574/>
- Briedel, M., & Lavieille, R. (1931). Le principe a saveur sucre du Ka'a he'e (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris*, 13, 636-655.
- Caicedo, L., Sierra, J., & Hoyos, H. (1998). Estudio comparativo de cuatro sistemas de propagación de levadura cervecera por lote alimentado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(1), 51-56.
- Calderón-Gabriel, Luz, Jiménez -Brigada Adriana, Huerta -Heredia Ariana Arlene, Capataz-Tafur Jacqueline, García-López Edgar. (2016). Effect of three strains of *Agrobacterium rhizogenes* and explant type on genetic transformation of *Stevia rebaudiana*, *Mexican Journal of Biotechnology*, 1(1):34-41.
- Calderón-Gabriel, L. (2018). Establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* con fenotipo silvestre y su crecimiento en biorreactor (Tesis de Maestría, Tuxtepec Oaxaca: Universidad del Papaloapan).
- Camarena-Rangel, N. G., Barba-De la Rosa, A. P., Herrera-Corredor, J. A., & del Socorro Santos-Díaz, M. (2017). Enhanced production of metabolites by elicitation in *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia megacantha*, and *Opuntia streptacantha* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(2), 289-298.

- Carakostas, M. C., Curry, L. L., Boileau, A. C., & Brusick, D. J. (2008). Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), S1-S10.
- Chaovanalikit, A., y Wrolstad, R. (2004). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Food Chemistry and Toxicology*, 69, pp. 67–72
- Condori, J., Sivakumar, G., Hubstenberger, J., Dolan, M. C., Sobolev, V. S., & Medina-Bolivar, F. (2010). Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 310-318.
- Contreras, M. S. (2013). Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Narrative review. *Journal of Oral Research*, 2(3), 158-166.
- Cui, X. H., Murthy, H. N., Wu, C. H., & Paek, K. Y. (2010). Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(5), 437-444.
- Cui, H. Y., Baque, M. A., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2013). Scale-up of adventitious root cultures of *Echinacea angustifolia* in a pilot-scale bioreactor for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *Plant biotechnology reports*, 7(3), 297-308.
- Curi, R., Alvarez, M., Bazotte, R. B., Botion, L. M., Godoy, J. L., & Bracht, A. (1986). Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance. in normal adult humans. *braz. j. med. biol. res.*
- Curtis WR (2000) Hairy roots, bioreactor growth. In: Spier RE (ed) *Encyclopedia of cell technology*, vol 2. Wiley, New York, pp 827–841
- Dacome, A. S., Da Silva, C. C., Da Costa, C. E., Fontana, J. D., Adelman, J., & Da Costa, S. C. (2005). Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry*, 40(11), 3587-3594.

- Dan Sun, Changyu Li, Hongyan Qin, Qingtian Zhang, Yiming Yang and Jun Ai (2016). Somatic Embryos Cultures of *Vitis amurensis* Rupr. in *Air-lift Bioreactors for the Production of Biomass and Resveratrol*, Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China
- Das, K., Dang, R., Khanam, S., Shivananda, B. G., & Rajasekharan, P. E. (2005). *In vitro* methods for production of stevioside from *stevia rebaudiana*. Indian J. Nat. Prod, 21(1), 14-15.
- Das, J., Bora, S., Das, M., & Pathak, P. (2018). A Review on *in vitro* Culture of Aloe vera, Type of Explants and Impact of Growing Media and Growth Regulators. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 7(6), 3473-3489.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry, 28, 350-356.
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta, 248(1), 1-18.
- Eibl, R., & Eibl, D. (2008). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. Phytochemistry Reviews, 7(3), 593-598.
- Familletti, P. C. (1987). U.S. Patent No. 4,649,117. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Fu, X., Yin, Z. P., Chen, J. G., Shangguan, X. C., Wang, X., Zhang, Q. F., & Peng, D. Y. (2014). Production of chlorogenic acid and its derivatives in hairy root cultures of *Stevia rebaudiana*. Journal of agricultural and food chemistry, 63(1), 262-268.
- Gantait, S., Das, A., & Mandal, N. (2015). *Stevia*: a comprehensive review on ethnopharmacological properties and *in vitro* regeneration. Sugar Tech, 17(2), 95-106.
- Ghanta, S., Banerjee, A., Poddar, A., & Chattopadhyay, S. (2007). Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. Journal of agricultural and food chemistry, 55(26), 10962-10967.

- García, López. E., Ramírez, E. G. R., Gúzman, O. G., Calva, G. C., Ariza-Castolo, A., Pérez-Vargas, J., & Rodríguez, H. G. M. (2014). MALDI-TOF characterization of hGH1 produced by hairy root cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* grown in an *airlift* with mesh bioreactor. *Biotechnology progress*, 30(1), 161-171.
- Gardana, C., Scaglianti, M., & Simonetti, P. (2010). Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1217(9), 1463-1470.
- Georgiev, M. I., & Weber, J. (2014). Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. *Biotechnology letters*, 36(7), 1359-1367.
- González-Moralejo, S. A. (2011). Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la *Stevia rebaudiana* Bertoni: producción, consumo y demanda potencial. *Agroalimentaria*, 17(32), 57-69.
- Habibi, P., Soccol, C. R., & Grossi-de-Sa, M. F. (2018). Hairy Root-Mediated Biotransformation: Recent Advances and Exciting Prospects. In *Hairy Roots* (pp. 185-211). Springer, Singapore.
- HACC. (2011). *Stevia rebaudiana*. Huerta agroecológica comunitaria cantarranas. Obtenido de <https://www.flickr.com/people/huertoagroecologicoucm/>.
- Häkkinen, S. T., & Oksman-Caldentey, K. M. (2018). Progress and Prospects of Hairy Root Research. In *Hairy Roots* (pp. 3-19). Springer, Singapore.
- He, X., Li, Y., Lawson, D., & Xie, D. Y. (2017). Metabolic engineering of anthocyanins in dark *tobacco* varieties. *Physiologia plantarum*, 159(1), 2-12.
- Idrees, M., Sania, B., Hafsa, B., Kumari, S., Khan, H., Fazal, H., ... & Ahmad, N. (2018). Spectral lights trigger biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Comptes rendus biologiques*, 341(6), 334-342.
- Jarma de Jesús, A., Miguel Combatt, E., & Cleves, J. A. (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 199.
- Javed, R., Zia, M., Yücesan, B., & Gürel, E. (2017). Abiotic stress of ZnO-PEG, ZnO-PVP, CuO-PEG and CuO-PVP nanoparticles enhance growth, sweetener compounds and antioxidant activities in shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *IET Nanobiotechnology*, 11(7), 898-902.

- Jeong, C. S., Chakrabarty, D., Hahn, E. J., Lee, H. L., & Paek, K. Y. (2006). Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), 252-263.
- Jeong, J. A., Wu, C. H., Murthy, H. N., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2009). Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(1), 91-98.
- Jiang, Y. J., Piao, X. C., Liu, J. S., Jiang, J., Lian, Z. X., Kim, M. J., & Lian, M. L. (2015). Bioactive compound production by adventitious root culture of *Oplopanax elatus* in balloon-type airlift bioreactor systems and bioactivity property. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123(2), 413-425.
- Jiménez-Brigada, A. (2018). Efecto de la sobreexpresión de 1- desoxixilulosa-5-fosfato sintasa modificada en raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* sobre la producción de glucósidos de esteviol (Tesis de Maestría, Tuxtepec Oaxaca: Universidad del Papaloapan).
- Kanokwaree, K., & Doran, P. M. (1997). Effect of inoculum size on growth of *Atropa belladonna* hairy roots in shake flasks. *Journal of fermentation and bioengineering*, 84(4), 378-381.
- Kaur, L. (2018). Studies on the induction of hairy roots in *Stevia rebaudiana* Bertoni (Doctoral dissertation).
- Kaur, K., & Pati, P. K. (2018). Stress-Induced Metabolite Production Utilizing Plant Hairy Roots. In *Hairy Roots* (pp. 123-145). Springer, Singapore.
- Khan, S. A., Siddiqui, M. H., & Osama, K. (2018). Bioreactors for Hairy Roots Culture: A Review. *Current Biotechnology*, 7(6), 417-427.
- Kinghorn, A. D., & Soejarto, D. D. (1985). Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. *Economic and medicinal plant research*/edited by H. Wagner, Hiroshi Hikino, Norman R. Farnsworth.
- Kintzios, S., Makri, O., Pistola, E., Matakidiadis, T., Shi, H. P., & Economou, A. (2004). Scale-up production of puerarin from hairy roots of *Pueraria phaseoloides* in an airlift bioreactor. *Biotechnology letters*, 26(13), 1057-1059.

- Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K., & Tanaka, O. (1976). New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, 15(6), 981-983.
- Kumar, A. (2015). Metabolic engineering in plants. In *Plant Biology and Biotechnology* (pp. 517-526). Springer, New Delhi.
- Kumar, N., & Reddy, M. P. (2011). In vitro plant propagation: a review. *Journal of forest and environmental science*, 27(2), 61-72.
- Kumari, M., & Chandra, S. (2017). Secondary Metabolite Production in Transformed Cultures: Stevioside Glycosides Production from *Stevia rebaudiana* Hairy Root Cultures. *Transgenesis and Secondary Metabolism*, 103-121.
- Kwok, K. H., & Doran, P. M. (1995). Kinetic and stoichiometric analysis of hairy roots in a segmented bubble column reactor. *Biotechnology progress*, 11(4), 429-435.
- Largia, M. J. V., Pothiraj, G., Shilpha, J., & Ramesh, M. (2015). Methyl jasmonate and salicylic acid synergism enhances bacoside A content in shoot cultures of *Bacopa monnieri* (L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(1), 9-20.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food chemistry*, 132(3), 1121-1132.
- Liu, C., Wang, Y., Guo, C., Ouyang, F., Ye, H., & Li, G. (1998). Enhanced production of artemisinin by *Artemisia annua* L hairy root cultures in a modified inner-loop *airlift* bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 19(5), 389-392.
- Liu, C. Z., Abbasi, B. H., Gao, M., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (2006). Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(22), 8456-8460.
- Liu, Z. B., Chen, J. G., Yin, Z. P., Shangguan, X. C., Peng, D. Y., Lu, T., & Lin, P. (2018). Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation increase content and yield of chlorogenic acid and its derivatives in *Gardenia jasminoides* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-15.

- Londhe, S. V., & Nanaware, S. M. (2013). HPTLC method for simultaneous analysis of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana*. *Journal of AOAC International*, 96(1), 24-26.
- Madanakumar AJ, Kumaraswamy M. Purified Anthocyanin, its Elicitation from Cell Cultures of *Begonia malabarica* and *Begonia rex* - cultorum 'Baby Rainbow' and its *In vitro* Cytotoxicity Analysis by MTT Assay. *Pharmacog J.* (2018);10(3):553-8
- Maki, K. C., Curry, L. L., Reeves, M. S., Toth, P. D., McKenney, J. M., Farmer, M. V., & Carakostas, M. C. (2008). Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), S47-S53.
- Martínez Cruz, M. (2015). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. *Cultivos Tropicales*, 36, 5-15.
- Mehrotra, S., Mishra, S., & Srivastava, V. (2016). Bioreactor technology for hairy roots cultivation. *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*, 1-25.
- Modi, A., & Kumar, N. (2018). Conventional and Biotechnological Approaches to Enhance Steviol Glycosides (SGs) in *Stevia rebaudiana* Bertoni. In *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants* (pp. 53-62). Springer, Singapore.
- Montgomery D, C. (2004). Design and analysis of experiments. Diseños y análisis de experimentos. Limusa Willey. Segunda edición.
- Moreno Andrade, A. E., Cuervo Andrade, J., & Sánchez Leal, L. C. (2013). Análisis de la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B. en condiciones de invernadero en la Sabana de Bogotá.
- Mthembu, Z. (2017). Development of a hairy root bioreactor from *Stevia rebaudiana* to produce steviol glycosides (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Hong, S., Jang, M. O., Jin, Y. W., Lee, E. K., & Loake, G. J. (2016). Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB reports*, 49(3), 149.

- Paek, K. Y., Hosakatte, N. M., & Zhong, J. J. (Eds.). (2014). Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology. Springer.
- Pandey, H., Pandey, P., Pandey, S. S., Singh, S., & Banerjee, S. (2016). Meeting the challenge of stevioside production in the hairy roots of *Stevia rebaudiana* by probing the underlying process. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(3), 511-521.
- Pavlov, A., Georgiev, V., & Ilieva, M. (2005). Betalain biosynthesis by red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy root culture. *Process Biochemistry*, 40(5), 1531-1533.
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4).
- Philippe, R. N., De Mey, M., Anderson, J., & Ajikumar, P. K. (2014). Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 155-161.
- Piñeros-Castro, Y., Otálvaro-Álvarez, Á., & Velásquez-Lozano, M. (2009). Efecto de la aplicación de elicitores sobre la producción de 4βhidroxiwithanólido E, en raíces transformadas de *Physalis peruviana* L. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 23-28.
- Pitta-Alvarez, S. I., & Giulietti, A. M. (2001). Hairy roots of *Brugmansia candida* that grow without agitation: Biotechnological implications. *Biotechnology progress*, 17(4), 661-663.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J., & Tiwary, A. K. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 132(3), 1113-1120.
- Quintero Ramírez, R. (1981). Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones. Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones. Alhambra Mexicana.
- Ramesh, K., Singh, V., & Ahuja, P. S. (2007). Production potential of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. under intercropping systems. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 53(4), 443-458.
- Reis, R. V., Borges, A. P. P. L., Chierrito, T. P. C., de Souto, E. R., de Souza, L. M., Iacomini, M., ... & Gonçalves, R. A. C. (2011). Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(2), 329-335.

- Rodríguez Arévalo, A. C. (2003). Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 24(1), 55-70.
- Rodríguez Monroy, M., Orozco Sánchez, F. (2015). Caracterización, operación y escalado de biorreactores. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 218 páginas.
- Sajc, L., Grubisic, D., & Vunjak-Novakovic, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 4(2), 89-99.
- Salvador-Reyes, R., Sotelo-Herrera, M., & Paucar-Menacho, L. (2014). Estudio de la *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria*, 5(3), 157-163.
- Sánchez, F. O., Sánchez, R. H., & Zabala, M. E. A. (2002). Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 55(1), 1473-1495.
- Sanches-Lopes, M. S., Francisco, M. G., Higashi, B., de Almeida, R. T. R., Krausová, G., Pilau, E. J., ... & de Oliveira, A. J. B. (2016). Chemical characterization and prebiotic activity of fructo-oligosaccharides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) roots and *in vitro* adventitious root cultures. *Carbohydrate polymers*, 152, 718-725.
- Seca, A., & Pinto, D. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 263.
- Shibli, R. A., Mohammad, M. J., Ajlouni, M. M., Shatnawi, M. A., & Obeidat, A. F. (1999). Stability of chemical parameters of tissue culture medium (pH, osmolarity, electrical conductivity) as a function of time of growth. *Journal of plant nutrition*, 22(3), 501-510.
- Shin, K. S., Murthy, H. N., Ko, J. Y., & Paek, K. Y. (2002). Growth and betacyanin production by hairy roots of *Beta vulgaris* in *airlift* bioreactors. *Biotechnology letters*, 24(24), 2067-2069.
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Firoz, M., & Al-Khaishany, M. Y. (2015). Role of nanoparticles in plants. In *Nanotechnology and Plant Sciences* (pp. 19-35). Springer, Cham.

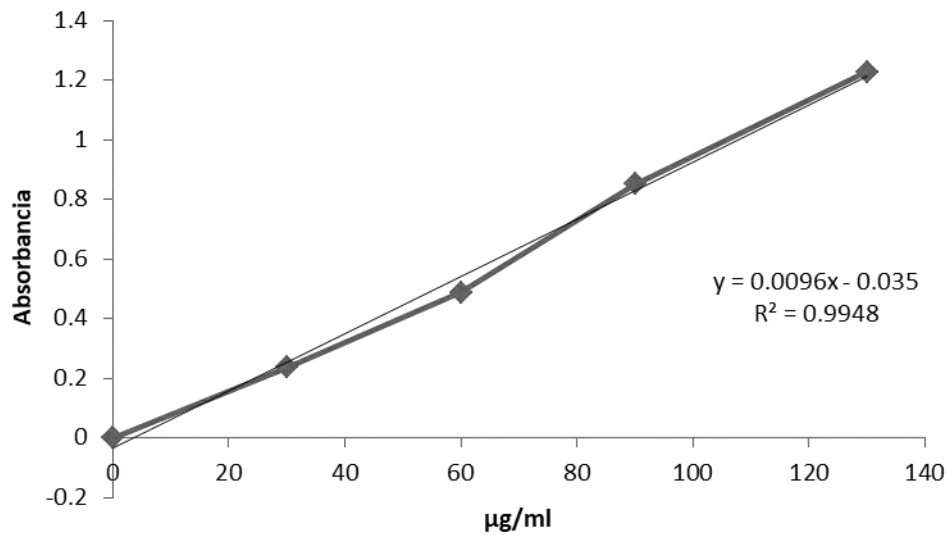
- Singh, R. S., Chattopadhyay, T., Thakur, D., Kumar, N., Kumar, T., & Singh, P. K. (2018). Hairy Root Culture for *In Vitro* Production of Secondary Metabolites: A Promising Biotechnological Approach. In *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants* (pp. 235-250). Springer, Singapore.
- Singleton V. L., Orthofe R., Lamuela-Raventos R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Sivakumar, G., Liu, C., Towler, M. J., & Weathers, P. J. (2010). Biomass production of hairy roots of *Artemisia annua* and *Arachis hypogaea* in a scaled-up mist bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 107(5), 802-813.
- Song, X., Wu, H., Piao, X., Yin, Z., & Yin, C. (2017). Microbial transformation of ginsenosides extracted from Panax ginseng adventitious roots in an *airlift* bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 26, 20-26.
- Sun, D., Li, C., Qin, H., Zhang, Q., Yang, Y., & Ai, J. (2016). Somatic embryos cultures of *Vitis amurensis* Rupr. in *air-lift* bioreactors for the production of biomass and resveratrol. *Journal of Plant Biology*, 59(5), 427-434.
- Suresh, B., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., & Ravishankar, G. A. (2004). Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments. *Process Biochemistry*, 39(12), 2091-2096.
- Suzuki, H., Kasai, T., Sumihara, M., & Sugisawa, H. (1977). Influence of oral administration of stevioside on levels of blood glucose and liver glycogen of intact rats. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*.
- Tang, K., & Pan, Q. (2017). Strategies for enhancing alkaloids yield in *Catharanthus roseus* via metabolic engineering approaches. In *Catharanthus roseus* (pp. 1-16). Springer, Cham.
- Thiruvengadam, M., Rekha, K., & Chung, I. M. (2016). Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. willd) for the assessment of phenolic compounds and biological activities. *Scientia horticultrae*, 198, 132-141.
- Trejo-Tapia, G., & Rodríguez-Monroy, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia*, 32(10).

- Tzfira T; Citovsky V. (2006) Current *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. 17:147–154.
- V. H., & Subhash, R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. Journal of Food Composition and Analysis, 20(3), 323-329.
- Wahby I. (2007) Aproximaciones biotecnológicas tendentes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa* L.): obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración *in vitro*. Tesis de Maestría, departamento de fisiología vegetal facultad de farmacia universidad de granada.
- Weremczuk-Jeżyna, I., Skała, E., Olszewska, M. A., Kiss, A. K., Balcerczak, E., Wysokińska, H., & Kicel, A. (2016). The identification and quantitative determination of rosmarinic acid and salvianolic acid B in hairy root cultures of *Dracocephalum forrestii* WW Smith. Industrial Crops and Products, 91, 125-131.
- Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A., & Wüst, M. (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. European Food Research and Technology, 231(4), 581588.
- Wood JR, H. B., Allerton, R., Diehl, H. W., & Fletcher Jr, H. G. (1955). Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. The Journal of Organic Chemistry, 20(7), 875-883.
- Wood JR, H. B., & Fletcher Jr, H. G. (1956). Stevioside. III. The Anomeric 2, 3, 4, 6-Tetra-O-acetyl-1-O-mesitoyl-D-glucopyranoses and their Behavior with Alkali<sup>1</sup>, 2. Journal of the American Chemical Society, 78(1), 207-210.
- Wu, C.H., Dewir, Y.H., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. J. Plant Biol. 49, 193–199.
- Wu, C. H., Murthy, H. N., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007). Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in *airlift* bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid. Biotechnology letters, 29(8), 1179-1182.
- Wu, S. Q., Yu, X. K., Lian, M. L., Park, S. Y., & Piao, X. C. (2014). Several factors affecting hypericin production of *Hypericum perforatum* during adventitious root culture in *airlift* bioreactors. Acta physiologiae plantarum, 36(4), 975-981

- X.H. Cui, D. Chakrabarty, E.J. Lee, K.Y. Paek. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresour Technol*, 101 (2010), pp. 4708-4716.
- Yamazaki, T., Flores, H. E., Shimomura, K., & Yoshihira, K. (1991). Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Products*, 54(4), 986-992.
- Yang, Y., Huang, S., Han, Y., Yuan, H., Gu, C., & Wang, Z. (2015). Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 174-180.

## 13. ANEXOS

### Anexo 1. Curva patrón de sacarosa



### Anexo 2. Análisis de varianza

Tabla de Análisis de varianza de los factores: Tipo de cultivo, velocidad de aireación y densidad de inóculo, sobre la acumulación de biomasa.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tipo de cultivo	2	0.015	0.007	0.54	0.650
Velocidad de aireación	2	0.015	0.007	0.54	0.650
Densidad de inóculo	2	3.08	1.541	106.69	0.009
Error	2	0.02	0.014		
Total	8	3.14			

### **Anexo 3. Análisis de varianza**

Tabla de Análisis de varianza de los factores: Tipo de cultivo, velocidad de aireación y densidad de inóculo, sobre la acumulación de Fenoles.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Tipo de cultivo</b>	2	1.79	0.89	0.04	0.960
<b>Velocidad de aireación</b>	2	29.14	14.57	0.67	0.598
<b>Densidad de inóculo</b>	2	601.45	300.73	13.87	0.067
<b>Error</b>	2	43.37	21.69		
<b>Total</b>	8	675.75			

### **Anexo 4. Análisis de varianza**

Tabla de Análisis de varianza de los factores: Tipo de cultivo, velocidad de aireación y densidad de inóculo, sobre el consumo de sacarosa.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Tipo de cultivo</b>	2	2.49	1.25	0.06	0.944
<b>Velocidad de aireación</b>	2	12.44	6.22	0.30	0.770
<b>Densidad de inóculo</b>	2	16.02	8.01	0.38	0.723
<b>Error</b>	2	41.75	20.88		
<b>Total</b>	8	72.70			