

03088

6
Rej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DEL
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Efectos del estrés hidrodinámico sobre el
cultivo de células de *Beta vulgaris* en un
fermentador agitado mecánicamente”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

MARIO RODRÍGUEZ MONROY

Cuernavaca, Morelos, Junio de 1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

27 57 97



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la UNAM y en el Departamento de Biotecnología de Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN, bajo la dirección del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Se contó con el apoyo económico de los proyectos DGAPA/UNAM (IN-503295), DEPI/IPN (97069) y CONACyT(25165-B y 26405-N).

AGRADECIMIENTOS

- *Al Instituto Politécnico Nacional y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Cátedra Patrimonial de Excelencia nivel II, dentro del programa de apoyo a Profesores para Obtener el Doctorado) por el apoyo económico otorgado durante la realización del trabajo.*
- *Al Dr. Enrique Galindo F. por su acertada dirección y el apoyo brindado para la realización de este trabajo.*
- *A los Drs. Octavio T. Ramírez, Mario Rocha y Agustín López-Munguía miembros del comité tutorial, por sus críticas y comentarios que enriquecieron el trabajo.*
- *A los miembros del Jurado: Drs. Thelma Villegas, Ma. Luisa Villarreal, Gladys Cassab Federico Sánchez, Rafael Vázquez, Agustín López-Munguía y Enrique Galindo por sus comentarios.*
- *A la Dra. Gladys Cassab y a las M. en C. Edith García y Gabriela Sepúlveda por su valiosa asistencia para el análisis de los compuestos extracelulares.*
- *A la Biol. Lorena López por su asistencia para el análisis de viabilidad celular por microscopía.*
- *A todas aquellas personas que de una u otra forma me apoyaron, especialmente a los miembros del laboratorio 12 del Depto. de Bioingeniería y al M.en C. Matín Patiño del IBT, así como a los integrantes del laboratorio de CCV del CEPROBI.*
- *A mis padres (Margarita y Mario ♡) por su educación, cariño y confianza.*
- *Con cariño a mi esposa e hijos.*

CONTENIDO

	Pag
Indice de Figuras y Cuadros	i
Nomenclatura	iv
1.1.- Resumen	1
1.2.- Abstract	3
2.- Introducción	5
3.- Antecedentes	
3.1.- Papel del estrés hidrodinámico en cultivos celulares	7
3.2.- Mecánica de fluidos y parámetros de estrés hidrodinámico	12
3.3.- Sistemas experimentales usados para estudiar la resistencia de los cultivos ante condiciones de estrés hidrodinámico	16
3.4.- Estudios de reología de los caldos de células vegetales	23
3.5.- Cultivos de células de <i>B. vulgaris</i> para la producción de betalainas, como modelo biológico de estudio	27
4.- Recapitulación de la revisión de la literatura	31
5.- Objetivos	33
6.- Materiales y Métodos	34
7.- Resultados y discusión	
7.1.- Estudios de resistencia de los cultivos en el viscosímetro	41
7.2.- Presentación del artículo: Broth rheology, growth and metabolite production of <i>B.vulgaris</i> cultures conducted in shake flasks and in a stirred tank	46
7.3.- Desarrollo de los cultivos de células de <i>B. vulgaris</i> en un fermentador agitado mecánicamente a 700 rpm	73
7.4.- Caracterización de los compuestos extracelulares	79
7.5.- Discusión general	86
8.- Conclusiones	96
9.- Perspectivas para trabajos futuros	97
10.- Bibliografía	98

Indice de Figuras y Cuadros

Figuras	Pag.
1 Estructura química de las betalainas.	28
2 Fotografía de las células de <i>B. vulgaris</i> en la evaluación de viabilidad.	35
3 Dimensiones del biorreactor agitado mecánicamente	37
4 Fotografía del sistema de fermentación usado para el crecimiento de los cultivos de células de <i>B. vulgaris</i> .	38
5 Viabilidad de las células de <i>B. vulgaris</i> sometida a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$.	42
6 Distribución del tamaño de los agregados celulares de los cultivos de <i>B. vulgaris</i> sometidos a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$.	42
7 Microfotografías de las células de <i>B. vulgaris</i> mostrando daños de ruptura de la pared y membrana al estar sometidas a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$.	43
8 Liberación de proteína en cultivos de <i>B. vulgaris</i> sometidos a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$.	44
9 Crecimiento de los cultivos de <i>B. vulgaris</i> , 15 días después de someterlos a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$.	45
Figuras del capítulo 7.2 (artículo)	
1 Biomass and betalains production profiles of <i>Beta vulgaris</i> cells cultures developed in Erlenmeyer flasks and in a stirred tank.	67
2 Evolution of the cellular viability and mean cellular aggregate size of <i>Beta vulgaris</i> cell cultures developed in Erlenmeyer flasks and in a stirred tank.	68
3 Rheograms of <i>Beta vulgaris</i> broths obtained from cultures developed in Erlenmeyer flasks and in a stirred tank.	69
4 Evolution of the flow behavior index and consistency index of <i>B. vulgaris</i> cultures grown in shake flasks and in a stirred tank.	70
5 Extracellular protein accumulation in <i>Beta vulgaris</i> cultures developed in Erlenmeyer flasks and in a stirred tank.	71

	Pag.
6 Viscosity of the broths of cultures developed in a stirred tank and shake flasks as a function of the biomass concentration of <i>Beta vulgaris</i> cultures and Reynolds number in the stirred tank and considering the rheology of the cultures developed in shake flasks.	72
10 Crecimiento celular y producción de betalainas de los cultivos de <i>B. vulgaris</i> crecidos en un fermentador agitado a 400 y 700 rpm.	74
11 Reograma del caldo de cultivo de células de <i>B. vulgaris</i> crecidas en un fermentador agitado a 400 y 700 rpm.	76
12 Acumulación de proteína extracelular de los cultivos de <i>B. vulgaris</i> crecidos en un fermentador agitado mecánicamente a 400 y 700 rpm.	76
13 Viabilidad de las células y tamaño medio de los agregados celulares de los cultivos de <i>B. vulgaris</i> crecidos en un fermentador agitado a 400 y 700 rpm	77
14 Microfotografía de las células de <i>B. vulgaris</i> crecidas en un fermentador agitado mecánicamente a 700 rpm.	78
15 Evolución de la tensión de oxígeno disuelto durante el crecimiento de células de <i>B. vulgaris</i> en un fermentador agitado a 400 y 700 rpm.	79
16 Perfil electroforético de las proteínas extracelulares aisladas de muestras de fase estacionaria de cultivos de <i>B. vulgaris</i> .	81
17 Determinación del pH isoelectrico de una muestra de proteína extracelular, proveniente de cultivos de <i>B. vulgaris</i> crecidos en un fermentador agitado.	81
18 Análisis por cromatografía de intercambio ionico, del material extracelular secretado por las células de <i>B. vulgaris</i> crecidas en un fermentador agitado mecánicamente.	83
19 Patrón de electroforesis de las proteínas extracelulares secretadas por los cultivos de <i>B. vulgaris</i> crecidos en fermentador a 700 rpm.	85
 Cuadros	
1 Principales diferencias morfológicas para cultivos celulares.	8
2 Técnicas usadas para evaluar los efectos de estrés hidrodinámico en cultivos de células vegetales.	11

	Pag.
3 Sistemas experimentales para evaluar el efecto del estrés hidrodinámico en cultivos de células vegetales.	19
4 Estudios de estrés hidrodinámico usando sistemas experimentales con patrones de flujo definidos.	21
5 Características reológicas de los caldos de cultivos de células vegetales.	25

Nomenclatura

AGPs	Arabinogalactoproteínas
CCV	Cultivo de células vegetales
D	Diámetro del impulsor (m)
H	Altura del cultivo en el biorreactor (mm)
ks	Constante de Metzner y Otto (ecuación 5) (-)
K	Índice de consistencia (mPa seg ⁿ)
l	Distancia de oscilación de giro de un matraz (m)
L	Litro
n	Índice de flujo (-)
N	Agitación (rpm)
Np	Número de potencia (-)
P	Potencia (kW m ⁻³)
Pa	Pascal
PF	Peso fresco (g)
PS	Peso seco (g)
rpm	Revoluciones por minuto
Re	Número de Reynolds (-)
T	Diámetro del tanque (m)
TOD	Tensión de oxígeno disuelto (%)
V	Volumen (L)
W	Ancho de la paleta (m)

Letras griegas

β	Constante (ecuación 9), refiere el tipo de agitación del matraz, para un movimiento uniforme le corresponde un valor de 1
δ	Densidad (g L ⁻¹)
ε	Velocidad de disipación de energía por unidad de masa
γ	Velocidad de deformación (seg ⁻¹)
γ_{av}	Velocidad de deformación promedio (seg ⁻¹)
γ_{max}	Velocidad de deformación máxima (seg ⁻¹)
μ	Viscosidad (Pa seg)
η	Longitud de <i>eddy</i> en la escala Kolmogorov (m)
τ	Esfuerzo de corte (Pa)
ν	Viscosidad cinemática (m ² seg ⁻¹)

1.1. Resumen

El cultivo de células vegetales es una alternativa biotecnológica interesante para la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, se desconocen aún aspectos fundamentales sobre las implicaciones para crecer éstas células en fermentadores. Particularmente, los efectos que las condiciones de estrés hidrodinámico tienen sobre las células son de gran importancia para mejorar las condiciones de la fermentación.

Con el objeto de conocer los efectos del estrés hidrodinámico sobre cultivos de células vegetales para su crecimiento en fermentadores agitados mecánicamente, se desarrolló un esquema experimental en el que se utilizó un cultivo de *Beta vulgaris*, como modelo biológico de estudio. Los efectos del estrés hidrodinámico fueron estudiados en dos sistemas experimentales. En el primer caso, se analizó el efecto del estrés hidrodinámico en un viscosímetro, que es un sistema que genera un ambiente de estrés definido. Mientras que en el segundo caso, se utilizaron cultivos en matraces y en un fermentador agitado mecánicamente, que representan las condiciones hidrodinámicas reales para el desarrollo de éstas células.

Los resultados presentados en este trabajo, documentan por primera vez, que las células de *B. vulgaris* pueden crecer en un biorreactor de tanque agitado de laboratorio (2 L), bajo condiciones de hasta 1.66 kW m^{-3} , que corresponde a un valor de velocidad de deformación máximo de 305 seg^{-1} . Estos resultados, concuerdan con los estudios en un viscosímetro, donde se probaron velocidades de deformación de hasta $1,170 \text{ seg}^{-1}$ (valor que es muy superior al máximo alcanzado en el fermentador). Bajo esta condición se observó que existe una población de células que es capaz de soportar tales niveles de velocidad de deformación durante 50 minutos y que es capaz de crecer posteriormente en matraces, alcanzando rendimientos similares a los cultivos testigos, constituidos por células no sometidas a estrés en el viscosímetro.

Los estudios demostraron que uno de los principales efectos ocasionados por el estrés hidrodinámico sobre las células de *B. vulgaris* fue un aumento en la viscosidad del medio

filtrado y un cambio de la reología del mismo. Este cambio determinó una disminución de la turbulencia del sistema (número de Reynolds), para los cultivos crecidos en el fermentador. Bajo esta condición no se notaron efectos del estrés hidrodinámico sobre la viabilidad de las células, ni en cambios del tamaño de los agregados celulares.

El aumento de la viscosidad del medio filtrado estuvo asociado a una acumulación de moléculas del tipo arabinogalactoproteínas y polisacáridos, que pueden ser productos de secreción celular. Ello parece ser una respuesta de las células de *B. vulgaris* al insulto físico ocasionado por el estrés hidrodinámico. Este fenómeno es análogo a la respuesta de los tejidos de las plantas crecidas *in vivo*: las células responden a un daño por lesión, secretando sustancias que actúan como moléculas de defensa química o como barreras de protección física. Se sabe también, que las arabinogalactoproteínas están involucradas en mecanismos de reparación a daños en las paredes de las células o en el robustecimiento de las mismas.

1.2. Abstract

Plant cell and tissue culture has been considered as an alternative biotechnology to produce secondary metabolites. However, the fundamental aspects about the implications to grow plant cells in stirred tanks are not well known. The effect of the hydrodynamic stress on plant cells has particular importance in order to define the optimal conditions of the fermentation.

The main goal of this study was to determine the effects of hydrodynamic stress on plant cell cultures and the implication of using stirred tanks for their development. *Beta vulgaris* cultures were used as a biological model and two experimental systems were tested to study the effects of hydrodynamic stress. In the first case, controlled shear environments were generated in a viscometer and the resistance of the cells was evaluated. In the second case, the *B. vulgaris* cells were cultivated under different levels of power drawn in shake flasks and in a stirred tank.

The results of this work prove that the cells of *B. vulgaris* are able to grow in a stirred tank at a power drawn up to 1.66 kW m^{-3} . This condition represents a maximum shear rate of 305 seg^{-1} . This result was supported by studies conducted in a viscometer at a shear rate as high as $1,170 \text{ seg}^{-1}$ (considerably higher to that produced in the stirred tank), over 50 minutes. The cellular population grew in shaking flasks as well as the reference cultures, which were not sheared in the viscometer.

This study shows that the most important effect of hydrodynamic stress on the *B. vulgaris* cultures was the increase of the viscosity and the modification of the rheological properties of cell-free medium. As a consequence of that change, the turbulence (i.e. Reynolds number) of cultures developed in the fermentor was reduced. However, the *B. vulgaris* cultures did not show negative effects on cell viability and distribution of aggregates size.

The change of rheological properties of cell-free medium was associated a high accumulation of arabinogalactoproteins and polysaccharide. The cells secreted these compounds as a response to hydrodynamic stress. This phenomenon is analogous to the tissue response *in vivo*. In response to an insulator damage, the cells secrete chemical substances that play a biochemical role or act as physical protection. It is known that the arabinogalactoproteins are involved in repairing damage of cell walls or in the building of stronger walls.

2. Introducción

Las plantas producen una gran cantidad de sustancias químicas que el hombre utiliza como medicamentos, pesticidas, saborizantes y fragancias. Algunos de éstos compuestos, solo se encuentran en géneros particulares, además de que su síntesis y acumulación se realiza en tejidos muy especializados de las plantas. La complejidad y estereo-química de algunas de estas sustancias, hace imposible o incosteable su producción por síntesis química. Debido a estos problemas, desde la década de los 60', el cultivo de células vegetales (CCV) fue planteado como una alternativa biotecnológica para su producción (Panda *et al*, 1989; Scragg, 1992; Alferman y Paterson, 1995; Su, 1995).

Con el uso de las técnicas de CCV se pueden cultivar células, tejidos u órganos vegetales bajo condiciones *in vitro*, con la ventaja de poder ejercer el control de las condiciones fisico-químicas. En estas condiciones se logra la biosíntesis de metabolitos de interés. Entre las ventajas que ofrece este tipo de sistemas biotecnológicos, con respecto al método tradicional de obtención de metabolitos a partir de plantas crecidas en campo, se pueden mencionar las siguientes: independencia de las condiciones climáticas adversas y de los problemas de plagas, la posibilidad de mantener consistencia en la cantidad y calidad de los productos obtenidos y amplias perspectivas para incrementar la productividad (Taticek *et al*, 1991; Alferman y Paterson, 1995, Dörnenburg y Knorr, 1995; Su, 1995). Sin embargo, después de tres décadas, el desarrollo industrial y la comercialización de metabolitos secundarios producidos por CCV, se limita a unos pocos casos, tales como la producción de chiconina por cultivos de *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita, 1988), la berberina por *Coptis japonica* (Fujita y Tabata, 1987) y ginsenósidos por *Panax ginseng* (Ushiyama, 1991).

El problema para el desarrollo comercial de otros procesos basados en el CCV, es la baja productividad que se obtiene actualmente, lo cual impide que sean económicamente rentables (Verpoorte *et al*, 1993; Scragg, 1995). Para diseñar estrategias que permitan incrementar la productividad de estos sistemas, se requiere profundizar en el conocimiento de las rutas de biosíntesis de los metabolitos de interés y de sus

mecanismos de regulación. Asimismo, es importante profundizar en aspectos de ingeniería, que permitan incrementar los rendimientos celulares en fermentadores (Panda *et al*, 1989; Scragg, 1995; Su, 1995; Kieran *et al*, 1997). A este respecto, es indispensable conocer aspectos fundamentales de los efectos que tiene en las células vegetales el insulto físico que provoca una condición de estrés hidrodinámico de un fermentador.

Las células vegetales han sido consideradas como organismos más frágiles que las bacterias y hongos frente a las condiciones de estrés hidrodinámico que se presentan en los fermentadores, particularmente en tanques agitados (Stafford *et al*, 1986; Panda *et al*, 1989; Taticek *et al*, 1991; Hua *et al*, 1993; Dörnenburg y Knorr, 1995). Sin embargo, este punto de vista está cambiando, después de probar que algunas líneas celulares de plantas, pueden crecer en tanques agitados bajo condiciones de operación similares a las usadas para crecer microorganismos (Scragg, 1992; Meijer *et al*, 1993; Kieran *et al*, 1997). No obstante, el entendimiento de los efectos del estrés hidrodinámico sobre las células vegetales es limitado, si se compara este con el avance científico que se tiene en otros cultivos como células animales, células de insecto y en cultivos microbianos (Märkl *et al*, 1991; Prokop y Bajpai, 1992; Tramper *et al*, 1993; Joshi *et al*, 1996).

Particularmente, las células de *Beta vulgaris* (una especie que produce betalainas, compuestos usados como colorantes en la industria farmacéutica y de alimentos), fueron consideradas en la literatura como frágiles para crecer en fermentadores tipo tanque agitado (Wagner y Vogelmann, 1977; Taticek *et al*, 1991). Sin embargo, Rodríguez *et al* (1994b) reportaron el crecimiento de células de esta especie en un fermentador de tanque agitado con una agitación de 150 rpm, pero se desconocía si estos cultivos pudiesen soportar condiciones de agitación más severas, cuáles serían los efectos del estrés hidrodinámico sobre estas células y cuáles serían las implicaciones que se tendrían para desarrollar estas células en un fermentador agitado mecánicamente en condiciones de estrés hidrodinámico más severas.

3. Antecedentes

3.1. Papel del estrés hidrodinámico en cultivos celulares

Todo organismo vivo colocado fuera de su hábitat natural está sujeto a condiciones que resultan generalmente adversas para su desarrollo. Un caso particular, es el desarrollo de cultivos celulares en biorreactores, donde las condiciones de agitación y aireación, generan un ambiente de estrés hidrodinámico que puede dañar a las células (Märkl *et al*, 1991; Prokop y Bajpai, 1992; Hua *et al*, 1993; Tramper *et al*, 1993; Joshi *et al*, 1996). La respuesta de las células a dichas condiciones, depende de la intensidad y la duración de la fuerza aplicada. Pero también, de las características morfológicas y fisiológicas propias de las células (Prokop y Bajpai, 1992). La respuesta puede ser positiva (por ejemplo, un incremento en el rendimiento celular o en la velocidad de síntesis de un metabolito). Sin embargo, en el caso de sistemas considerados como sensibles al estrés hidrodinámico, los estudios se enfocan principalmente a los efectos dañinos o negativos (Prokop y Bajpai, 1992).

Existen varios trabajos de revisión del papel del estrés hidrodinámico en sistemas biológicos. Thomas (1990) presentó un análisis de los problemas de la fragilidad de diferentes sistemas biológicos en procesos biotecnológicos. Märkl *et al* (1991) realizaron una revisión de los efectos del estrés hidrodinámico en microorganismos y algunos de los modelos experimentales para evaluar la resistencia de los mismos. Prokop y Bajpai (1992) presentaron un análisis más completo de las características de diferentes cultivos y algunos de los parámetros que definen las condiciones hidrodinámicas del reactor. Joshi *et al* (1996) hicieron una revisión exhaustiva de la literatura disponible, dando un énfasis particular en los avances para los cultivos de células animales. Recientemente, Thomas y Zhang (1998) presentaron una revisión con artículos posteriores a 1995, considerando particularmente los adelantos logrados con el conocimiento de la sensibilidad de las células con un sistema de micromanipulación. Para el caso particular de células vegetales, los trabajos de Meijer *et al* (1993) y el de Kieran *et al* (1997) presentan los adelantos más sobresalientes en este sistema celular.

En la literatura antes citada, es reconocido que el comportamiento en el crecimiento de los diferentes tipos celulares en un fermentador, es afectado por sus características morfológicas. En el cuadro 1 se muestra una síntesis comparativa de las propiedades morfológicas y estructurales de los diferentes tipos de células, que se asocian con su capacidad para crecer en fermentadores. Se destaca el tamaño de las células, como una característica que determina la fragilidad de los cultivos. Los tipos celulares de tamaño más grande, presentan los problemas de ingeniería más severos, debido a que para mantener a las células suspendidas y lograr homogeneidad en el caldo, se necesita mezclar con más intensidad el caldo de cultivo y esto puede incluso ocasionar lisis celular (Joshi *et al*, 1996).

	BACTERIAS	LEVADURAS	HONGOS	CÉLULAS ANIMALES	CÉLULAS VEGETALES
Tamaño (µm)	1-10	≈10	Variable (Unicelular/Pellet)	10-30	20-120
Pared celular	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente
Composición de la pared	Gram (+) Peptidil glucano Gram (-) doble membrana		Quitina	Ausente	Celulósica
Movilidad	Cilios y flagelos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Vacuolas	Ausentes	Ausentes	Presentes	Ausentes	Presentes

(Märkl *et al*, 1991)

Cuadro 1. Principales diferencias morfológicas para cultivos celulares.

En condiciones de mezclado turbulento en fermentadores, la hidrodinámica de los fluidos se explica por medio de la existencia de pequeños elementos de fluido denominados *eddys*. Estos elementos, en tanques agitados, pueden llegar a ser más pequeños que las células de los organismos eucariontes y ocasionar daños severos durante su coalición. Por esta razón, las células de insecto, de animales superiores y de vegetales, son consideradas frágiles para crecer en fermentadores agitados mecánicamente (Doran, 1993; Hua *et al*,

1993; Tramper *et al*, 1993; Joshi *et al*, 1996). Existen grandes avances en el entendimiento de la fragilidad de las células de insecto y de animales superiores frente al ambiente de estrés que se presenta en los fermentadores (Goosen, 1992; Tramper *et al*, 1993). Sin embargo, en células vegetales, no existen las evidencias experimentales suficientes para sustentar que la fragilidad sea el principal problema por el que las células no pueden crecer en fermentadores agitados mecánicamente. Por el contrario, se han reportado especies que son altamente resistentes para crecer en fermentadores de este tipo, como los cultivos de *Nicotiana tabacum* (Meijer *et al*, 1994; Ho *et al*, 1995), *Catharanthus roseus* (Leckie *et al*, 1991; Meijer *et al*, 1994), *Morinda citrifolia* (Kieran *et al*, 1997) y *Carthamus tinctorius* (Takeda *et al*, 1994).

Otra característica morfológica que determina la resistencia de las células es la pared celular. Esta constituye una barrera física para las células que la poseen, pero su composición química es diferente en cada tipo celular (cuadro 1). En células vegetales cultivadas *in vitro*, se ha observado que la composición de la pared celular puede cambiar dependiendo de las condiciones hidrodinámicas imperantes, como lo muestran los resultados de Tanaka *et al* (1988). En ese trabajo, se observó que las células de *N. tabacum* crecidas en fermentador tuvieron un aumento de la relación de celulosa a hemicelulosa, en comparación con células crecidas en matraces. Estos resultados sugieren que la modificación de la pared celular puede ser una respuesta de las células, para adaptarse a crecer bajo condiciones hidrodinámicas más severas.

Las vacuolas intracelulares pueden ser consideradas como otra característica anatómica importante relacionada con la fragilidad de las células ante condiciones de estrés hidrodinámico. En particular, aquellas vacuolas que almacenan sustancias tóxicas o enzimas líticas, representan las de mayor peligro, ya que la ruptura de estas estructuras membranosas por fuerzas hidrodinámicas, ocasionarían la muerte de las células. Particularmente, las vacuolas de las células vegetales funcionan como sitios de almacén de productos tóxicos (Taiz, 1992) y pueden ser una de las causas de muerte celular en

aquellos cultivos sometidos a condiciones de alto estrés hidrodinámico. Sin embargo, no existen evidencias experimentales que sustenten ésta hipótesis.

Los parámetros para evaluar los efectos provocados por el estrés hidrodinámico dependen del cultivo en estudio. Por ejemplo, en cultivos microbianos, que son considerados como resistentes para crecer en fermentadores, los efectos del estrés hidrodinámicos se relacionan principalmente con alteraciones morfológicas y cambios en los rendimientos celulares y en la capacidad de síntesis del metabolito de interés (Märkl *et al*, 1991; Prokop y Bajpai, 1992). Por otra parte, en cultivos considerados frágiles (como cultivos de células vegetales y animales), se han implementado técnicas para tratar de medir la viabilidad celular. Algunas de estas técnicas se basan en coloraciones diferenciales, donde es posible discriminar células vivas de células muertas por medio de alguna actividad metabólica o estructural diferente. Por ejemplo, la actividad mitocondrial se puede detectar por medio de la reducción del tricloruro de trifeniltetrazolio (TTC), la integridad de la membrana celular se puede establecer con azul de tripano, azul de metileno, azul de Evans y diacetato de fluorosceína o la integridad de la molécula del ADN con yoduro de etidio. Otras técnicas miden la permeabilidad dieléctrica de la membrana o la unión de anticuerpos específicos a proteínas de la membrana (Meijer *et al*, 1993; Kieran *et al*, 1997).

Una forma indirecta de medir el daño extremo en las células (lisis celular), es a través de la liberación de metabolitos intracelulares. A este respecto, se han usado como indicadores: carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, además de la determinación de la actividad de enzimas, como la lactato deshidrogenasa en células animales. Otra forma indirecta es detectando variaciones negativas en la velocidad de consumo de algún nutrimento básico para el desarrollo celular (Prokop y Bajpai, 1992; Meijer *et al*, 1993).

Es importante señalar que, dependiendo de la técnica analítica que se utilice para estimar la viabilidad, pueden encontrarse diferencias hasta de 3 o 4 órdenes de magnitud en la energía específica letal para un mismo tipo celular (Dunlop y Namdev, 1993). Esta

diferencia es importante de considerar, cuando se intenta comparar los resultados obtenidos en diferentes estudios.

Para el caso particular de células vegetales, las técnicas usadas para evaluar los efectos de estrés hidrodinámico se resumen en el cuadro 2.

Respuesta del sistema	Parámetro medido	Referencia
Reducción en la viabilidad	Velocidad de crecimiento	Rosemberg, 1987; Meijer <i>et al</i> , 1993
	Potencial de crecimiento	Rosemberg, 1987; Scragg <i>et al</i> , 1988
	Integridad de la membrana	
	Exclusión de colorantes	Takeda <i>et al</i> , 1994; Kieran <i>et al</i> , 1995
	Marcaje con isótopos	Parr <i>et al</i> , 1984; Kieran <i>et al</i> , 1993
	Permeabilidad dieléctrica	Markx <i>et al</i> , 1991
Liberación de componentes intracelulares	Ruptura celular	Thomas y Zhang, 1998
	Variaciones de pH	Wagner y Vogelmann, 1977
	Proteína	Meijer <i>et al</i> , 1993
	Carbono orgánico total	Meijer <i>et al</i> , 1993
	Metabolitos secundarios	Hooker <i>et al</i> , 1989
Cambios de metabolismo	Velocidad de asimilación de oxígeno	Ho <i>et al</i> , 1995
	Actividad respiratoria, con un colorante (TTC)	Rosemberg, 1987; Takeda <i>et al</i> , 1994 Zhong <i>et al</i> , 1994
	Concentración de ATP	Takeda <i>et al</i> , 1994,
	Productividad de metabolitos	Hooker <i>et al</i> , 1989; Zhong <i>et al</i> , 1994
	Composición de la pared celular	Tanaka <i>et al</i> , 1988
Cambios de morfología	Tamaño de agregado/forma	Takeda <i>et al</i> , 1994; Kieran <i>et al</i> , 1995
Patrón de agregación	Índice de expansión	Zhong <i>et al</i> , 1994

Adaptado de Kieran *et al* (1997)

Cuadro 2. Técnicas usadas para evaluar los efectos de estrés hidrodinámico en cultivos de células vegetales.

Es importante señalar que los daños ocasionados por el estrés hidrodinámico sobre cultivos celulares, no son necesariamente de muerte inmediata. Por ejemplo, en cultivos de células animales, se reconoce que además de la muerte celular típica que es conocida como necrosis, existe un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis, en el que

la célula desencadena una serie de eventos bioquímicos que le conducen a la muerte celular programada (Wu, 1995; Thomas y Zhang, 1998).

3.2. Mecánica de fluidos y parámetros de estrés hidrodinámico

En mecánica de fluidos, se reconocen dos tipos de flujo: el laminar y el turbulento. Para distinguir entre uno y otro régimen de flujo, se utiliza el número de Reynolds (Re) que se define como:

$$Re = \frac{\delta NL}{\mu} \quad (1)$$

donde: δ es la densidad del fluido, N es la velocidad de agitación, μ es la viscosidad del fluido y L corresponde a una longitud característica del sistema, que en el caso de reactores agitados con impulsores, corresponde al diámetro del impulsor (Oldshue, 1983).

La hidrodinámica de un fermentador agitado mecánicamente, está directamente relacionada con la energía cinética que transmite el impulsor al fluido y con la inyección de las burbujas de gas.

En régimen laminar y para fluidos Newtonianos, una manera de cuantificar el estrés hidrodinámico, es a través de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) y del esfuerzo de corte (τ) que se definen como:

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad (2)$$

En un fermentador agitado con impulsores, los valores máximos de velocidad de deformación se presentan en las cercanías del impulsor y decrecen conforme la distancia a este dispositivo aumenta. De acuerdo a la ecuación 2 y para una viscosidad constante, las variaciones de la velocidad de deformación afectan al esfuerzo de corte directamente. Por esta razón, las células crecidas en un tanque agitado, están expuestas a diferentes niveles

de estrés hidrodinámico, que dependen de su posición dentro del tanque y de los tiempos de circulación. Esto, a su vez, está determinado por la configuración del tanque, sus condiciones de operación y de las propiedades físicas del caldo de cultivo.

Bowen (1986) propone el uso de la velocidad de deformación promedio ($\dot{\gamma}_{av}$) y la velocidad de deformación máxima ($\dot{\gamma}_{max}$), como parámetros característicos que ayuden a entender y comparar las condiciones de estrés en el tanque. Este autor reporta para el caso particular de un tanque agitado con una propela de paletas, el uso de las siguientes ecuaciones:

$$\dot{\gamma}_{av} = 4.2 N \left[\frac{D}{T} \right]^{0.3} \left[\frac{D}{W} \right] \quad (3)$$

$$\dot{\gamma}_{max} = 9.7 N \left[\frac{D}{T} \right]^{0.3} \left[\frac{D}{W} \right] \quad (4)$$

donde: N es la velocidad de agitación, D es el diámetro del impulsor, T el diámetro de tanque y W es el ancho de la paleta.

Para fluidos no-Newtonianos, la reología del caldo determina cambios severos en los patrones de flujo. Para los fluidos de altas viscosidades y pseudoplásticos se presenta movimiento turbulento en las cercanías del agitador, donde el gradiente de deformación es elevado. Sin embargo, en las zonas alejadas del impulsor, la velocidad de movimiento decrece (presentando en casos extremos zonas sin movimiento), en consecuencia, el gradiente de deformación decrece. Metzner y Otto (1957) proponen para este tipo de fluidos, el uso de un gradiente de deformación promedio ($\dot{\gamma}_{av}$), que se define como:

$$\dot{\gamma}_{av} = k_s N \quad (5)$$

donde: k_s es una constante determinada por el tipo de impulsor.

Como se observa, en la relación anterior, la velocidad de deformación promedio depende exclusivamente del tipo del impulsor y de la velocidad de rotación, además solo es válida para la región laminar.

Manejando el concepto de gradiente de deformación promedio, se define el número de Reynolds para fluidos no-Newtonianos que siguen el modelo reológico de la ley de la potencia ($\tau=K \dot{\gamma}^n$), de la siguiente manera:

$$Re = \frac{D^2 N^{2-n} \delta}{0.1K} \left[\frac{n}{6n + 2} \right]^n \quad (6)$$

donde: K es el índice de consistencia y n, el índice de flujo.

Por otro lado, la turbulencia en tanques agitados es un tópico que no esta bien definido matemáticamente. Kresta (1998) propone que los principios para caracterizar la turbulencia de los tanques agitados, se desprenden de la determinación de la raíz cuadrada media de la velocidad fluctuante (v_z . axial, v_r . radial y v_θ angular). Así, el balance de energía cinética de turbulencia (k) puede obtenerse de la raíz cuadrada media de las velocidades elevadas al cuadrado, lo cual se expresa por medio de la siguiente formula:

$$k = \frac{1}{2} (v_z^2 + v_r^2 + v_\theta^2) \quad (7)$$

Alternativamente, se pueden incorporar las ecuaciones que gobiernan la conservación de masa y energía (Navier-Stokes). La aplicación de tiempo promedio, genera seis términos nuevos. El estrés de Reynolds ($\overline{\delta v_i v_j}$) y tres de los cuales contienen el término de la raíz media al cuadrado de la velocidad. La ecuación del tiempo promedio acarrea un problema sin solución, dado que el número de incógnitas no puede ser conocido con las ecuaciones disponibles.

A partir de este problema surge la necesidad de proponer alternativas para modelar la turbulencia. En este sentido, un concepto central en los modelos de turbulencia es la velocidad de disipación de energía turbulenta por unidad de masa (ε), que es igual al promedio de la suma de las variaciones en los gradientes de velocidad instantánea, multiplicado por la viscosidad cinemática:

$$\varepsilon = -\nu \overline{(\partial v_i / \partial x_j + \partial v_j / \partial x_i) \partial v_j / \partial x_i} \quad (8)$$

donde: ν corresponde a la viscosidad cinemática, v_i, v_j representan la raíz de los componentes de velocidad en la dirección i, j y x_i, x_j corresponde a la coordenada de dirección i, j . Esta ecuación es similar a la expresión de esfuerzo de corte (τ_{yx}):

$$\tau_{yx} = -\mu (\partial V_x / \partial y_j + \partial V_y / \partial X) \quad (9)$$

aunque su física es por demás compleja.

Mientras que la disipación es un concepto muy útil, la posibilidad para medir los gradientes instantáneos de velocidad es imposible por el momento. Debido a esta dificultad, se han planteado otras formas alternas para cuantificar la turbulencia. La microescala de Kolmogorov es uno de los modelos más aplicados. Esta teoría propone que:

$$\eta = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (10)$$

donde: η representa la longitud del *eddy* de Kolmogoroff en la cual las fuerzas de deformación debidas a la turbulencia están justamente balanceadas por las fuerzas de resistencia de la viscosidad. En este punto, la energía contenida en el *eddy* turbulento es absorbida por la disipación viscosa. ε representa la velocidad de disipación de energía por unidad de volumen.

En este modelo, la medida de turbulencia depende de la existencia de un estado estacionario en el sistema, que se requiere para que el tiempo promedio sea representativo y preciso. Se requiere también una condición de la isotropía local, que permite hacer medidas en una macroescala y finalmente es indispensable la existencia de un número de Reynolds alto, que asegure que las fuerzas viscosas sean relativamente despreciables con relación a las fuerzas de inercia. Sin embargo, las tres condiciones anteriores, solamente pueden ser aplicadas sobre un volumen muy pequeño y limitado de un tanque agitado situado en las partes más cercanas al impulsor.

Para estimar ε se ha usado como aproximación la expresión de la potencia suministrada al tanque (Joshi *et al*, 1996), que se define como:

$$P = \frac{\delta N_p N^3 D^5}{V} \quad (11)$$

donde: δ corresponde a la densidad, N_p representa el número de potencia, N la velocidad de agitación del impulsor, D el diámetro del impulsor y V el volumen del tanque. Esta expresión proporciona una aproximación para calcular la energía de disipación turbulenta (ε) y poder determinar las escalas de η .

3.3. Sistemas experimentales usados para estudiar la resistencia de los cultivos ante condiciones de estrés hidrodinámico.

Tomando en consideración el sistema experimental usado para generar el estrés y el tiempo que dura la exposición de las células a la condición de estrés, los estudios de los efectos del estrés hidrodinámico sobre cultivos celulares, se pueden dividir en dos grandes categorías (Märkl *et al*, 1991; Meijer *et al*, 1994; Joshi *et al*, 1996). En una primer categoría, se incluyen los estudios que se realizan en biorreactores, en donde las células son sometidas a una condición heterogénea y no bien comprendida en sus microambientes de estrés hidrodinámico. En este caso, el tiempo de exposición al que las

células son expuestas, corresponde a la duración de una cinética de crecimiento o una proporción importante de ésta. Sin embargo, estos estudios tienden a ser altamente específicos, por la configuración particular del biorreactor empleado y por las características propias de las especies estudiadas.

En la segunda categoría de estudios, se agrupan aquellos en donde las células son expuestas a un flujo bien definido, en el cual se puede conocer con precisión alguno de los parámetros de estrés hidrodinámico. Sin embargo, estos estudios se limitan a un período de tiempo muy corto y generalmente se operan en condiciones no asépticas.

Los estudios en biorreactores operados por lote, representan las condiciones reales del estrés hidrodinámico para los cultivos celulares y ofrecen la posibilidad de evaluar diferentes niveles de estrés hidrodinámico sobre las células. Las estrategias usadas para cambiar las condiciones de estrés hidrodinámico, consisten en variar la configuración del tanque de cultivo, el tipo de impulsor y su velocidad de agitación (Hooker *et al*, 1990; Leckie *et al*, 1991; Meijer *et al*, 1993). Sin embargo, existen ciertas limitantes para interpretar los resultados obtenidos, debido a la incapacidad de precisar el esfuerzo de corte dentro del tanque (cantidad, frecuencia y ubicación). Además, en un cultivo por lote, las condiciones físico-químicas y biológicas del sistema cambian constantemente. Bajo estas condiciones, los efectos asociados con el estrés hidrodinámico, como los cambios en los rendimientos celulares, morfología, viabilidad o velocidad de crecimiento, pueden verse afectado también por las variaciones de otros parámetros (Taticek *et al*, 1991; Scragg, 1992; Su, 1995).

A pesar de las limitaciones anteriores, los estudios en biorreactores han sido ampliamente usados para tratar de evaluar la resistencia de diferentes tipos de células y de los efectos que tiene el estrés hidrodinámico sobre las mismas (Märkl *et al*, 1991; Joshi *et al*, 1996). En el cuadro 3 se presenta un resumen comparativo de los estudios en células vegetales, relacionados con la resistencia de las células o con los efectos del estrés hidrodinámico. Es importante resaltar que las investigaciones se concentran en un número restringido de

especies vegetales, especialmente si éstas se comparan con el gran número de cultivos vegetales postulados como candidatos para la producción de algún metabolito secundario y para los cuales se ha reportado al menos, su desarrollo en matraces (Stafford, 1991; Scragg, 1992; Alferman y Paterson, 1995; Zhong *et al*, 1995). Además, los criterios de resistencia celular aun son inciertos. Por ejemplo, para *Catharanthus roseus*, que es una especie ampliamente estudiada para crecer en fermentadores, algunos autores consideran las células de esta especie como frágil (Wagner y Vogelmann, 1977), en tanto que otros, las postulan como resistentes y han podido crecerlas en sistemas considerados de alto estrés, como tanques agitados (Tanaka *et al*, 1988; Leckie *et al*, 1991; Meijer *et al*, 1994).

Como ya se mencionó anteriormente, es difícil definir con un solo valor las condiciones hidrodinámicas de un biorreactor. Sin embargo, para fines comparativos se han utilizado valores característicos. La velocidad de deformación es el parámetro reportado con mayor frecuencia o que se han podido estimar mediante el uso de la relación propuesta por Metzner y Otto (1957). El rango de velocidades de deformación usado en los estudios con células vegetales en biorreactor va desde 40 seg^{-1} y alcanza valores de hasta $25\,000 \text{ seg}^{-1}$.

Boysan *et al* (1988) reportaron el uso de la dinámica de fluidos computacional, como una herramienta para analizar las condiciones de estrés hidrodinámico en biorreactores usados para cultivar células vegetales. Las predicciones de sus modelos matemáticos y sus resultados experimentales indican que el rendimiento de cultivos de *C. roseus* se ve afectado por el aumento del estrés hidrodinámico, medido como la velocidad de deformación. Sin embargo, una objeción que existe por el momento, en el uso de dinámica de fluidos computacional (incluido el trabajo de Boysan *et al*, 1988), es que se carece de mediciones hidrodinámicas experimentales que validen los valores obtenidos mediante los modelos computacionales (Van-den-Akker, 1997).

Especie	Fermentador	Sistema de agitación	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de Exposición (h)	Velocidad de deformación (seg ⁻¹)*	Referencia
<i>M. citrifolia</i>	Reactor de tubo 75 L	2 impulsores turbina de 12 cm	100	300	n.e.	Wagner y Vogelmann, 1977
<i>B. vulgaris</i>	Reactor <i>airlift</i> 10 L	Propela de 11 cm	28	300	n.e.	Wagner y Vogelmann, 1977
<i>C. roseus</i>	Tanque agitado 10 L	Impulsor turbina de 12 cm	28	125	n.e.	Wagner y Vogelmann, 1977
<i>C. roseus</i>	Matraz Erlenmeyer 0.5 L	2 Baffles 1.2 X 2 cm	140	375	n.e.	Tanaka, 1981
<i>C. roseus</i>	Reactor 3 L	Impulsor 7 cm	175,228	375	n.e.	Tanaka, 1981
<i>C. roseus</i>						
<i>H. anhuus</i>	Tanque agitado 3 L	Impulsor turbina 7.3 cm	400-100	5	600-1500	Scrugg <i>et al</i> , 1988
<i>C. roseus</i>	Tanque agitado 3 L	Impulsor turbina 7.3 cm	150-200	250	225-300	Allan <i>et al</i> , 1988
<i>C. roseus</i>	Tanque agitado 12 L	Impulsor turbina 8.5 y 12 cm	300	300	60-400	Leckie <i>et al</i> , 1991
<i>C. roseus</i>	Tanque agitado 12 L	Impulsor turbina 7.5 cm	1000	750	25000	Meijer <i>et al</i> , 1994.
<i>C. roseus</i>						
<i>N. tabacum</i>	Tanque agitado 3 L	Impulsor turbina 7 cm	250-1000	250	3000-25000	Meijer <i>et al</i> , 1994
<i>T. divaricata</i>						
<i>C. robusta</i>						
<i>C. tinctorius</i>	Tanque agitado 3 L	Impulsor turbina 5.0 cm	200-500	25	n.e.	Takeda <i>et al</i> , 1994
<i>P. frutescens</i>	Tanque agitado 5 L	Propela marina 8.5 cm	250	—	40	Zhong <i>et al</i> , 1994
<i>C. roseus</i>	Matraz de 200 mL con cuatro baffles 0.6 X 7 cm	Agitación recíprocamente	5200	0.5	n.e.	Marx <i>et al</i> , 1991
<i>N. tabacum</i>						
<i>T. divaricata</i>						

n.e. no calculado

* : Como fue calculado por el autor.

Cuadro 3. Sistemas experimentales para evaluar el efecto del estrés hidrodinámico en cultivos de células vegetales (sobre la base de Meijer *et al*, 1993 y actualizado).

Para evaluar los efectos del estrés hidrodinámico, el cultivo continuo es una alternativa al cultivo por lote. En este tipo de régimen es posible mantener las condiciones físico-químicas y biológicas del sistema en un estado estable por largos periodos de tiempo. Bajo este régimen de cultivo, la pérdida de la viabilidad por daño o muerte celular se refleja por una disminución en la velocidad de crecimiento y posteriormente en el lavado del cultivo. Además, esta técnica puede llegar a ser de gran utilidad para el aislamiento o selección de líneas celulares resistentes a condiciones de estrés hidrodinámico más severas (Märkl *et al*, 1991; Meijer *et al*, 1993). Una desventaja de los experimentos en cultivo continuo, es que su duración es muy prolongada. En el caso de células vegetales, asumiendo un tiempo de generación de 50 horas, un experimento con al menos 10 a 15 tiempos de generación podría demorar de 500 a 750 horas, lo que incrementa los riesgos de contaminación. A este respecto, Meijer *et al* (1994) operaron un tanque agitado (3 L) en régimen de cultivo continuo, a una velocidad en la punta del impulsor de 2.36 m seg^{-1} . Con este sistema observaron que las células de *C. roseus* y *N. tabacum* fueron capaces de crecer, mientras que los cultivos de *C. robusta* y *T. divaricata* sufrieron lisis celular y el cultivo se lavó. Concluyeron que la resistencia de los cultivos depende de la especie estudiada y posiblemente de su historial *in vitro*.

En los estudios con células animales, se ha observado que en tanques agitados con suministro de gases, pueden ocurrir dos mecanismos de daño: a) el estrés por elongación, que ocurre durante la ruptura de las burbujas de gas en la superficie del caldo y b) el estrés turbulento, durante el mezclado del caldo (Joshi *et al*, 1996; Wu, 1995). Los resultados muestran que el estrés producido durante la ruptura de las burbujas de gas es mucho mayor al producido por los *eddys* turbulentos (García-Briones y Chalmers, 1994). Sin embargo, en células vegetales este fenómeno no ha sido considerado.

En los sistemas modelo experimental los equipos utilizados incluyen: los viscosímetros tipo *Couette*, el reómetro capilar, los impulsores tipo *jet-libre* y el micromanipulador (cuadro 4). En estos sistemas, es posible someter a las células a condiciones de estrés hidrodinámico definidas, por tiempos de exposición en general muy cortos. Bajo esta situación, el

experimento implicaría la presencia de las células en una zona del biorreactor y por tanto no correspondería a las condiciones reales para el crecimiento de las células en el fermentador.

Cultivo celular	Aparato	Régimen de fluido	Indicador de daño	Velocidad de deformación (seg ⁻¹)	Tiempo de exposición (h)	Referencia
<i>Nicotiana tabacum</i>	Viscosímetro Couette	Transición a turbulento	Viabilidad Lisis celular Producción de metabolitos	600-1200	12	Hooker <i>et al</i> , 1989
<i>Daucus carota</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>D. stramonium</i>	Viscosímetro Couette	Laminar	Morfología Recrecimiento Lisis celular	450-3800	0.01-1	Dunlop y Namdev, 1993
<i>Periella frutescens</i>	Viscosímetro Couette	Transición a turbulento	Actividad respiratoria	1193	20	Zhong <i>et al</i> , 1995
<i>Morinda citrifolia</i>	Capilar con recirculación de fluido	Laminar Turbulento	Colorante de exclusión Morfología	3000-9000	0.05-0.08	Kieran <i>et al</i> , 1995
	Jet sumergido	Turbulento	Colorante de exclusión Morfología			MacLoughlin <i>et al</i> , 1997
<i>Taxus cuspidata</i>	Viscosímetro Couette	Laminar	Velocidad de crecimiento y productividad de Taxol®	2-10	336	Sun y Linden, 1999

Cuadro 4. Estudios de estrés hidrodinámico usando sistemas experimentales con patrones de flujo definidos.

En este tipo de estudios, los resultados se han analizado a través de un modelo de decadencia exponencial de la actividad biológica como función de la fuerza suministrada. Estos análisis son semejantes a los que se hacen en células animales (Lakhota y Papoutsakis, 1992; Tramper *et al*, 1993). En este modelo se calcula la velocidad de muerte, para caracterizar la respuesta de las células a una condición de estrés dada.

De los resultados obtenidos sobre la fragilidad de las células vegetales en los sistemas modelo, para células de *M. citrifolia* se ha estimado un valor de esfuerzo de corte crítico en el orden de 80 a 350 Nm^{-2} (Vogelman *et al*, 1978; Kieran *et al*, 1995). Mientras que, para células de *D. carota* se reportó un valor de 50 N m^{-2} (Rosemberg, 1987). Para otros sistemas, como cultivos de células animales superiores y de insecto, consideradas como sistemas frágiles, se ha establecido que las células disminuyen su crecimiento a un esfuerzo de corte de 1-5 N m^{-2} (Goosen, 1992; Tramper *et al*, 1993; Tan *et al*, 1994). Esto indica que las células vegetales pueden ser más resistentes a las condiciones de estrés hidrodinámico que otros cultivos eucariontes, en cuando menos un orden de magnitud.

En los estudios recientes de Dunlop y Namdev (1993); Kieran *et al* (1995); MacLoughlin *et al* (1997), se propone el uso de la energía de disipación como un parámetro para determinar el daño de las células ocasionado por el corte, asociando ésta energía con el potencial dañino de los *eddys* en condiciones turbulentas.

Se ha observado que la fragilidad de las células vegetales depende de la etapa de crecimiento celular. Hooker *et al* (1989) observaron que las células *N. tabacum* de fase estacionaria fueron más frágiles con respecto a las células de la fase exponencial. Esta fragilidad celular, parece asociada con el estadio fisiológico de las células en la fase estacionaria de crecimiento y está de acuerdo con los resultados de fragilidad reportados para los cultivos de *M. citrifolia* (Kieran *et al*, 1995).

Uno de los inconvenientes de estos sistemas, es que los experimentos no han sido realizados bajo condiciones de asepsia. Por lo tanto, no se tiene la capacidad de estudiar efectos subletales o bien observar las respuestas de las células vegetales a diferentes condiciones de estrés.

La micromanipulación de células es una técnica que tiene como principio la captura y el prensado de células individuales. El uso de esta técnica, permite la compresión de células individuales con el fin de determinar la fuerza crítica necesaria para su estallamiento o para

evaluar su capacidad de elongación (Thomas y Zhang, 1993; 1998). Con el uso de esta técnica, se reportan valores típicos de fuerza lítica en levaduras de 75 mN (*Saccharomyces cerevisiae*) y de elongación de una hifa de 120 mN (*Fusarium graminearum*). En el caso de células animales se reportan fuerzas para lisis de 5 mN (células de hibridoma), mientras que para una célula vegetal, se requieren alcanzar fuerzas de 4,500 mN (células de tomate). Este análisis comparativo demuestra que la resistencia de las células vegetales puede llegar a ser hasta tres órdenes de magnitud superior a la de otras células (bajo el mismo principio de resistencia). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en viscosímetros. Su comparación indica que las células vegetales, no son tan frágiles como las células animales y de insecto e incluso son más resistentes a las fuerzas de compresión que las células de levadura.

Aunque los resultados obtenidos con el sistema de micromanipulación no representan lo que sucede en un tanque agitado, se han usado para ayudar a entender algunos fenómenos que suceden en el cultivo de células animales en biorreactores y que no se han podido explicar completamente con el uso de otras técnicas. Por ejemplo, la función que desempeñan los agentes protectores, como el Pluronic F-68 en células animales (Thomas y Zhang, 1998). Se ha visto que la adición de esta sustancia (0.05 p/v), incrementó la tensión media de explosión de la membrana y el módulo de compresión elástica de las células en un 60% y 120%, por lo cual se considera que estas sustancias mejoran la resistencia de estas células para crecer en biorreactores (Hua *et al*, 1993).

3.4. Estudios de reología de los caldos de células vegetales

La reología de los caldos es un parámetro de gran importancia en los estudios ingenieriles que involucran el mezclado y la transferencia de oxígeno en fermentadores. Además, es un parámetro importante para definir las condiciones de estrés hidrodinámico en los cultivos. Sin embargo, los estudios de reología en CCV son muy escasos (Curtis y Emery, 1993; Kieran *et al*, 1997).

En el cuadro 5 se presenta un resumen de los trabajos publicados sobre reología de caldos de células vegetales. Como puede observarse, el comportamiento reológico de los caldos es en general no-Newtoniano y de tipo pseudoplástico, que se ajusta al modelo de la ley de la potencia:

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (12)$$

donde: K representa el índice de comportamiento y n el índice de flujo. En cultivos con altas concentraciones celulares, los valores de n mínimos llegan a ser del orden de 0.53 (18 g L⁻¹). En tanto que el valor del índice de consistencia, se ha reportado que depende de la concentración de células, para los cultivos de *Cudrania tricuspidata* y *Vinca rosae* (Tanaka, 1982).

La pseudoplasticidad de los caldos de células vegetales es determinada por la concentración celular, la morfología de las células y la formación de agregados celulares. La morfología de las células cultivadas *in vitro* es altamente variable. En un mismo cultivo coexisten células esféricas y células alargadas, que pueden oscilar en su tamaño hasta en un orden de magnitud (20-120 μm). Otro problema asociado a la heterogeneidad de la forma celular, es la tendencia de las células a permanecer adheridas después de la mitosis, formando agregados celulares que pueden llegar a ser tan grandes, que alcanzan a medir centímetros (Taticcek *et al*, 1991; Doran, 1993; Zhong *et al*, 1995; Su, 1995).

Curtis y Emery (1993) demostraron que el aumento de la viscosidad de los caldos es función de la morfología de las células. Cultivos que contenían células de morfología alargada fueron pseudoplásticos (p. ej. *Periella somniferum*, *Glicine max*, *Solanum tuberosum*), en tanto que aquellos cultivos que contenían células de forma esférica, fueron Newtonianos (p. ej. *N. tabacum* y *D. carata*). Este comportamiento tiene cierta analogía con la reología de los caldos de hongos, donde la morfología micelial determina caldos altamente viscosos y de mayor viscosidad con relación a los caldos conformados por *pellets* (Olsvik y Kristiansen, 1994).

Cultivo	Reología	Parámetro	Biomasa (g L ⁻¹)	Tamaño de agregado (µm)	Forma celular	Viscosímetro	Referencia
<i>Morinda citrifolia</i>	Tixotropico	---	15 PS	n.r.	n.r.	Haake Rotovisco RV3 sistema MV-1-50	Wagner y Vogelman, 1977
<i>Nicotiana tabacum</i>	Pseudoplástico	n = 0.69-0.74 K n.r.	>7.7 PS	350-400	n.e	Brookfield marca B tipo BL	Kato <i>et al</i> , 1978
<i>Cudrania tricuspidata</i>	Pseudoplástico	n = 0.53 K = (x) ^{6.5}	10-18 PS	40-297	Redondas	Brookfield marca B tipo BL	Tanaka, 1982
<i>Vinca rosae</i>	Pseudoplástico	n = 0.53 K = (x) ^{6.5}		44-297			
<i>Nicotiana tabacum</i>	Pseudoplástico	n = 0.70 K = (x) ^{6.5}		44-800			
<i>Datura estramonium</i>	Plástico Cassson		450 PF	n.r	n.r	Reometro Weissenberg	Ballica <i>et al</i> , 1992
<i>Catharanthus roseus</i>	Pseudoplástico	n < 0.9	450 PS			Impulsor helicoidal	Jolicouer <i>et al</i> , 1992
<i>Periella frutescens</i>	Plástico Bingham	µ es función del tamaño de los agregados y de la forma celular	5-12.8 PS	37-2000	n.e.	Brookfield marca B tipo BL	Zhong <i>et al</i> , 1992
<i>Nicotiana tabacum</i>	Pseudoplástico	n = 0.6	250 PF	15-260	Elongadas	Brookfield R1; Stormer	Curtis y Emery, 1993
<i>Daucus carota</i>	Pseudoplástico						
<i>Papaver somniferum</i>	Newtoniano	µ es función de la morfología	250 PF	15-260	Redondas	Brookfield R1; Stormer	Curtis y Emery, 1993
<i>Glicine max</i>							
<i>Solanum tuberosum</i>							
<i>Morinda citrifolia</i>	Pseudoplástico	n = 0.8	450 PF			Impulsor doble - helicoidal	Kieran <i>et al</i> , 1993

n. e. no evaluado

n. r. no reportado

Cuadro 5. Características reológicas de los caldos de cultivos de células vegetales

En contraste, la reología del caldo filtrado (sin células) es reportada como Newtoniana, con viscosidades similares a las del agua. Por ejemplo, Tanaka (1982) reportaron esta reología para los cultivos de *C. tricuspidata*, *V. rosae* y *N. tabacum*. Mientras que Curtis y Emery (1993), lo hicieron para *Perilla frutescens*, *Papaver somniferum*, *G. max* y *N. tabacum*.

Sin embargo, existen evidencias experimentales que permiten suponer que la acumulación en el medio de compuestos extracelulares, tales como polisacáridos y proteínas, juega un papel importante en la reología del medio libre de células. Por ejemplo, Kato *et al* (1978) reportaron un aumento de la viscosidad del medio libre de células de *N. tabacum* desde 0.9 a 2.2 cP, durante el crecimiento del cultivo en un tanque de 30 L. Este ligero aumento en el valor de la viscosidad, fue asociado con la acumulación de una glicoproteína extracelular (Akiyama y Kato, 1981). Meijer *et al* (1994) observaron que los filtrados del caldo de cultivo de *N. tabacum*, presentaron un aumento considerable de su viscosidad durante el crecimiento de estos cultivos en un biorreactor de 3 L. Sin embargo, los autores no precisaron los valores de viscosidad ni las propiedades reológicas de los filtrados. Meijer *et al* (1994) proponen la hipótesis de que el cambio de la viscosidad fue debido a una capacidad de la línea celular para liberar al medio polisacáridos extracelulares.

Otros reportes muestran la acumulación de polisacáridos extracelulares en el filtrado del medio de cultivo de otras especies (Becker *et al*, 1964; Liao y Boll, 1972; Hale *et al*, 1987; Schipsema *et al*, 1991; Glicklis *et al*, 1998). Sin embargo, no ha sido esclarecida la causa de la acumulación de estos compuestos, ni la contribución que estos compuestos extracelulares pudieran tener en la viscosidad del medio. En el caso de cultivos de células animales superiores, se sabe que la presencia de aditivos en el medio de cultivo, tales como proteínas y agentes viscosificantes, es determinante para crecer estas células en fermentadores (Lakhotia y Papoutsakis, 1992; Wu, 1995).

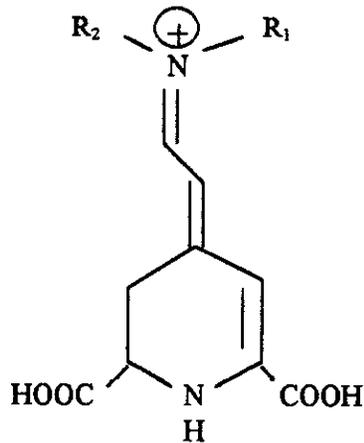
3.5. Cultivo de células de *Beta vulgaris* para la producción de betalainas, como modelo biológico de estudio.

En las últimas décadas, el uso de colorantes naturales (como las betalainas) ha cobrado un interés particular, especialmente por los problemas de toxicidad que se les atribuye a los colorantes de tipo sintético (Francis, 1994). Tal es el hecho que, en los Estados Unidos, la *Food & Drug Administration* (FDA), solamente permite el uso del colorante rojo 40. En México, la Secretaría de Salud permite el uso del rojo 40 y rojo 2.

El término betalainas corresponde a un grupo de moléculas que se subdividen en dos grupos: las betacianinas de color rojo a rojo-violeta y las betaxantinas de color amarillo (Steghis y Strack, 1991). Ambos grupos están formados por una estructura química básica que es el ácido betalámico, pero difieren en los radicales que se le unen (figura 1). En las betaxantinas se unen aminoácidos o una amina y presentan un máximo de absorción cercano a los 480 nm. En las betacianinas, el radical corresponde a una molécula de 3,4-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA) que puede estar glicosilada y presentan su máximo de absorción a los 540 nm (Böhm y Rink, 1986; Strack *et al*, 1993). Las betalainas son moléculas que se acumulan intracelularmente en vacuolas (Böhm y Rink, 1986).

Las betalainas son usadas como colorantes naturales en productos alimenticios, farmacéuticos y en cosméticos. Algunas de sus aplicaciones en alimentos incluyen la elaboración de helados, productos lácteos, embutidos, frutas en conserva, gelatinas y dulces (Stafford, 1991). Sin embargo, su sensibilidad a la temperatura, la luz y a pH's alcalinos limita su empleo en otros productos (Jiménez-Aparicio *et al*, 1997).

El uso extensivo de las betalainas está limitado porque éstas se encuentran confinadas a ciertos grupos taxonómicos y dada la complejidad de sus moléculas, es difícil obtenerlas por síntesis química (Leathers *et al*, 1992; Strack *et al*, 1993).



Betalainas

Betacianinas

(R₁-N-R₂. Residuos de ciclo- dopa
o ác. Estizolobico ciclizado)

Betanina

Betanidina

Prebetanina

Isobetanina

Isobetamidina

Isoprebetanina

Celosianina II

Amarantina

Betaxantinas

(R₁-N-R₂. Residuos de aminoácidos o aminas)

Vulgaxantina I

Vulgaxantina I

Portulacaxantina II

Portulacaxantina II

Figura 1. Estructura química de las betalainas

Por las razones anteriores, se reportan en la literatura estudios para la producción de betalainas por cultivo de células y tejidos vegetales de diferentes especies (Bömh y Rink, 1986). Para el caso particular de los cultivos de *B. vulgaris*, se han aislado y caracterizado callos con expresión fenotípica diferencial de la biosíntesis de betalainas que abarcan callos de color rojo-púrpura (betacianinas), amarillo (betaxantinas) e incoloros (Girod y Zyrd, 1991; Ontiveros, 1994; Ontiveros y Rodríguez, 1993).

El crecimiento de las células de *B. vulgaris* como cultivos en suspensión en matraces ha sido reportado por varios autores. Leathers *et al* (1992) reportan el crecimiento de cultivos de fenotipo rojo y naranja con rendimientos celulares de 12 y 16 g L⁻¹, respectivamente. En tanto que Rodríguez *et al* (1994a), reportan el crecimiento de un cultivo de fenotipo rojo-púrpura, con un rendimiento celular de 6 g L⁻¹. Asimismo, reportaron un efecto inhibitorio de la concentración de sacarosa (3 %) sobre la producción de betalainas.

Sin embargo, las células de *B. vulgaris* son consideradas como una especie frágil para crecer en fermentadores tipo tanque agitado, debido a los efectos del estrés hidrodinámico. Wagner y Vogelman (1977) reportaron lisis celular al intentar agitar con una propela marina cultivos creciendo en un fermentador *airlift* de 10 L, con una velocidad de agitación de tan solo 28 rpm. Los cultivos de *B. vulgaris* usados en ese estudio, presentaban un alto índice de agregación (diámetros de agregados de 3 a 8 mm).

Tomando en cuenta la fragilidad atribuida a esta especie vegetal, para crecer en fermentadores agitados mecánicamente, se ha propuesto y evaluado el uso de otros reactores considerados como de bajo estrés hidrodinámico. A este respecto, Jones *et al* (1987) propusieron el uso de un prototipo de biorreactor tipo *Taylor-Couette* libre de burbujas, obteniendo un crecimiento celular máximo de 9.5 g L⁻¹ con una producción de betalainas de 0.8 mg g⁻¹. Por otro lado, Khlebnikov *et al* (1995) construyeron y evaluaron el uso de dos biorreactores de lecho fluidizado de 5 y 50 L. En este estudio, los autores usaron cultivos desarrollados en matraces para comparar sus resultados obtenidos en el biorreactor. Los rendimientos celulares obtenidos en ambos sistemas fueron los mismos (16 g L⁻¹) pero la producción de betalainas fue superior en los cultivos crecidos en matraces (35 mg g⁻¹) que la de los cultivos en el fermentador (25 mg g⁻¹). Esta diferencia fue atribuida a problemas de transferencia de masa en los cultivos de fermentador, dado que el tamaño de los agregados alcanzó diámetros de 5 a 8 mm, mientras que los cultivos de matraces se desarrollaron como una suspensión fina y homogénea.

A pesar de que los cultivos de *B. vulgaris* fueron considerados como una especie frágil a las condiciones de estrés hidrodinámico, no hay pruebas experimentales para apoyar lo anterior. Aun más, Rodríguez *et al* (1994b) reportaron el crecimiento de cultivos de *B. vulgaris* en un fermentador tipo tanque agitado de 2 L operado a 150 rpm, donde obtuvieron un rendimiento celular máximo de 10 g L⁻¹.

4. Recapitulación de la revisión de la literatura

Cualquier organismo colocado fuera de hábitat natural, está expuesto a condiciones que pueden resultar adversas para su desarrollo. Caso particular es el que compete a procesos biotecnológicos basados en el desarrollo de cultivos celulares en biorreactores, en donde el mezclado y la aireación del biorreactor, impone condiciones de estrés que puede dañar en diferentes niveles a las células. En este contexto, las células vegetales han sido consideradas frágiles al estrés hidrodinámico presente en los fermentadores. Sin embargo, no existen los conocimientos básicos que demuestren lo anterior. Por el contrario, se han reportado algunos cultivos vegetales capaces de crecer en fermentadores agitados mecánicamente, bajo condiciones que podrían considerarse como letales para este tipo de células. Además, los estudios de resistencia celular efectuados en viscosímetros y por micromanipulación, indican que algunas especies de células vegetales son más robustas que los hongos, las células de animales superiores y las células de insectos.

En consecuencia, es necesario profundizar en el conocimiento de la capacidad de las células vegetales para desarrollarse en biorreactores. Asimismo, es importante conocer los efectos dañinos que pudieran tener diferentes condiciones de estrés hidrodinámico en el desarrollo de estas células. Todo ello con el objeto de poder establecer condiciones más propicias para el cultivo de células vegetales.

Esto implica contestar preguntas, tales como: ¿Es posible que bajo las condiciones usadas en biorreactores, se alcancen condiciones de estrés hidrodinámico que produzcan la lisis de las células vegetales?, ¿Cómo afectan diferentes condiciones de estrés hidrodinámico, sobre los parámetros cinéticos de las células y en su producción de metabolitos secundarios de interés?, ¿Cómo influye el estrés hidrodinámico a la agregación de los cultivos?.

Por otro lado, el conocimiento de las propiedades reológicas de los caldos es una de las variables físicas más importantes para definir las condiciones de estrés hidrodinámico del cultivo. Sin embargo, en el caso de caldos de células vegetales existen reportes muy escasos que documenten este tópico. Particularmente, existen reportes para cultivos de *N. tabacum*,

que sugieren que el crecimiento de células vegetales en fermentadores agitados mecánicamente, imponen condiciones de estrés hidrodinámico que favorecen cambios de la viscosidad del medio (Akiyama y Kato, 1981; Meijer *et al*, 1994). De ahí, la necesidad y la importancia de profundizar en el estudio de esta variable.

El cultivo de células de *B. vulgaris* productoras de betalainas, ha sido reportado como satisfactorio en matraces por diferentes autores (Rodríguez *et al*, 1994a; Leathers *et al*, 1992). Sin embargo, las células de esta especie fueron consideradas como frágiles para crecer en fermentadores con agitación mecánica (Wagner y Vogelmann, 1977; Taticek *et al*, 1991). En contraste a lo anterior, Rodríguez *et al* (1994b) reportaron el crecimiento de cultivos de *B. vulgaris* en un fermentador agitado mecánicamente, a baja velocidad de agitación (150 rpm). Debido esta controversia en opiniones, los cultivos de células de *B. vulgaris* constituyen un modelo biológico interesante para estudiar la fragilidad de esta especie para crecer en fermentadores y de los efectos del estrés hidrodinámico sobre éstas.

5. Objetivos

Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los efectos del estrés hidrodinámico sobre cultivos de células vegetales en fermentadores agitados mecánicamente.

Objetivos particulares

- Evaluar la resistencia de las células de *B. vulgaris* bajo una condición de estrés hidrodinámico definida, usando un viscosímetro.
- Analizar, bajo condiciones de crecimiento en fermentadores, los efectos del estrés hidrodinámico sobre cultivos de *B. vulgaris*, con relación a la resistencia celular, crecimiento, morfología y producción de betalainas.
- Caracterizar la reología de los caldos de fermentación de las células de *B. vulgaris*, crecidas en matraces agitados y en un fermentador agitado.

6. Materiales y Métodos

Material biológico

Se utilizaron callos de *B. vulgaris* variedad crossbar's Egyptian de fenotipo rojo obtenidos por Ontiveros (1994). Este tejido fue mantenido por resiembras periódicas cada 20 días en el medio de cultivo de Gamborg's B₃ (Gamborg *et al*, 1968), con sacarosa al 3 %, cinetina 0.2 mgL⁻¹, ácido 2,4-diclorofenoxiacético 0.02 mgL⁻¹ y phytage (1.2 g L⁻¹, Sigma). El pH del medio fue ajustado a 5.5 con NaOH antes de la esterilización. El medio para los cultivos en suspensión fue el mismo que para los callos, pero sin phytage. Las condiciones de incubación fueron: temperatura de 24 °C, fotoperíodo 16 h luz / 8 oscuridad e iluminación de 32 W m⁻². Los cultivos en suspensión se mantuvieron en agitación rotatoria a 100 rpm (agitadora Lab-line).

Los cultivos en suspensión se obtuvieron sembrando 4 g peso fresco (PF) de callos en un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía 30 mL de medio. Para obtener cultivos disgregados, se separaron por filtración los agregados celulares mayores a 250 µm. La preparación de inóculos se realizó en matraces de 500 mL.

Técnicas analíticas para evaluar daño celular

Tinciones de viabilidad. Se utilizó una combinación de las técnicas de tinción con azul de Evans y con diacetato de fluoresceína (Withers, 1985). Estas técnicas consideran la integridad de la membrana celular. En el caso del azul de Evans, las células muertas absorben el colorante y se observan azules en un campo de luz visible, mientras que las células vivas excluyen el colorante. Por otro lado, el diacetato de fluoresceína es un colorante con el cual las células vivas se pueden observar fluorescentes en un microscopio de fluorescencia. Esto sucede solo si existe actividad enzimática de esterasas intracelulares y cuando la integridad de la membrana evita la salida de este compuesto. En cada muestra analizada se contaron alrededor de 700 células con un microscopio Carl Zeiss (40 X). Se contabilizaron células individuales y células de pequeños agregados. En la figura 2 se presenta una fotografía de una preparación representativa de las células vistas al microscopio con esta tinción.

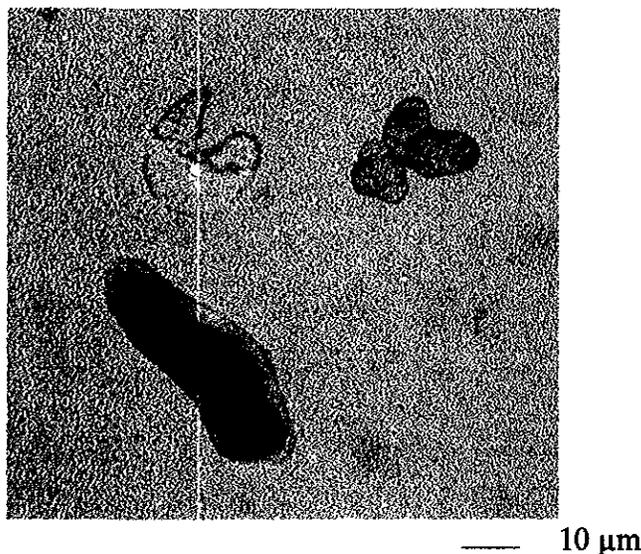


Figura 2. Fotografía del aspecto de las células de *B. vulgaris* en la evaluación de viabilidad. Las células muertas (oscuras) aparecen teñidas con el azul de Evans. Las células vivas se observan fluorescentes (verde), aun cuando estén acumulando betalainas.

Liberación de proteína. Se cuantificó por el método de Bradford (1976).

Tamaño de agregado celular. Se utilizó un contador de partículas Coulter Counter (Multisizer II). Las muestras de los caldos de cultivo fueron diluidas en una proporción 1 / 10 000 con una solución isotónica conteniendo glicerol al 10 % y después medidas con un tubo de apertura de 560 μ m. El diámetro de los agregados fue determinado en una computadora PC (Acc. Comp. Multisizer II). En este análisis se asume una forma esférica de los agregados celulares.

Métodos analíticos

Biomasa. El peso seco se determinó por filtración al vacío de una muestra del cultivo (3 mL) a través de un papel filtro de peso conocido (Whatman No. 1). Las células fueron secadas a 70 ° C, durante toda la noche.

Betalainas. Se determinaron por medio de la técnica reportada por Rodríguez *et al* (1994a).

Carbohidratos. Se cuantificaron por medio de la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois *et al*, 1956).

Estudios de sensibilidad celular en el viscosímetro

Se utilizó un viscosímetro marca Haake Rotovisco, RV20 con el sistema de cilindros concéntricos (sistema de agitación M5 y sensor MV1).

Se usaron 34 mL de cultivos en suspensión de *B. vulgaris*, que fueron sometidos a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$, bajo condiciones asépticas. Los tiempos de exposición evaluados fueron los siguientes: 1, 6, 12, 25 y 50 min. Al término de cada experimento se determinó de viabilidad y liberación de proteína. Posteriormente, los cultivos fueron resembrados en matraces Erlenmeyer de 125 mL e incubados en agitación rotatoria a 100 rpm. Después de 15 días se evaluó la viabilidad celular y la ganancia de peso seco.

Fermentador

Se utilizó un reactor de 2 litros (marca Applikon), con una turbina de disco de cuatro paletas, operado a 400 y 700 rpm., 0.1 vvm y $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Las dimensiones del fermentador se presentan en la figura 3. El pH y la tensión de oxígeno disuelto (TOD) fueron medidos con electrodos (marca Phoenix). La tensión de oxígeno disuelto fue controlada manualmente en un valor por arriba del 10 % de saturación por medio de inyección de oxígeno puro cuando fue necesario. En la figura 4 se presenta una fotografía del sistema de fermentación.

Parámetros hidrodinámicos

Potencia en matraces. La potencia suministrada en los matraces fue calculada siguiendo las ecuaciones reportadas por Díaz *et al* (1996). Estos autores proponen que la potencia volumétrica entregada al cultivo es una función de energía cinética adquirida por los matraces en cada oscilación, la cual puede calcularse por medio de la siguiente ecuación:

$$P = 4 \beta N^3 l^2 \delta \quad (9)$$

donde: β es una constante que considera el tipo de movimiento del matraz. En este estudio se uso un valor de 1, que corresponde a un movimiento uniforme. N representa la velocidad de agitación, l la distancia de oscilación en cada giro y δ la densidad del medio.

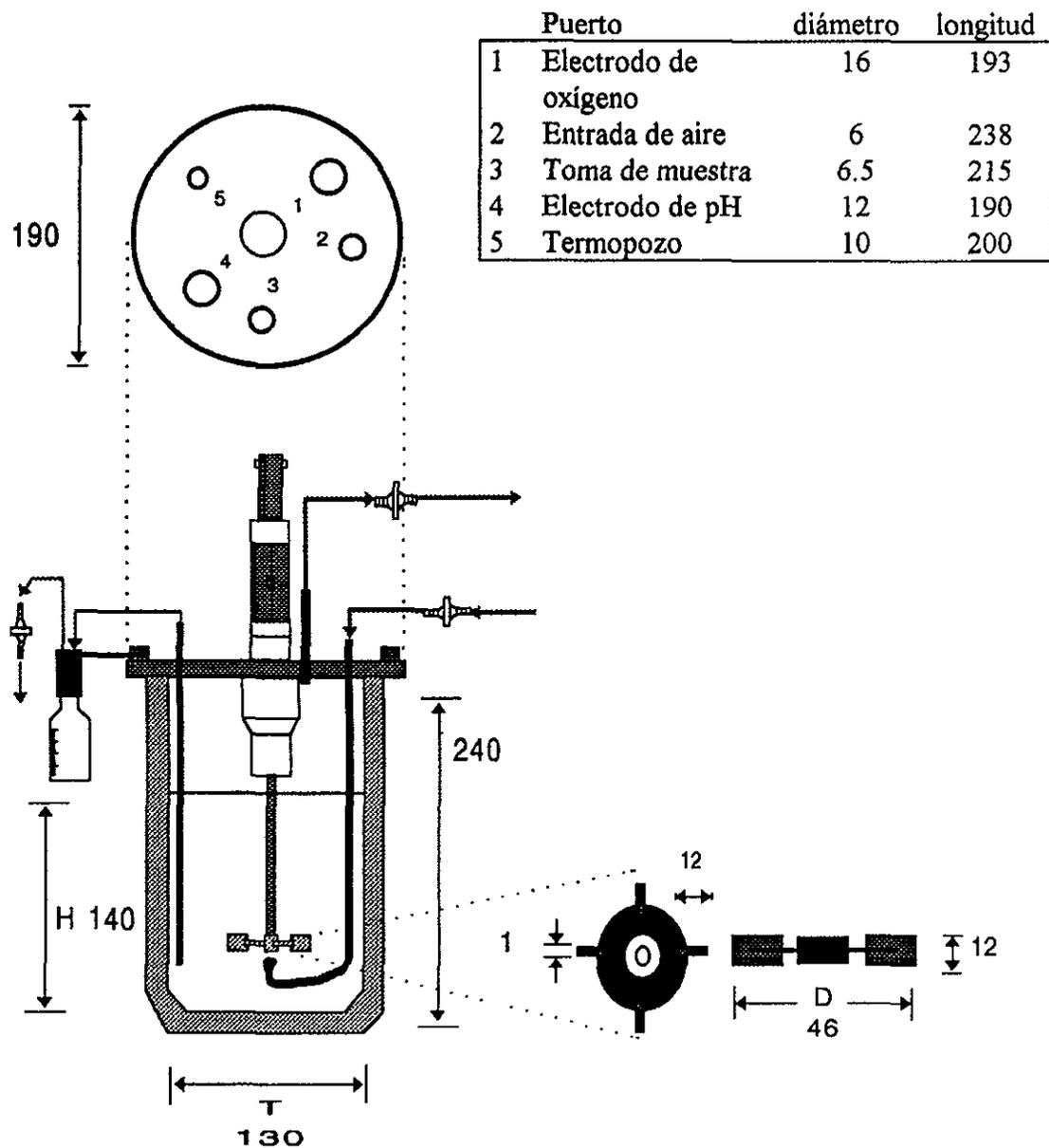


Figura 3. Dimensiones del biorreactor agitado mecánicamente (mm).

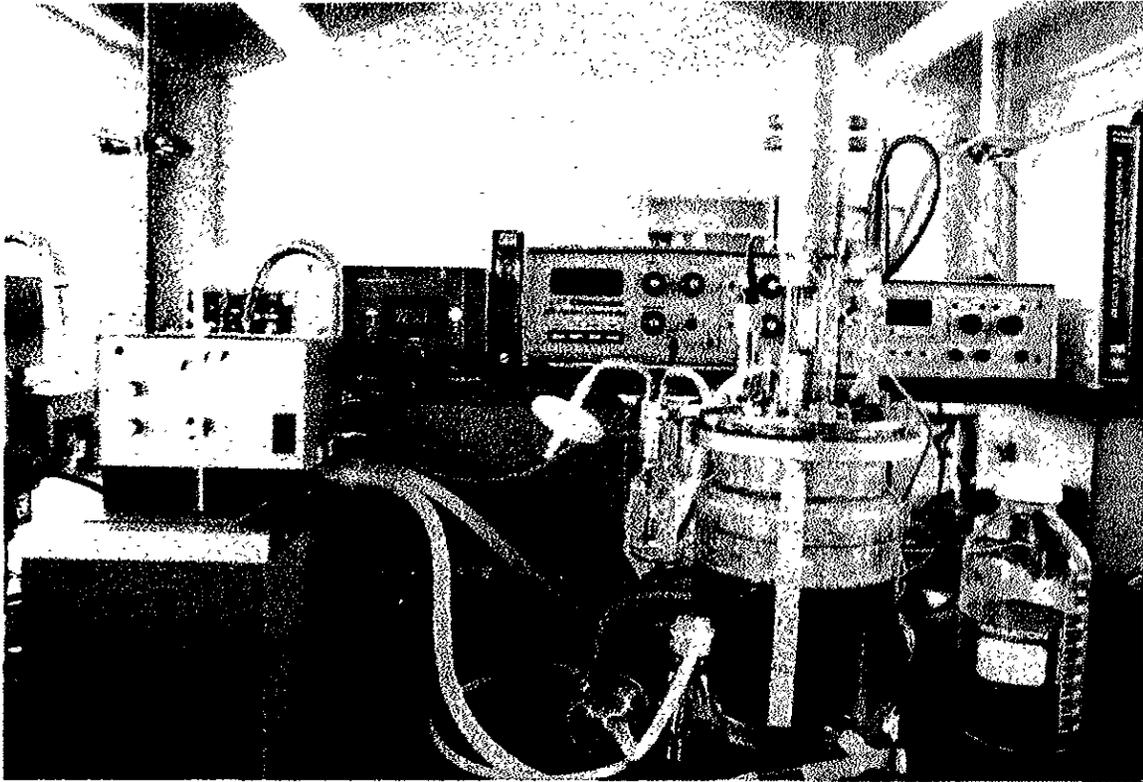


Figura 4. Fotografía del sistema de fermentación usado para el crecimiento de los cultivos de células de *B. vulgaris*.

Potencia en el fermentador. Se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P = \frac{\delta N_p N^3 D^5}{V} \quad (10)$$

donde: δ es la densidad, N_p representa el número de potencia (6), N la velocidad de agitación, D el diámetro del impulsor y V el volumen del medio.

Velocidad de deformación. Se calculó por medio de las ecuaciones propuestas por Bowen (1986). Se utilizó el cálculo de la velocidad de deformación promedio ($\dot{\gamma}_{av}$) y la velocidad

de deformación máxima ($\dot{\gamma}_{max}$) en el tanque de acuerdo a las ecuaciones 3 y 4 presentadas previamente en la sección 3.2.

Número de Reynolds. Fue calculado de acuerdo a la ecuación 6, presentada en la sección 3.2

Reología. Se determinó la reología del caldo y del medio libre de células utilizando un viscosímetro Hakke (Rotovisco RV20), con un sistema de medición de doble *gap* (NV). El rango de velocidad de deformación fue de 27 a 2 700 seg^{-1} , a una temperatura de 25 °C. El comportamiento no-Newtoniano, de tipo pseudoplástico, se caracterizó usando el modelo de la ley de la potencia (ec. 12):

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (12)$$

Caracterización de los compuestos extracelulares

Los caldos de cultivo de la fase estacionaria fueron usados para recuperar los compuestos extracelulares. El material extracelular del medio filtrado se precipitó con 3 volúmenes de etanol (95 %), almacenando la solución en refrigeración (4 °C), durante toda la noche. El precipitado fue centrifugado a 13,000 g (centrifuga marca Beckman, modelo Avanti-J25) durante 20 minutos y lavado con 10 mL de etanol. Posteriormente el material fue liofilizado (liofilizadora marca Labconco, modelo freeze dryer 18) y almacenado en refrigeración para su caracterización.

La presencia arabinogalactoproteínas (AGP) en el material precipitado, se determinó usando el ensayo de Yariv-fenilglicosidos (Gerrit-Jan y Clark, 1985). Esta prueba se considera como altamente específica para la identificación de AGPs. Esta prueba es altamente específica por la interacción química que se da entre las moléculas de AGPs y el reactivo de Yariv (1,3,5-tris(*p*-glicosil-oxifenilazo)-2,4,6-thihidroxibenceno), ocasionando la precipitación del complejo formado. Por lo cual, este reactivo ha sido usado para aislar AGPs de diferentes tejidos vegetales (Nothnagel, 1997).

El análisis por electroforesis de las muestras se realizó usando un minigel vertical de polyacrilamida (8%), bajo condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol como agente reductor (Laemmli, 1970). El punto isoeléctrico de las muestras fue determinado por electroforesis bajo condiciones no-disociantes y usando proteínas de pH-isoeléctrico conocido (entre 3.0 y 9.3, Sigma).

El material precipitado con etanol fue analizado en una columna (270 x 12 mm) empacada con DEAE-Sephadex A-25-120 (Sigma), usando la metodología reportada por Komalavilas *et al* (1991).

7. Resultados y Discusión

7.1. Estudios de resistencia de los cultivos en el viscosímetro

Debido a la incertidumbre sobre la resistencia de las células de *B. vulgaris* para crecer en fermentadores agitados mecánicamente, en esta etapa del trabajo, se presentan los resultados de la evaluación de la fragilidad de las células en un viscosímetro de cilindros concéntricos. Tomando en cuenta que estos cultivos habían sido crecidos en un biorreactor agitado mecánicamente a 150 rpm, condición a la que se presenta una velocidad de deformación máxima de 65 seg^{-1} (Rodríguez *et al*, 1994b). Se probó en el viscosímetro una condición de estrés 18 veces superior ($1,170 \text{ seg}^{-1}$), a la previamente reportada..

Los resultados, que se presentan en la figura 5 muestran que la viabilidad de las células de *B. vulgaris* disminuyó de 78 a 58 % durante los primeros 10 minutos. Sin embargo, después de 25 y hasta después de 50 minutos no se observaron daños mayores en la viabilidad de las células.

Estos resultados indican que en la población de células de *B. vulgaris* existe una fracción de células sensibles que sufren daños letales. Esta fracción representa solamente el 25 % de la población. Con esta prueba es difícil saber si al resto de la población que permanece viva le pudieran haber ocurrido daños subletales.

Por otro lado, se observó que la condición de estrés tuvo un ligero efecto sobre la distribución de los agregados celulares. En la figura 6 se puede observar como, después de 50 minutos de estar sometidos los cultivos al estrés hidrodinámico, aumenta la frecuencia de partículas de tamaños menores a $90 \mu\text{m}$ y disminuyen los agregados entre 90 y $180 \mu\text{m}$. Esto indica que los agregados celulares de *B. vulgaris* sometidos a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$, pudieran estar fragmentándose o bien que las células de la periferia de los agregados estuvieran separándose de los mismos.

En observaciones al microscopio de los cultivos de *B. vulgaris* sometidos a estrés durante 50 min, se encontraron algunas células con la membrana y la pared celular rota. Este tipo de daño se encontró principalmente en células de agregados pequeños. Esto sugiere que la ruptura de la membrana y de la pared celular sea debida a la fragmentación de los agregados celulares (figura 7).



Figura 7. Microfotografías de células de *B. vulgaris* mostrando daños de ruptura de la pared y membrana al estar sometidas a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$ en un viscosímetro.

Otro de los parámetros considerados para medir el daño celular, fue la liberación de proteína intracelular. Las células de *B. vulgaris* sometidas a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$ liberaron hasta un 10 % de proteína intracelular durante los primeros 10 minutos. Sin embargo, no se observó un mayor efecto en las células expuestas por más tiempo (figura 8). El perfil de esta variable fue muy similar al observado mediante las tinciones vitales (figura 5). Sin embargo, el porcentaje de daño observado con la liberación de proteína, fue menor al obtenido con las tinciones de viabilidad. Estos resultados muestran que los insultos físicos ocasionados por el estrés hidrodinámico, producen daños en la integridad de las membranas celulares (tinción con azul de Evans y diacetato de fluoresceína) o posiblemente en enzimas con actividad esterasa (tinción con diacetato de fluoresceína), sin que exista la ruptura de las cubiertas celulares y la liberación de proteína.

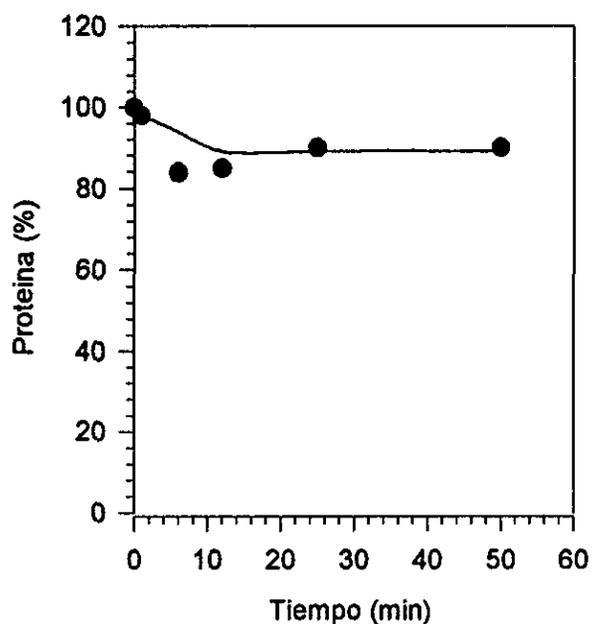


Figura 8. Liberación de proteína en cultivos de *B. vulgaris* sometidos a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$.

Para determinar la capacidad de crecimiento de las células sobrevivientes al estrés en el viscosímetro, se evaluó el crecimiento de los cultivos en matraces. Comparando los rendimientos celulares entre los cultivos sometidos a estrés en el viscosímetro, con cultivos testigos no sometidos, no se observaron diferencias significativas (figura 9), por lo que se infiere que las células no tuvieron daños subletales severos que afectaran su desarrollo futuro en matraces.

Estos resultados demuestran que las condiciones de estrés hidrodinámico pueden ocasionar daños en las células de *B. vulgaris*, que incluyen la pérdida de la integridad de la membrana y la lisis celular. Sin embargo, existe una población de células de *B. vulgaris* que es resistente a condiciones de estrés hidrodinámico superiores a las máximas que pudieran presentarse en los fermentadores agitados mecánicamente. Esta resistencia de las células de *B. vulgaris*, es comparable a la reportada en otras especies en estudios en viscosímetros, por

ejemplo: *D. carota* (Dunlop y Namdev, 1993), *Periella frutescens* (Zhong *et al*, 1995) y *M. citrifolia* (MacLoughlin *et al*, 1997). Una discusión integral de los resultados presentados en esta sección con los resultados del resto del trabajo, se presenta en la discusión general (sección 7.5)

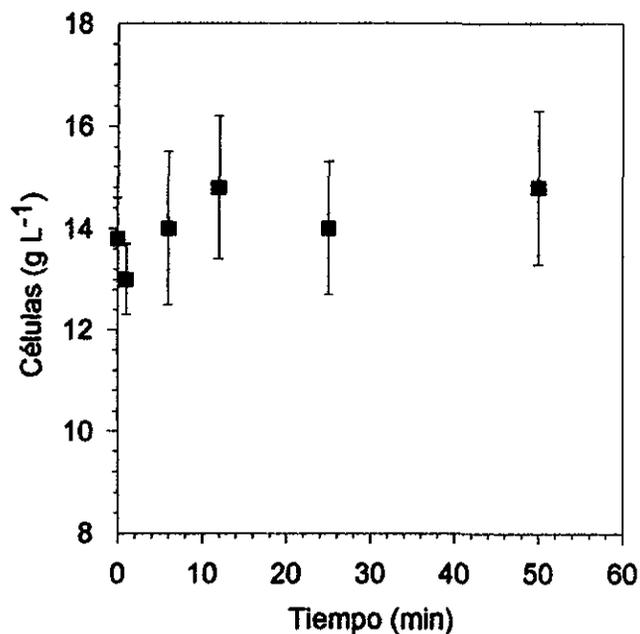


Figura 9. Crecimiento de los cultivos de *B. vulgaris*, 15 días después de someterlos a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$ en un viscosímetro de cilindros concéntricos.

7.2. Presentación del artículo: Broth rheology, growth and metabolite production of *B. vulgaris* cultures conducted in shake flasks and in a stirred tank

Tomando en cuenta los resultados de los estudios en el viscosímetro (que indicaron que las células de *B. vulgaris* podían soportar una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$ durante un lapso de hasta 50 minutos), se decidió analizar cuales son los efectos del estrés hidrodinámico bajo condiciones de crecimiento en biorreactores. Se propuso el uso de cultivos en matraces agitados y en un fermentador agitado mecánicamente. Estos fueron seleccionados con base varias consideraciones. Los matraces agitados, representan una condición de crecimiento ampliamente utilizada en el laboratorio para el crecimiento de los cultivos de células vegetales. Las condiciones hidrodinámicas para los cultivos que se desarrollan en matraces agitados, son consideradas como de bajo estrés. Por otro lado, se consideró el uso de un fermentador agitado operado con una agitación 2.6 veces superior a la reportada por Rodríguez *et al* (1994b). Bajo esta condición de operación, las células de *B. vulgaris* se expusieron a una velocidad de deformación máxima de 176 seg^{-1} .

Una manera de comparar el nivel de estrés hidrodinámico entre los matraces y el fermentador, fue a través del cálculo de la potencia volumétrica en cada sistema. La potencia para matraces agitados (0.011 kW m^{-3}) es un orden de magnitud inferior a la calculada para el fermentador (0.313 kW m^{-3}).

Los resultados de este estudio se integraron para su presentación en el artículo “Broth rheology, growth and metabolite production of *B. vulgaris* cultures conducted in shake flasks and in a stirred tank”, que fue aceptado para su publicación en la revista *Enzyme Microbial Technology* (anexo).

Los resultados demuestran que los efectos ocasionados por el aumento del estrés hidrodinámico sobre los cultivos de *B. vulgaris* fueron la disminución en la velocidad de crecimiento celular y en los rendimientos de biomasa y betalainas. Además, se reporta por primera vez, que un aumento en el estrés hidrodinámico determina un cambio en la

viscosidad del medio y en la reología del mismo. Los cultivos de *B. vulgaris* crecidos en el fermentador presentaron un aumento de la viscosidad y un cambio en la reología del caldo filtrado (libre de células). Este fenómeno fue asociado con una respuesta de las células a las condiciones de estrés, en donde las células de *B. vulgaris* secretaron al medio arabinogalactoproteínas y polisacáridos. La acumulación de estas moléculas extracelulares, juegan un papel importante en el incremento de la viscosidad del medio y en el cambio de su comportamiento reológico. Este fenómeno parece ser análogo a la respuesta de los tejidos vegetales en condiciones *in vivo*, que ante un daño por lesión, las células secretan sustancias que actúan como moléculas de defensa química o como barreras de protección. En los cultivos de *B. vulgaris* crecidos *in vitro*, una consecuencia que tiene el aumento de la viscosidad, es que favorece una disminución de la turbulencia del sistema y permite condiciones hidrodinámicas más favorables para el crecimiento de las células.

Associate Editor: Robert D. Schwartz, Ph.D.

23 December 1998

Dr. Enrique Galindo
Department de Bioingenieria
Instituto de Biotecnologia
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Apdo. Postal. 510-3
Cuernavaca, 62250
Morelos, MEXICO

Abbott Laboratories
Fermentation Development
D-451/R1B-3
1401 Sheridan Road
North Chicago, IL 60064
Tel: (847) 937-8875
Fax: (847) 938-7509
E-mail:
robert.schwartz@abbott.com

Dear Dr. Galindo:

I am pleased to inform you that your manuscript M98-1058P revised entitled, "Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture..." is acceptable for publication. It may be further copy-edited for style and format.

Please complete the "copyright Transfer" and return to Elsevier, attn. E. Vogelsberg.

In the event that any significant matters arise I will be back in touch with you.

Thank you for submitting your work to ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY.

Sincerely yours,



Robert D. Schwartz, Ph.D.
Associate Editor

Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank

Mario Rodríguez-Monroy and Enrique Galindo***

*Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología.

Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Post. 510-3

Cuernavaca, 62250, Morelos , México.

**Departamento de Biotecnología,

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN.

Apdo. Post. 24

Yautepec, 62730, Morelos, México.

* Corresponding author

Dr. Enrique Galindo

Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología,

Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal. 510-3

Cuernavaca, 62250, Morelos, México.

Tel: (52) (5) 6 22 76 51

Fax: (52) (73) 17 23 88

e-mail: galindo @ ibt. unam. mx

Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank

Summary

Cells of *Beta vulgaris* have the ability to grow in a stirred tank under an impeller tip speed as high as 95.3 cm seg^{-1} . Comparing this system with cultures performing in shake flasks, a decrease of the cell concentration, betalains production, and growth rate was observed. However, the kinetic profiles of aggregates size and cellular viability were practically the same. The cultures carried out in the fermentor showed a major accumulation of extracellular arabinogalactoprotein and polysaccharide, which is an indication of the cell response to hydrodynamic stress. These extracellular molecules produced a considerable change in the rheology of cell-free medium. This change in the rheology can be playing an important role in the reduction of the actual hydrodynamic stress during cultivation.

Key words: Hydrodynamic stress, rheology, betalains and arabinogalactoprotein.

Introduction

Plant cell culture in bioreactors has been considered as an alternative technology to obtain natural compounds of use in the pharmaceutical and food industries. Over the last thirty years, a variety of bioreactor configurations have been evaluated for the culture of plant cells. Reviews on this topic are available.¹⁻³ Generally, the stirred tank bioreactor represents, from an economical point of view, the most attractive option. However, because plant cells are obviously more fragile than microorganisms, the hydrodynamic stress generated in stirred tanks can be a factor that limits the growth of plant cells.^{4,5}

Hydrodynamic stress in bioreactors has been associated with injuries to the plant cells. The damage produced to cells may be either a lethal or sublethal effect, depending on the intensity of the hydrodynamic stress and the particular cellular species and line.^{3, 6} Some characteristics of the plant cell cultures conducted in bioreactors have been associated with the damage caused by high hydrodynamic stress. They include the alteration of aggregates size,⁷ the release of intracellular compounds,^{8,9} variations in specific respiration rate,^{7,10} loss of viability,¹¹ decrease in biomass production¹⁰ and changes in the cell wall composition.¹² On the other hand, shake flasks (considered a system with low stress conditions to grow plant cells) have been used successfully in order to cultivate plant cells.¹

As in other submerged culture systems, rheology of plant cell culture is important in determining bioreactor power requirement and mass transfers characteristics. However, there are very few reports on the subject. A summary of relevant studies was published recently by Kieran *et al.*,³ who indicated that the majority of suspension cultures investigated

exhibit non-Newtonian, shear-thinning characteristics. In such cultures, the pseudoplasticity of the broths were determined mainly by the biomass concentration, cellular aggregation, and morphology of the cells.^{13, 14} In contrast, the rheology of cell-free medium has been reported as Newtonian with viscosity similar to that of water for cultures of *Perilla frutescens*,¹⁵ *Papaver somniferum*,¹⁴ *Glycine max*,¹⁴ and *Nicotiana tabacum*.¹⁴ However, accumulation of extracellular compounds such as polysaccharides and proteins may be important in the rheology of the cell-free medium. At this respect, cultures of *N. tabacum* grown in a 30 L fermentor accumulated an extracellular glycoprotein, which increased the viscosity of the filtered medium from 0.9 to 2.2 cP during cultivation.^{16, 17} In other study, Meijer *et al.*,⁹ reported that the supernatants of the samples of *N. tabacum* growing in batch at two tip speeds (35 and 236 cm seg⁻¹), were increasingly viscous at day 6th, but the viscosity was not measured. These results were associated with an ability of that cell line to release substantial amounts of extracellular polysaccharides into the medium.⁹ However, the contribution of those extracellular compounds to broth viscosity has not been established.

Cultures of *Beta vulgaris* produce betalains as an intracellular metabolite and these compounds are used as natural dyes in food and pharmaceutical industries.¹⁸ *B. vulgaris* cultures carried out in shake flasks have been reported as having no problems to grow.^{19, 20} The final biomass concentration of *B. vulgaris* cultures growing in shake flasks have been reported from 15 to 17 g DW L⁻¹, with betalains production in the range from 3 to 30 mg g⁻¹ DW. Nevertheless, the cells of *B. vulgaris* grown in a fermentor stirred with a propeller at a tip speed of 15.8 cm seg⁻¹ experienced lysis.²¹ In consequence, *B. vulgaris* has been considered a very fragile specie for growing in stirred tanks.^{1,21} The use of bioreactors

agitated with air was considered as an alternative for growing *B. vulgaris* cells. Biomass concentrations in such bioreactors configurations have been reported from 10 to 17 g DW L⁻¹, with betalains production from 2 to 30 mg g⁻¹ DW.^{22,23} The use of a stirred tank to grow *Beta vulgaris* cells was reconsidered by Jiménez.²⁴ He reported a biomass concentration of 10 g L⁻¹ and betalains production of 95 mg g⁻¹ DW, in cultures performed in a 2 L bioreactor, equipped with a four blades impeller at a tip speed of 36.1 cm seg⁻¹.

This work presents a comparative study between cultures *B. vulgaris* grown in Erlenmeyer flasks and in a stirred tank considering cellular growth, broth rheology and betalains production.

Materials and Methods

Cell cultures. Seeds of *Beta vulgaris* L. var. crossbar's Egyptian were germinated *in vitro*, and hypocotyledon tissue was used to induce callus. Callus were grown on Gamborg's (B₅) medium,²⁵ supplemented with sucrose (30 g L⁻¹), 2,4 diclorophenoxy-acetic acid (0.02 mg L⁻¹), kinetin (0.2 mg L⁻¹) and phytigel (1.2 g L⁻¹, Sigma) was added as a support agent. Medium pH was adjusted to 5.5 with NaOH prior to sterilization. The suspension medium was the same used for callus development without phytigel.

Cell suspension cultures began with 4 g of fresh weight of callus in a 125 mL Erlenmeyer flask with 30 mL of medium. The agitation conditions were 100 rpm (a shaking speed typically used to grow plant cells in shake flasks) in an orbital shaker (Lab-line) at 26 ± 2 °C. In order to obtain a homogeneous culture, in every subculture, cellular aggregates

having a size larger than 250 μm was eliminated with a sieve. The inocula produced in 500 mL shake flasks were used in shake flask and fermentor cultures.

Flask and bioreactor cultures. Erlenmeyer flasks of 125 mL with B₅ medium (30 mL) were inoculated. Every three days, two flasks were removed for analytical measurements. On the other hand, a 2 L fermentor (Applikon) with a jacketed glass vessel and a multiport, stainless steel head plate was used. One turbine impeller (impeller to tank diameter of 0.36) with four blades (46 mm) operating at a tip speed of 95.3 cm seg^{-1} was used (agitation speed of 400 rpm). The impeller was positioned 26 mm above the bottom of the vessel. Aeration (0.1 v.v.m) was provided via a ring sparger positioned below the turbine. Broth pH and dissolved oxygen tension (DOT) were monitored with Phoenix electrodes. DOT was manually maintained above 10 % of saturation by gassing oxygen, when this was necessary. Temperature was maintained at 26 ± 2 °C.

The fermentation vessel (containing 1.5 L) was inoculated with 150 mL of 13-days-old suspension culture grown on B₅ medium in a 500 mL shake flask. Every three days, a sample of 20 mL was removed from the vessel for its analysis.

The maximum shear rate ($\dot{\gamma}_{\text{max}}$) was calculated according to Bowen.²⁶

$$\dot{\gamma}_{\text{max}} = 9.7 \text{ N } (Di/T)^{0.3} (Di/W)$$

where: T is the vessel diameter (cm) and W is the impeller blade width (cm).

Reynolds number for pseudoplastic fluids (Re) was calculated as follows:

$$R e = \frac{D i^2 N^{2-n} \delta}{0.1 K} \left[\frac{n}{6n + 2} \right]^n$$

where: δ is the density (g cm^{-3}), n is the flow behavior index (-) and K is the fluid consistency index (g cm seg^{2-n}) of the Ostwald de Weale model (power law, $\tau=K \dot{\gamma}^n$).

Analytical methods

Biomass. Dry weight (DW) was determined by filtration of 3 mL aliquots through a paper filter of known dry weight. The cells were dried to constant weight (70 °C, 1 day). Biomass concentrations reported were the average of two independent runs.

Betalains,²⁰ protein,²⁷ and carbohydrates²⁸ were measured following previously reported techniques.

Viability. The membrane integrity was measured by the Evan's blue dye exclusion test and by fluorescein diacetate staining. A Carl Seizz microscope was used for counting about 700 cells (40 X). In general, single cells or small groups of cells were easily observed and counted.

Cellular aggregates size. Size distribution of cellular aggregates were monitored during the fermentation using a Coulter Counter (Multisizer II). Samples of the broth were diluted 1/10 000 (v/v) with an isotonic solution containing glycerol (10 %) and then measured using a tube with an aperture of 560 μm . Aggregate diameter was determined with a PC software (Acc. Comp. Multisizer II). This analysis assumes a spherical shape of the aggregate.

Viscosity measurement. The viscosity of the whole broth and the filtrate was measured using a Hakke viscometer (Rotovisco RV20), equipped with a double gap system (NV). The range of shear rate was from 27 to 2 700 seg^{-1} , at 25 °C. Rheological behavior was adjusted to the Ostwald de Weale model (power law):

$$\tau = K \dot{\gamma}^n$$

where: τ is the shear stress (Pa), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (seg^{-1}), K is the consistency index (Pa seg^n) and n is the flow behavior index (-).

Analysis of extracellular compounds. Samples of *B. vulgaris* of the stationary phase of growth were used to recover the extracellular compounds. High molecular mass material was precipitated from cell-free medium with three volumes of ethanol at 4 °C and left overnight. Precipitate was centrifuged at 13,000 g during 20 minutes and washed twice. The precipitate was dialyzed against water during 24 hrs and this product was lyophilized for the analytical characterization. The precipitated material was assayed with the Yariv reagent using the methodology reported by Gerrit-Jan and Clark.²⁹ This is a specific essay to determine arabinogalactoprotein (AGP). Molecular weights of the precipitated proteins were estimated by electrophoretical analysis using a minivertical gel of polyacrilamide (8 %) under denaturing conditions with sodium dodecyl sulfate. Isoelectric point was determined by electrophoresis under non-dissociating conditions and using proteins of known isoelectric-pH (between 3.5 and 9.3, Sigma). A resuspension of the ethanol precipitate was fractionated in a column of Sephadex-G50 (Sigma), using the methodology reported by Komalavilas *et al.*³⁰

Results and Discussion

Growth curves of *B. vulgaris* cells cultivated in shake flasks and in a stirred tank bioreactor are shown in figure 1A. The pH along the cultures varied from 4.9 to 5.5 in the two systems (data not shown). The biomass growth rates were 0.06 and 0.02 days⁻¹ and the maximum cell concentration were 12.5 and 10.1 g DW L⁻¹ in shake flasks and stirred tank, respectively. The cultures of *B. vulgaris* growing in shake flasks showed a maximum betalains concentration of 26 mg g⁻¹ DW (13th day). This value is 62.5 % higher than the maximum betalains concentration in the cultures developed in the stirred tank (16th day) (figure 1B).

Cell viability was about 80 % in the two systems until the 13th day in the shake flask and until the 17th day in the stirred tank. In the stationary phase, however, the cell viability fell in either case (figure 2A). The evolution of cells aggregates mean size is shown in figure 2B. The mean aggregate diameter in either systems was very similar (70-100 µm).

The decrease of biomass production, betalains concentration, and cellular growth rate obtained in cultures developed in fermentor was not a consequence of lysis, because the viability was similar in both systems (80 %, figure 2A) and microscopic observations did not reveal differences in the cell morphology between both systems. On the other hand, the DOT of the cultures growing in the fermentor was maintained above 10 % and cell aggregates profile was similar in the cultures performed in shake flasks and stirred tank (figure 2B). For this reason, oxygen transfer limitation is not likely to be responsible for the growth reduction and betalains production in the fermentor. Our results are in agreement with those reported by Chung-Hang *et al*¹⁰, who reported a similar effect in cultures of *N. tabacum*, which was

produced by the hydrodynamic stress rather than by an inadequate oxygen mass transfer in the fermentor.

Conditions prevailing in a stirred tank have been considered lethal for growing *B. vulgaris* cells.^{1,21} However, our results showed that this particular cell line has the ability to grow in a stirred tank even at an impeller tip speed of 95 cm seg⁻¹ (maximal calculated shear rate of 176 seg⁻¹). It is possible that the *B. vulgaris* cell line used in this work may be a shear-tolerant one, as a consequence of the number of subcultivations after initiation. This line of *B. vulgaris* cultures has been growing *in vitro* for six years. Our results are in line with those reported by other authors,^{3,9} who have shown that the ability of other plant species to grow in a stirred tank might be governed by the species, their *in vitro* age, and the growth conditions. Our results are as well in agreement with the considerations of Kieran *et al.*,³ who indicated that shear sensitivity of plant cells may not be as important, in some cases, as initially anticipated by others.^{1,2}

The broth from the cultures carried out in shake flasks was Newtonian at low biomass concentrations (4.1 g DW L⁻¹), with viscosity values similar to the filtered (cell-free) medium (figure 3A). However, a non-Newtonian behavior (pseudoplastic) was observed in the broth containing high biomass concentration (9.8 g DW L⁻¹). Nevertheless, all the samples of filtered medium were Newtonian along the culture. On the contrary, for the cultures developed in the stirred tank (figure 3B), a pseudoplastic behavior was observed in the whole broth as well as in the cell-free medium (8.7 and 10.1 g DW L⁻¹).

The behavior of the power law indexes (n and K) for cultures grown in shake flasks was similar to that obtained in the cultures carried out in the stirred tank (figure 4). n decreased from 1 to 0.6 until the 8th day and thereafter was nearly constant (0.55-0.65). On the other hand, K increased during the fermentation from 1 to 100 mPa segⁿ.

Figure 5 shows that the extracellular protein in the stationary phase of the cultures developed in the stirred tank (100 mg L⁻¹) was eight-fold higher than in the cultures performed in shake flasks (12 mg L⁻¹). However, the viability in the two systems was similar (figure 2A) and, therefore, the possibility of cellular lysis as the source of extracellular protein is very unlikely. One explanation for this result is that the cells can be secreting proteins and polysaccharides as a response to a sublethal cell damage produced by the high hydrodynamic stress present in the fermentor. This phenomenon is analogous to what has been observed *in vivo*: plant tissue in response to stress or injuries, secrete exudes containing proteins and/or polysaccharides.³¹⁻³³ In submerged culture, the extracellular medium of such cells can be considered to be an extension of the cell wall space.

The modification of the rheology of the cell-free medium (from Newtonian of low viscosity obtained in shake flasks to pseudoplastic of high viscosity in the fermentor, figure 3) was associated with a higher accumulation of extracellular compounds obtained in the *B. vulgaris* cultures developed in the stirred tank (figure 5). Using the calculated average shear rate in the fermentor (77 seg⁻¹), the values of the broth's viscosity of both systems (as if they were in the fermentor) were calculated and they are depicted in figure 6A, as a function of cell concentration. At low biomass concentration (4 and 5 g DW L⁻¹) the

viscosity in either systems was near to 0.0015 Pa seg. The viscosity of the shake flasks broths changed only at high biomass concentrations (10 g DW L⁻¹), while the viscosity of the stirred tank broths increased at lower biomass concentration (7 g DW L⁻¹) and they rose sharply (up to 0.021 Pa seg) for higher biomass concentrations. This sharp increase in viscosity of the broths obtained in the stirred tank was coincident with the increase in extracellular protein accumulation in the cell-free culture medium in the fermentor (6th day, figure 5). It is evident that the concentration of extracellular compound determines significantly the broth viscosity in stirred tank cultures. Extracellular accumulation of proteins^{9,16} and polysaccharides^{34,35} has been reported for cultures of other species grown in shake flasks or in fermentors. However, this is the first time that is reported for *B. vulgaris* and that a comparative and systematic study shows that the extracellular accumulation of compounds determines a change in the rheology of cell free medium in plant cell cultures.

The importance of extracellular compounds on the rheology and on the hydrodynamics of the cultures was analyzed comparing the broths rich in extracellular compounds (stirred tank) with those containing virtually no extracellular compounds (shake flasks) at the same biomass concentration. Reynolds number of the fermentor was calculated for comparison purposes. The Reynolds number that would result if the shake flask broths were in the same stirred tank at the same agitation conditions was evaluated as well. The results are shown in figure 6B. The calculated Reynolds number with the rheological data of the broths obtained in shake flasks decreased slightly (from 2.5 x 10⁴ at 4 g DW L⁻¹ to 1 x 10⁴ for biomass concentrations higher than 6 g DW L⁻¹). On the other hand, Reynolds number (calculated with the rheology of the broths with high concentration of extracellular compounds, *i.e.* that

produced in the stirred tank) showed a considerable drop (from 1×10^4 at 4 g DW L^{-1} to 5×10^2 at 10 g DW L^{-1}). These results indicated that the ability of *B. vulgaris* cells to grow in the stirred tank would be related to the secretion of extracellular compounds, which produced a considerable reduction in the conditions of turbulence in the fermentor (figure 6B). The role that these compounds are playing in plant cell cultures, could be similar to the protection effects that the addition of polymers (such as Pluronic F-68, polyetilenglycol, dextran, methylcellulose and bovine serum albumin) provides in animal cell cultures. These compounds help to minimize the detrimental effects due to agitation or aeration.^{5,36} For example, Lakhotia and Papoutsakis³⁷ found that the cell death of bovine embryonic kidney cells was considerably reduced by an increase of 1.4 cP in the medium viscosity (which decreased the Reynolds number from 4.4×10^3 to 1.6×10^3).

The essay of the ethanol precipitated material with the Yariv reagent resulted positive. This essay is a specific test for AGP identification³³. Thus, AGP can be considered as a component of material precipitated. Using the Yariv reagent, several AGP have been detected and isolated from other plant material.^{31, 33} The electrophoretical analysis revealed one band (molecular weight 116,000 da and isoelectric point of 4). AGP is a kind of glycoprotein of the cell wall which is water soluble and its isoelectric point is acidic. These compounds in plant tissues *in vivo* are exposed on the outer side of the cellular membrane and, frequently, inside of the middle lamella.^{32, 33} In addition, the fractionation of the precipitated material by chromatography showed a glycoprotein compound (91 %) as the main component and a small proportion corresponded to a polysaccharide-type compound (9 %).

Under the microscope, *B. vulgaris* cells grown in shake flask and fermentor did not show detectable differences that might suggest that these compounds can be, for instance, a product of partial removal of the cell wall by shear force. In fact, the evolution of mean aggregate size was very similar in both systems (fig 2B). Therefore, these compounds can be considered as the result of cellular secretion rather than a lysis product. Extracellular AGP has been obtained from other plant suspension cultures.³³ Cell-free medium of *N. tabacum* cultures growing in fermentor has been reported to contain AGP, which produced a small increase in the viscosity of the cell-free medium (0.2 to 2.2 cP).^{16,17} It has been shown^{31, 33} that plant tissue responds to stress or injuries by secreting copious amounts of gums, which contains AGP, polysaccharides and other molecules. The results obtained in this work showed that AGP and at least one polysaccharide are being secreted as soluble molecules in the medium by *B. vulgaris* cells as a response to the hydrodynamic stress.

Conclusions

Beta vulgaris cultures developed in shake flasks and in a stirred tank were analyzed in terms of cell growth, betalains production and broth rheology. Biomass production, betalains concentration, and growth rate in the cultures growing in the fermentor were lower than those observed in the shake flasks. However, the evolution of aggregates size and cellular viability did not show differences between both systems. The cultures developed in the fermentor showed a considerable higher accumulation of extracellular protein than those carried out in shake flasks. These differences were associated with a cellular secretion of protein (AGP) and polysaccharide, as a response to a sublethal damage caused by

hydrodynamic stress in the fermentor. The high accumulation of extracellular compounds caused a change in the rheology of the cell-free medium: it was Newtonian and of low viscosity in the cultures developed in shake flasks and of high viscosity and pseudoplastic for those performed in the stirred tank. The rheology change plays an important role in the reduction of turbulence, allowing the cells to grow.

Acknowledgements

This work was partially financed by DGAPA/UNAM (grant IN-503295), and CONACyT (grants 25165-B and 26405-N). M. Rodríguez-Monroy is indebted to COFAA-IPN and CONACyT for the doctoral fellowship awarded. We thank Dra. Gladys Casaab, Edith García and Gabriela Sepúlveda for assisting in extracellular compounds analyses. Helpful discussions with Drs. O.T. Ramírez, M. Rocha, A. López-Munguía, L. Serrano and C. Peña are acknowledged with thanks.

References

- 1.- Taticek, R., Moo-Young, M. and Legge, L. 1991. The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 24: 139-158.
- 2.- Wen, W. 1995. Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 50: 189-230.
- 3.- Kieran, P., Mac Loughlin, P. and Malone, D. 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J. Biotechnol.* 59: 39-52.
- 4.- Humphrey, A. E. 1994. Plant cells as chemical factories: control and recovery of valuable products. In: *Advances in Bioprocess Engineering.* (Galindo, E. and Ramírez T., eds.). Kluwer Academic Pub., pp. 103-107.

- 5.- Joshi, J., Elias, C. and Patole, M. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Biochem. Eng. J.* **62**: 121-141.
- 6.- Meijer, J. , ten Hoopen, H., Luyben, K. and Libbenga, R. 1993. Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: A literature survey. *Enzyme Microb. Technol.* **15**. 234-238.
- 7.- Takeda, T., Seki, M. and Furusaki, S. 1994. Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. *J. Chem. Eng. Jpn.* **27**(4): 466-471.
- 8.- Hooker, B., Lee, J. and An, G. 1990. Cultivation of plant cells in a stirred vessel: effect of impeller design. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 296-304.
- 9.- Meijer, J., ten Hoopen, H., van-Gameren, Y., Luyben, K. and Libbenga, K. 1994. Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. *Enzyme Microb. Technol.* **16**. 467-477.
- 10.- Chung-Han, H., Henderson, K. and Rorrer, G. 1995. Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **11**: 140-145.
- 11.- Zhong, J., Fujiyama, K., Seki, T., Yoshida, T. 1994. A quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens* in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 649-654.
- 12.- Tanaka, H., Semba, H., Jitsufuchi, T. and Harada, H. 1988. The effect of physical stress on plant cells in suspension cultures. *Biotechnol. Lett.* **10**: 485:490.
- 13.- Jolicouer, M., Chavarie, C., Carreau, J. and Archambault, J. 1992. Development of a helicoidal-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 511-521.
- 14.- Curtis, W. and Emery, A. 1993. Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 520-526.
- 15.- Zhong, J., Seki, T., Kinoshita, S. and Yoshida, T. 1992. Rheological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1256-1262.
- 16.- Kato, A., Kawazoe, S. and Soh, Y. 1978. Viscosity of the broth of tobacco cells in suspension culture. *J. Ferment. Technol.* **56**(3): 224-228.

- 17.- Akiyama, Y. and Kato, K. 1981. An extracellular arabinogalactan-protein from *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*. 20: 2507-25010.
- 18.- Stafford, A. 1991. The manufacture of food ingredients using plant cell and tissue cultures. *Trends Food Sci. Technol.* 5(2): 116-122.
- 19.- Leathers, R., Davin, C. and Zrýrd, J. 1992. Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. var. *bikores monogerm* (red beet). *In Vitro Cell Dev. Biol.* 28P: 39-45.
- 20.- Rodríguez, M., Jiménez, A., Dávila, G. and Sepúlveda, G. 1994. Effect of carbon source in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotechnol Lett.* 16(8): 853-858.
- 21.- Wagner, F. and Vogelman, H. 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. In: *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk. H., eds.) , Springer-Verlag, Berlin. pp. 245-255.
- 22.- Jones, D., Thomas, N. and Callow, J. 1987. Red beet batch culture demonstration of a bubble-free Taylor-couette bioreactor. *Biotechnol. Tech.* 1(4): 257-262.
- 23.- Khlebnikov, A., Dubuis, B., Kut, O. and Prenosil, J. 1995. Growth and productivity of *Beta vulgaris* cell culture in fluidized bed reactors. *Bioproc. Eng.* 14: 51-56.
- 24.- Jiménez, A. 1995. Producción de colorantes de interés alimentario por cultivo de células vegetales: las betalainas del betabel (*Beta vulgaris* L.) como caso de estudio. Ph. D. Thesis. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F., México.
- 25.- Gamborg, O., Miller, R. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- 26.- Bowen, R. 1986. Unrevealing the mysteries of shear-sensitive mixing systems. *Chem. Eng.* 1: 55-63.
- 27.- Bradford, V. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 28.- Dubois, M., Gilles, A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- 29.- Gerrit-Jan, V. and Clark, E. 1985. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extract by single radical gel diffusion. *Anal. Biochem.* 148: 446-450.

- 30.- Komalavilas, P., Zhu, J. and Nothnagel, E. 1991. Arabinogalactan-proteins from the cell suspension culture medium and plasma membrane of rose cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 15956-15965.
- 31.- Clark, A., Anderson, R. and Stone, B. 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry*. **18**: 521-540.
- 32.- Showalter, A. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*. **5**: 9-23.
- 33.- Nothnagel, E. 1997. Proteoglycans and related components in plant cells. *Int. Review Cytology*. **174**: 195-290.
- 34.- Hale, A., Pollock, C. and Dalton, S. 1987. Polysaccharide production in liquid cell suspension culture of *Phleum L.* *Plant Cell Rep.* **6**: 435-438.
- 35.- Glicklis, R., Mills, D., Sitton, D., Stortelder, W. and Merchuk, F. 1998. Polysaccharide production by plant cells in suspension: Experiments and mathematical modeling. *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 732-740.
- 36.- Wu, J. 1995. Mechanism of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. *J. Biotechnol.* **43**: 81-94.
- 37.- Lakhotia, S. and Papoutsakis, E. 1992. Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: experimental and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 95-107.

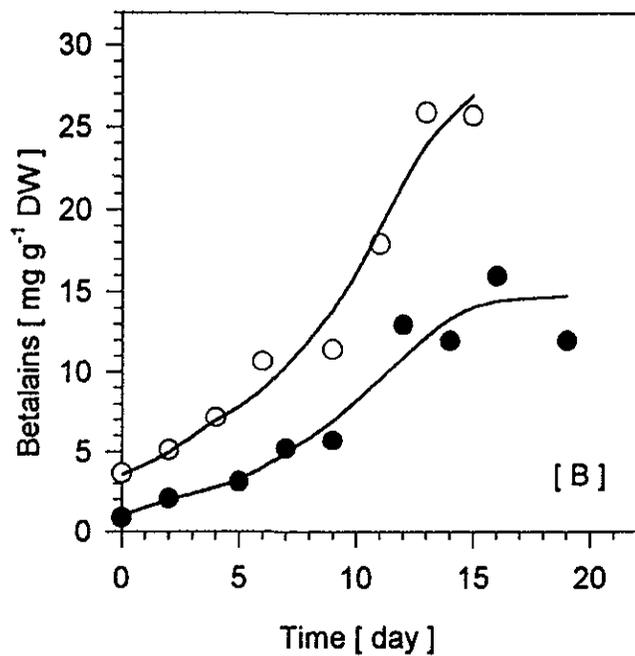
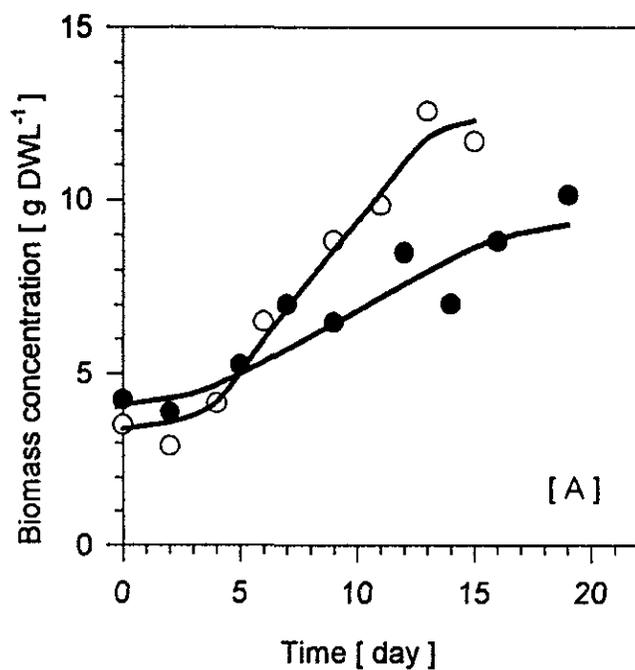


Figure 1. Biomass (A) and betalains production (B) profiles of *Beta vulgaris* cells cultures, developed in Erlenmeyer flasks (O) and in a stirred tank (●).

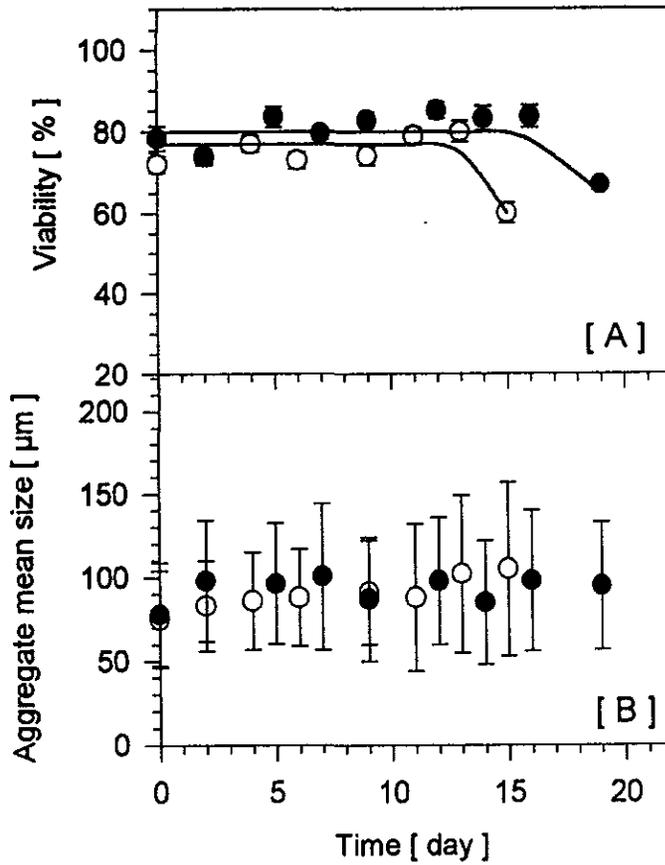


Figure 2. Evolution of the cellular viability (A) and mean cellular aggregate size (B) of *Beta vulgaris* cell cultures developed in Erlenmeyer flasks (O) and in a stirred tank (●).

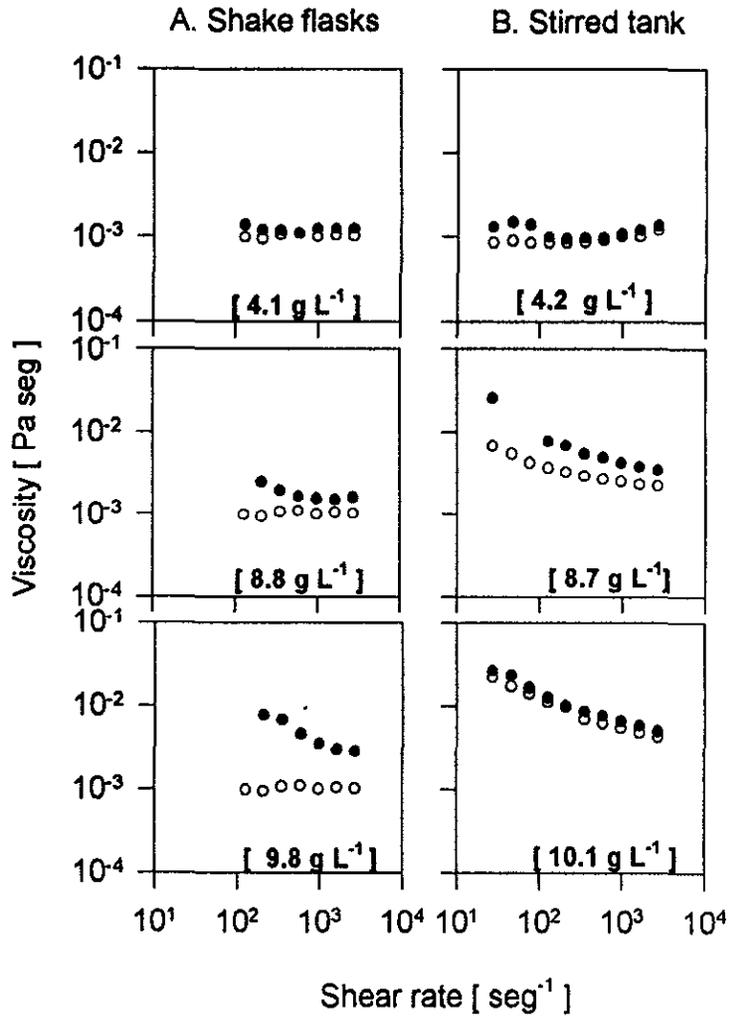


Figure 3. Rheograms of *Beta vulgaris* broths obtained from cultures developed in Erlenmeyer flasks (A) and in a stirred tank (B), as a function of biomass concentration (numbers in parenthesis). Rheological behavior of whole broths (●) and cell-free medium (○).

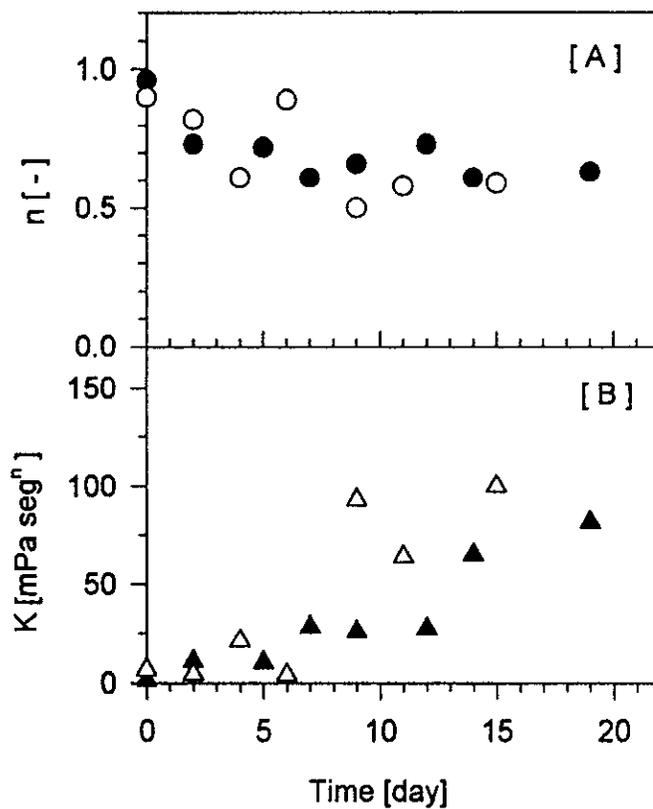


Figure 4. Evolution of the flow behavior index (n , ● O) and consistency index (K , ▲ Δ) of *B. vulgaris* cultures grown in shake flasks (O,Δ) and in a stirred tank (●,▲).

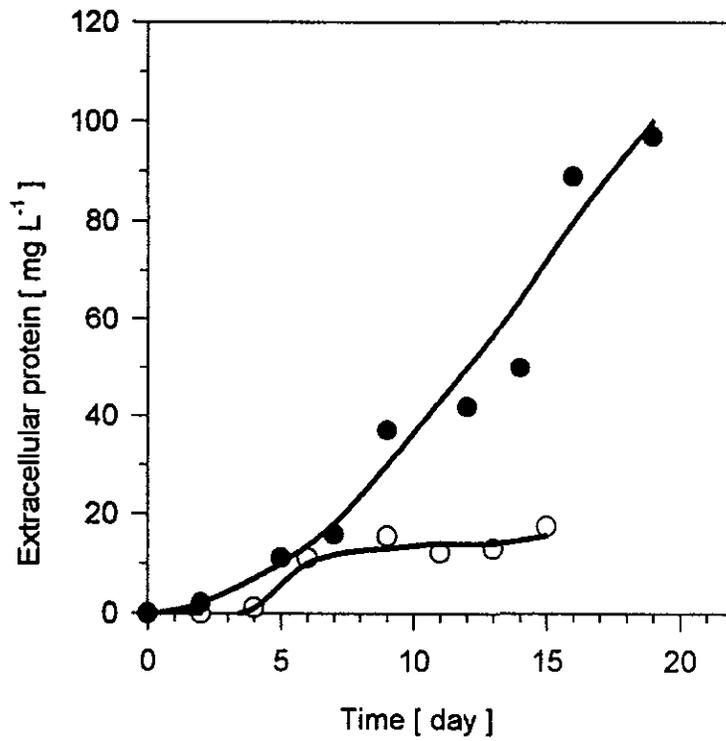


Figure 5. Extracellular protein accumulation in *Beta vulgaris* cultures developed in Erlenmeyer flasks (O) and in a stirred tank (●).

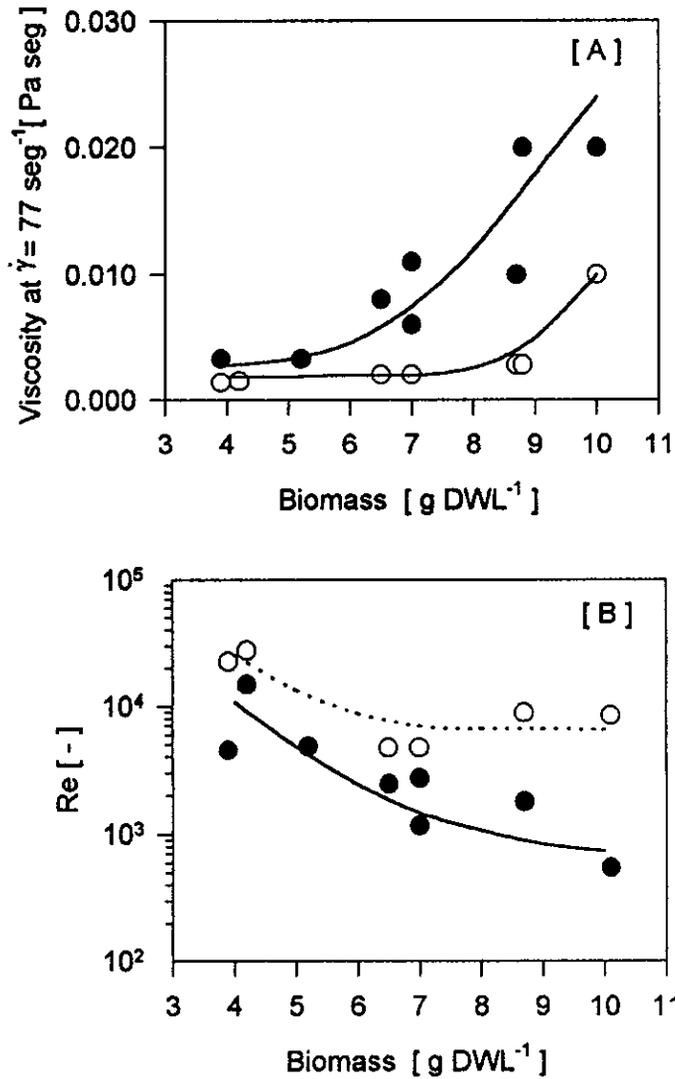


Figure 6. (A) Viscosity ($\dot{\gamma} = 77 \text{ seg}^{-1}$) of the broths of cultures developed in a stirred tank (●) and shake flasks (○) as a function of the biomass concentration of *Beta vulgaris* cultures and (B) Reynolds number in the stirred tank (●) and (○) considering the rheology of the cultures developed in shake flasks.

7.3. Desarrollo de los cultivos de células de *B. vulgaris* en un fermentador agitado mecánicamente a 700 rpm

Los resultados presentados en la sección 7.2 demostraron que las células de *B. vulgaris* son resistentes para crecer en un fermentador agitado con un suministro de potencia de 0.313 kW m^{-3} . Sin embargo, se observó que el aumento de estrés hidrodinámico ocasionó una disminución en la velocidad de crecimiento celular y en los rendimientos de biomasa y betalainas, con relación a los cultivos crecidos a 0.011 kW m^{-3} . Además, se observó un aumento de la viscosidad del medio filtrado debida a la acumulación de AGPs y polisacáridos, que son secretados por las células como una respuesta a los insultos físicos que les impone la agitación y aireación en el tanque agitado. Un aspecto importante por estudiar era saber como respondían los cultivos a condiciones de estrés más severas. Para esto se evaluó el crecimiento de los cultivos bajo una potencia volumétrica de 1.661 kW m^{-3} , condición con la que se alcanza una velocidad de deformación máxima de 305 seg^{-1} (700 rpm). De acuerdo a Einsele (1978), el valor de 1.66 kW m^{-3} es representativo de la potencia en que operaría un fermentador agitado de nivel industrial (un volumen de cultivo de entre 10 y 100 m^3).

Los resultados de la figura 10 muestran que las células de *B. vulgaris* crecidas a 700 rpm, alcanzaron rendimientos de biomasa de 14 g L^{-1} y de betalainas de 34 mg g^{-1} . Estos valores son superiores en 1.4 y 2.2 veces, respectivamente, con relación a los obtenidos a 400 rpm. Con base en estos resultados y considerando que el valor de potencia del biorreactor (1.6 kW m^{-3}) es representativo de uno de nivel industrial, se sugiere que las células de *B. vulgaris* son suficientemente resistentes para su escalamiento a reactores de 10 a 100 m^3 .

En la figura 11 se presenta el reograma del caldo de cultivo obtenido a 700 rpm en la fase estacionaria de crecimiento (12.5 g L^{-1}). Se observó que el caldo completo y el filtrado del caldo presentaron un comportamiento reológico de tipo pseudoplástico.

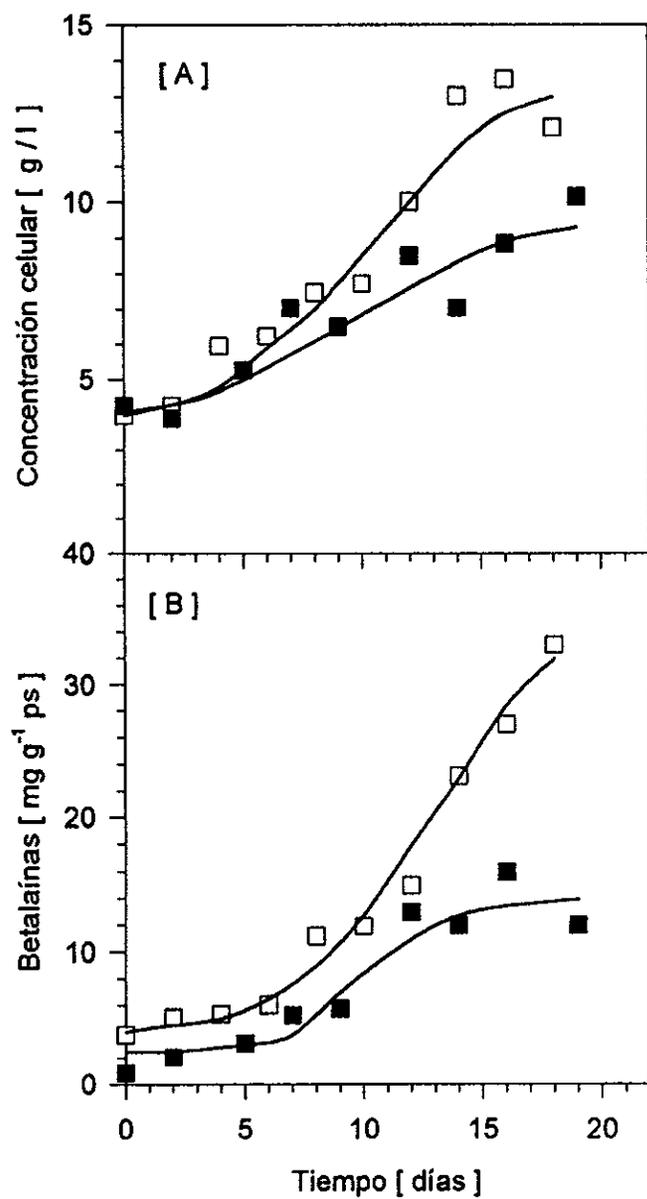


Figura 10. Crecimiento celular (A) y producción de betalainas (B) de los cultivos de *B. vulgaris* crecidos en un fermentador agitado a 400 rpm (■) y a 700 rpm (□).

Los valores de las constantes n y K del modelo de la ley de la potencia para cada caso fueron los siguientes:

	n	K
Caldo completo	0.41	0.52
Filtrado del caldo	0.47	0.26

Como se aprecia en la figura 11, las características de pseudoplasticidad de los caldos obtenidos en el biorreactor a 700 rpm fue mayor que la de los caldos crecidos a 400 rpm. Este resultado indicó que, al aumentar la condición de estrés en el biorreactor (desde 0.31 hasta 1.66 kW m⁻³) ocasionó un incremento en la pseudoplasticidad de los caldos.

El aumento de la viscosidad del filtrado del caldo se asoció con la acumulación de proteína extracelular, que a 700 rpm alcanzó un valor máximo de 120 mg L⁻¹ al día 18 (figura 12). Este valor fue superior en 20 % con relación al obtenido a 400 rpm. La concentración específica de proteína, se incrementó de 8.5 mg g⁻¹ (400 rpm) a 10.0 mg g⁻¹ (700 rpm). Comparando las diferentes condiciones de estrés evaluadas (matraces y biorreactor), se observó que, como consecuencia al aumento de la intensidad de estrés los cultivos acumularon mayor concentración de proteína extracelular (figura 5-artículo y figura 12). Esto sugiere que las células de *B. vulgaris* responden al aumento a la condición de estrés secretando una mayor cantidad de proteínas al medio de cultivo. En el caso de los cultivos desarrollados a 700 rpm, el aumento de la viscosidad del medio filtrado, produjo una disminución en número de Reynolds desde 6.0 x 10⁴ a 3.2 x 10³. Este valor es menor al que al valor calculado para el medio libre de células obtenido en los cultivos obtenidos con una agitación de 400 rpm (figura 6B-artículo). Ello confirma que la acumulación de los compuestos extracelulares secretados por las células de *B. vulgaris* juegan un papel importante en la reducción de la turbulencia imperante en el fermentador e indican que un aumento de su concentración puede minimizar los insultos físicos generados sobre este tipo de células.

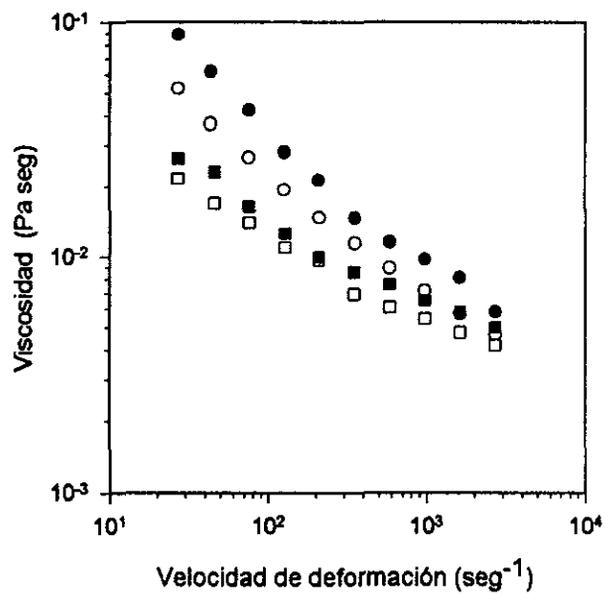


Figura 11. Reograma del caldo de cultivo de células de *B. vulgaris* crecidas en un fermentador agitado a 400 rpm (■, □) y a 700 rpm (●, ○). Reograma del caldo completo (■, ●) y del medio filtrado (□, ○).

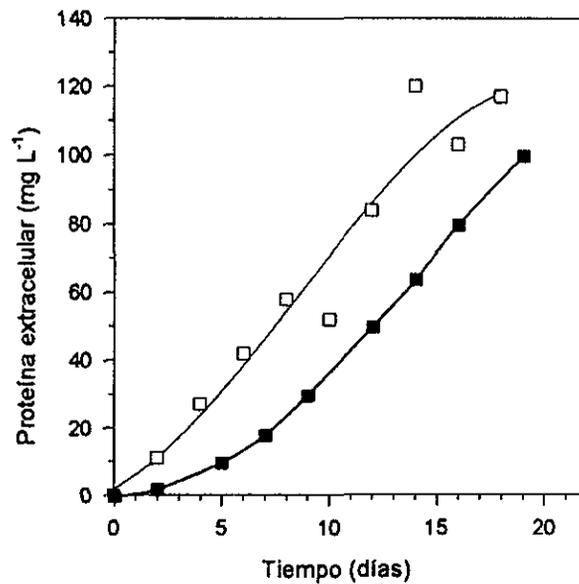


Figura 12. Acumulación de proteína extracelular de los cultivos de *B. vulgaris* crecidos en un fermentador agitado mecánicamente, a 400 rpm (■) y a 700 rpm (□).

Una posible razón para explicar, porqué los rendimientos de biomasa y de betalainas fue superior en los cultivos crecidos en el biorreactor operado a 700 rpm con relación a los obtenidos a 400 rpm (figura 10), es por que las propiedades reológicas de los caldos obtenidos a 700 rpm generan una menor turbulencia en el sistema y pueden minimizar los daños.

La viabilidad de las células de *B. vulgaris* crecidas a 700 rpm, se mantuvo en valores cercanos al 80 % durante las primeras 15 horas de cultivo y solamente se observó una caída al 60 %, en el inicio de la fase estacionaria (figura 13A). Este comportamiento fue muy similar al observado para los cultivos desarrollados a 400 rpm y confirma que no existe pérdida de viabilidad celular por el aumento del estrés en el biorreactor.

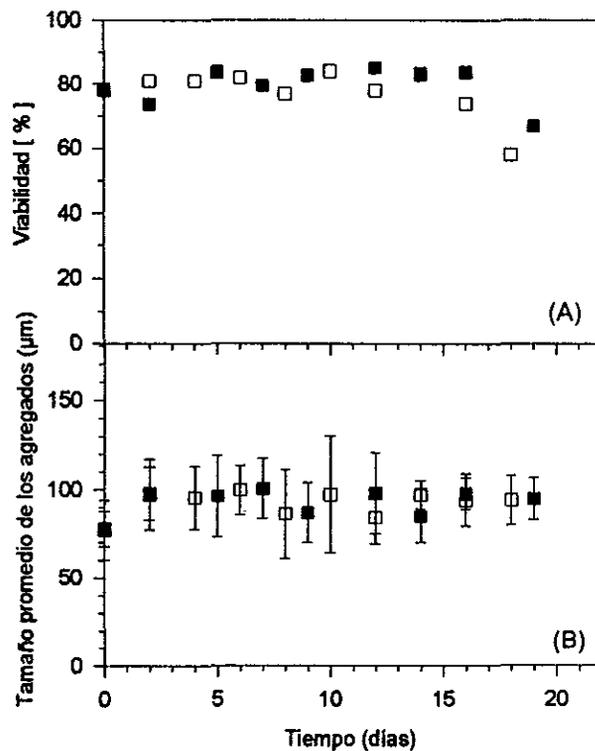


Figura 13. Viabilidad de las células (A) y tamaño medio de los agregados celulares (B) de los cultivos de *B. vulgaris* crecidos en un fermentador agitado a 400 rpm (■) y a 700 rpm (□).

Las células vistas al microscopio no mostraron ruptura de las cubiertas celulares que pudieran sugerir que bajo esta condición, la proteína extracelular fuera consecuencia de la liberación de la proteína intracelular por ruptura de células (figura 14).

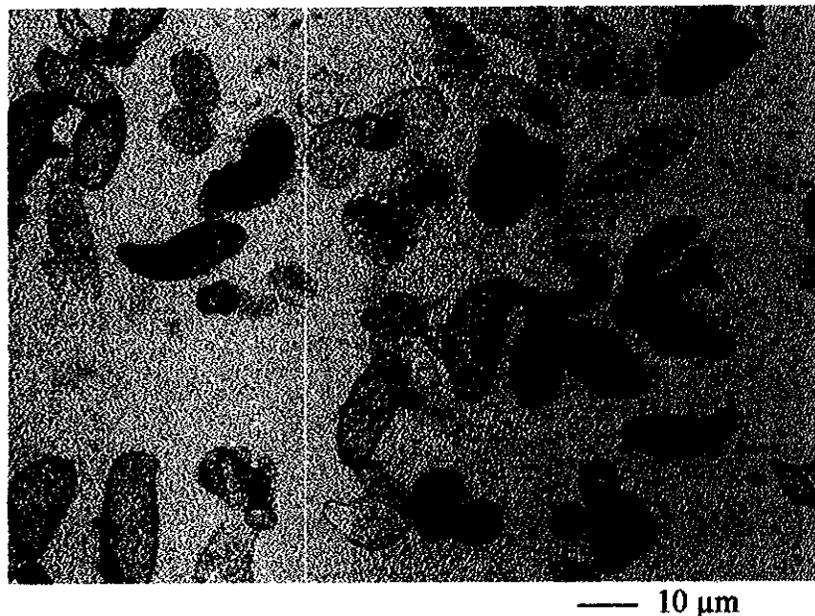


Figura 14. Microfotografía de las células de *B. vulgaris* crecidas en un fermentador agitado a 700 rpm.

Además, los niveles de oxígeno disuelto en el medio de cultivo no alcanzaron valores inferiores al 20 % (figura 15) lo cual descarta un posible efecto de limitación por oxígeno. Por lo tanto, la proteína extracelular acumulada en el medio debe provenir de la secreción de estas moléculas por parte de las células de *B. vulgaris*.

El tamaño de los agregados celulares del cultivo de *B. vulgaris* crecidos en el biorreactor a 700 rpm se mantuvo en un diámetro promedio de 100 μm (figura 13 B). Este valor no difiere mucho del reportado para los cultivos crecidos a 400 rpm, por lo que se confirma que el aumento del estrés hidrodinámico no tiene efecto alguno en el tamaño de los agregados celulares.

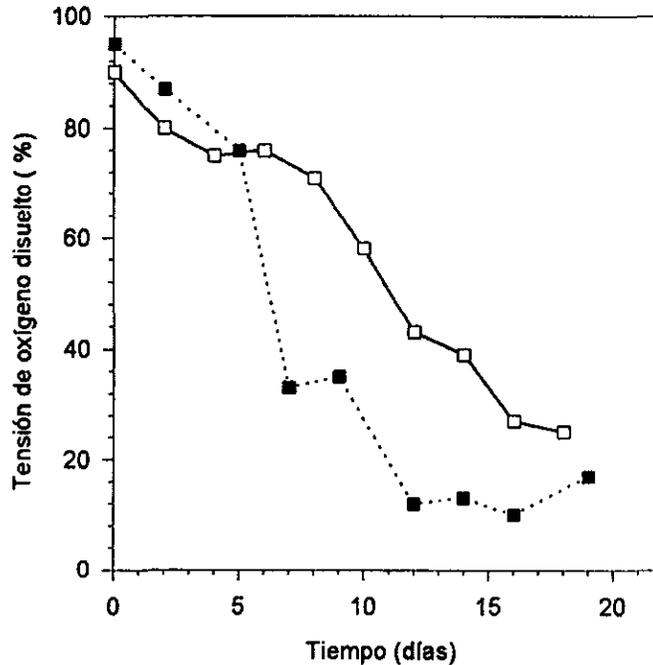


Figura 15. Evolución de la tensión de oxígeno disuelto durante el crecimiento de células de *B. vulgaris* en un fermentador agitado a 400 rpm (■) y a 700 rpm (□).

Los resultados presentados en esta sección confirman que las células de *B. vulgaris* son resistentes para crecer en un fermentador agitado y el aumento del estrés imperante en el tanque determina un cambio de la viscosidad del medio y en su comportamiento reológico, que permite minimizar el estrés y el desarrollo de los cultivos. Un análisis integral de los resultados de esta sección se presenta en la discusión general (sección 7.5).

7.4. Caracterización de los compuestos extracelulares

Los resultados de las secciones 7.2 y 7.3 mostraron que los compuestos secretados por las células de *B. vulgaris* sometidos a estrés, juegan un papel importante en el aumento de la viscosidad y en cambio de las propiedades reológicas del caldo. Esta respuesta celular determinó una reducción considerable de la turbulencia imperante en el fermentador y la posibilidad de que los cultivos alcanzaran rendimientos (celulares y de betalainas) similares a

los obtenidos en condiciones de bajo estrés. Por lo tanto, era importante precisar la naturaleza de estos compuestos. En esta sección, se presentan los resultados que confirman la naturaleza de los compuestos secretados por las células de *B. vulgaris*.

En cultivos *in vitro* de otras especies vegetales se había reportado la presencia y acumulación de dos tipos de moléculas: arabinogalactoproteínas y carbohidratos (Becker *et al*, 1964; Liau y Boll, 1972; Akiyama y Kato, 1981; Hale *et al*, 1987; Schipsema *et al*, 1991; Meijer *et al*, 1994; Glicklis *et al*, 1998). Por lo tanto, los análisis de los compuestos extracelulares se encaminaron a la detección y caracterización de este tipo de moléculas.

El rendimiento de material extracelular precipitado del fermentador (6.2 mg g^{-1} de células) fue seis veces superior al obtenido del filtrado del cultivo de matraces (1.0 mg g^{-1} de células). Esta diferencia parece estar determinada por el aumento en la condición de estrés imperante en los cultivos de matraces (0.011 kW m^{-3}) con relación a la de los cultivos desarrollados en el biorreactor (0.313 kW m^{-3}). Al precipitar el material extracelular de los cultivos viscosos, obtenidos en el fermentador, se observó que la viscosidad del sobrenadante se hizo similar a la del agua, lo cual confirma el papel que tienen los compuestos precipitados en el aumento de la viscosidad del caldo.

El ensayo con el reactivo de Yariv en el material precipitado fue positivo tanto en las muestras precipitadas de los cultivos en matraces, como para las del biorreactor. Esto indica que ambos precipitados contienen proteínas del tipo de las arabinogalactoproteínas (Showalter, 1993; Nothnagel, 1997). Sin embargo, mediante el análisis por electroforesis de estas proteínas, se observó que el peso molecular de las proteínas secretadas en cada caso fue diferente (figura 16). En la muestra proveniente del cultivo crecido en bajo estrés (0.011 kW m^{-3}), se encontraron dos bandas de proteínas de peso molecular de 52 y 64 Kda, en tanto que, en la muestra del cultivo desarrollado en alto estrés (0.313 kW m^{-3}), se detectó una banda mayoritaria de peso molecular de 109 Kda. Esto muestra que existe una clara diferencia en el peso molecular de las proteínas secretadas por las células de

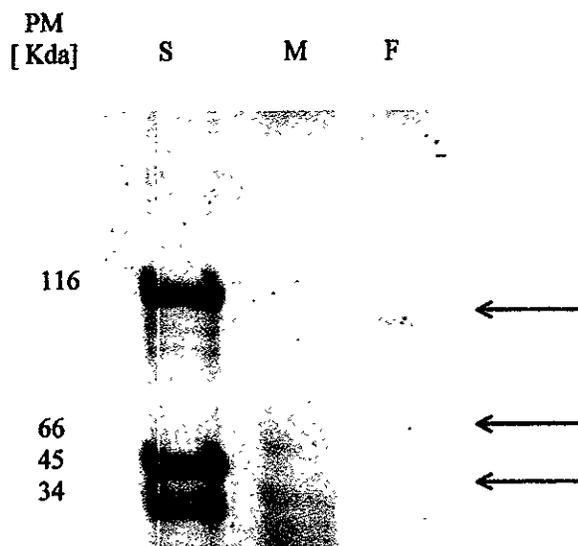


Figura 16. Perfil electroforético de las proteínas extracelulares aisladas de muestras de fase estacionaria de cultivos de *B. vulgaris*. M y F corresponden a las muestras de matraces y del fermentador, respectivamente y S corresponde a los marcadores de peso molecular.

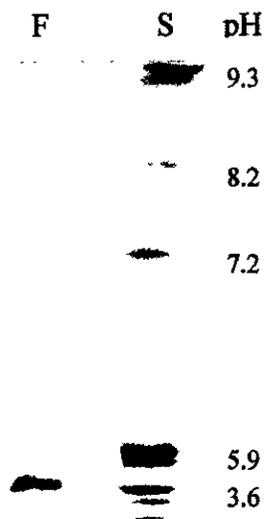


Figura 17. Determinación del pH isoelectrico de una muestra de proteína extracelular, proveniente de cultivos de *B. vulgaris* crecidos en un fermentador agitado mecánicamente (F). S corresponde a los marcadores de pH.

B. vulgaris, que depende de la condición de estrés hidrodinámico en el cual se desarrollan las células.

En la muestra de proteína aislada del cultivo del fermentador, se determinó un valor de punto isoeléctrico de 4. El carácter ácido de esta proteína, constituye una prueba adicional de la naturaleza de AGP de la proteína producida en el fermentador. El pH isoeléctrico ácido, es una característica de los AGPs que las distingue de las extensinas (punto isoeléctrico básico), que son otro tipo de proteínas que se han aislado de filtrados de cultivos vegetales crecidos *in vitro* (Showalter, 1993; Nothnagel, 1997).

Los resultados anteriores mostraron que además de existir una mayor acumulación de proteína extracelular en los cultivos crecidos en alto estrés (figura 5-artículo), también se presentaron cambios en los pesos moleculares de las proteínas extracelulares entre los cultivos crecidos a bajo y alto estrés (figura 16). Estos cambios, parecen determinantes en el aumento de la viscosidad del medio libre de células de los cultivos crecidos en el biorreactor (figura 3-artículo).

Para analizar la presencia de polisacáridos en el material extracelular, el precipitado obtenido del cultivo crecido en alto estrés se separó por cromatografía en una columna de DEAE-Sephadex. Los resultados indican la presencia de dos fracciones: la fracción 1 (de la muestra 8 a la 16) dió reacción positiva únicamente al ensayo de carbohidratos y representa el 9 % de la muestra. Por otra parte, la fracción 2 (de la muestra 20 en adelante) dió reacción positiva a los ensayos de carbohidratos y proteína, lo cual representa el 91 % restante de la muestra (figura 18). Esto demuestra que, en los compuestos extracelulares secretados por las células de *B. vulgaris* bajo condiciones de alto estrés, existe por lo menos un polisacárido (fracción 1) y una fracción mayoritaria que puede corresponder a AGPs (fracción 2).

La presencia de AGPs y polisacáridos extracelulares en los cultivos de *B. vulgaris*, concuerda con la acumulación de macromoléculas ya reportada para los cultivos de células de rosa (Komalavilas *et al*, 1991). Sin embargo, la proporción mayoritaria de las AGPs,

sugiere que estas moléculas sean productos de secreción celular como respuesta a la condición de estrés imperante en el fermentador. La presencia AGPs en plantas se asocia con la respuesta de los tejidos vegetales a diferentes condiciones de estrés (Showalter, 1993; Nothnagel, 1997). Además, se les asignan funciones biológicas de comunicación celular y de protección a daños por heridas (Showalter, 1993; Nothnagel, 1997). Sin embargo, esta es la primera vez que se reporta que su producción este determinada por el aumento del estrés hidrodinámico en cultivos *in vitro*.

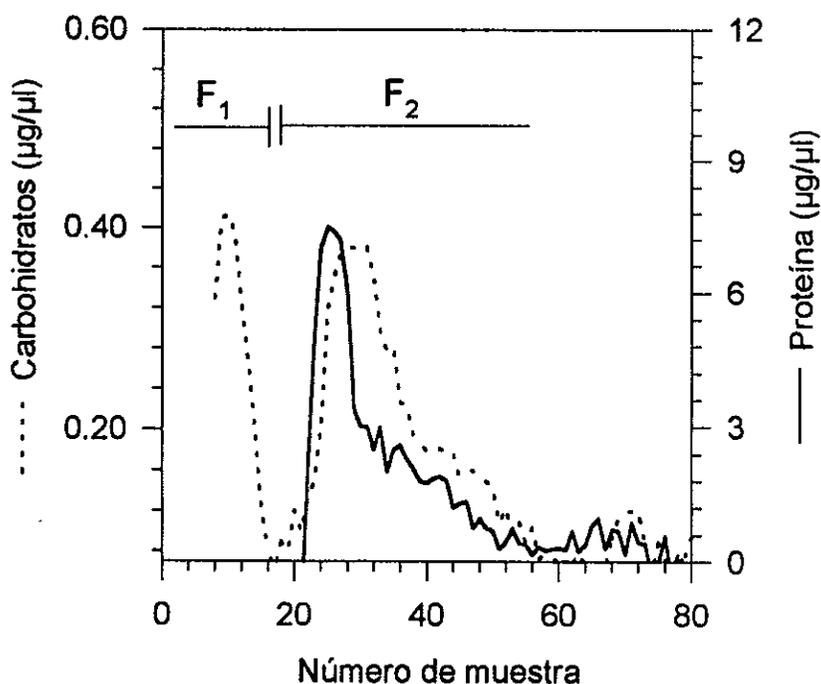


Figura 18. Análisis por cromatografía de intercambio iónico, del material extracelular secretado por las células de *B. vulgaris* crecidas en un fermentador agitado mecánicamente.

Con el objeto de conocer los posibles cambios de las proteínas producidas en los cultivos crecidos en alto estrés, se analizaron las proteínas extracelulares precipitadas a diferentes tiempos de la fermentación. Los resultados de la electroforesis (figura 19), indican que en

los cultivos con baja viscosidad (muestra del día 9), existen bandas de proteínas de peso molecular pequeño (18, 29, 52 Kda). Sin embargo, estas bandas se hacen tenues y aparece una banda de proteína de peso molecular mayor (109 Kda), en los caldos pseudoplásticos más viscosos (después del día 12) que se mantiene presente durante el resto de la fermentación. El peso molecular de la proteína de 52 Kda coincide con la banda proteínica que se acumula en los matraces (cultivos de baja viscosidad) (figura 16). En tanto que la banda de 109 Ka se presenta en los filtrados del cultivo crecidos en el biorreactor en dos niveles de estrés (0.313 y 1.66 kW m³), que fueron caracterizados como fluidos pseudoplásticos y viscosos. Por lo que se sugiere que, la presencia de dicha proteína de alto peso molecular es importantemente en los cambios de las propiedades reológicas y en el aumento de la viscosidad del medio filtrado.

La figura 19B muestra la electroforesis de las mismas muestras en presencia de β -mercaptoetanol. En la muestra del día 9, no se observaron cambios en el patrón de bandas con respecto al del patrón sin β -mercaptoetanol (figura 19A). Sin embargo, en las muestras que preceden al día 9 de la fermentación, se observó un aumento en el número bandas de proteínas de peso molecular menor. Este resultado indica que, existen enlaces disulfuro en la banda de 109 Kda y sugiere que esta proteína puede estar formada por la asociación de varias subunidades de peso molecular menor.

La caracterización parcial de los compuestos secretados por las células de *B. vulgaris* indican que se trata de moléculas de AGP y cuando menos un polisacárido. Además, el aumento del estrés hidrodinámico determina cambios en las características de las AGPs secretadas por las células. Una discusión integral de estos resultados se presenta en la siguiente sección.

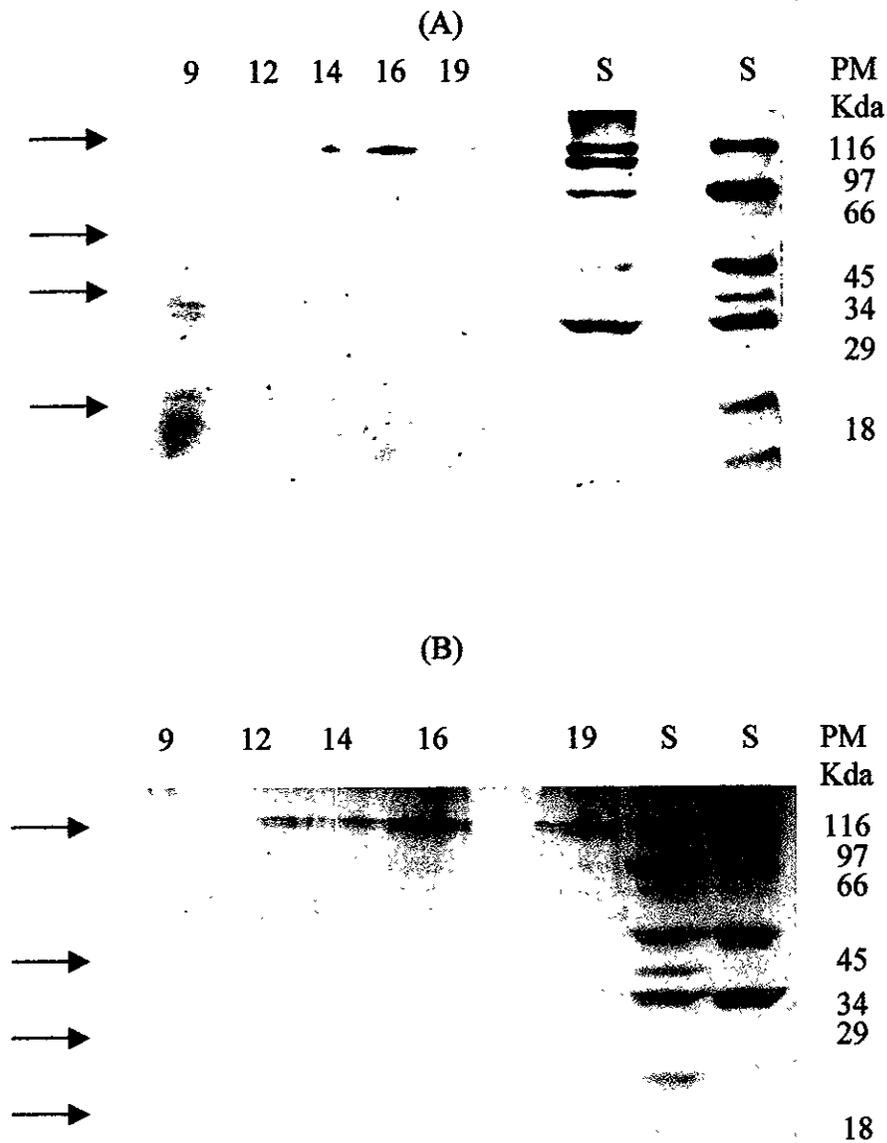


Figura 19. Patrón de electroforesis de las proteínas extracelulares secretadas por los cultivos de *B. vulgaris* crecidos en fermentador a 700 rpm. La electroforesis en geles de poliacrilamida fue realizada bajo condiciones desnaturalizantes sin (A) y con (B) β -mercaptoetanol. Los números 9-19 corresponden a los días de la fermentación y S a los marcadores de peso molecular.

7.5. Discusión general

En un fermentador agitado, las condiciones de estrés impuestas por la agitación y aireación resultan adversas y dañinas para el desarrollo de algunas células. Particularmente, las células vegetales han sido consideradas como organismos frágiles para crecer en los biorreactores agitados mecánicamente (Stafford *et al*, 1986; Panda *et al*, 1989; Taticcek *et al*, 1991; Dörnenburg y Knorr, 1995). Sin embargo, no existen los elementos suficientes para sustentar esta fragilidad, por el contrario, los resultados obtenidos mediante pruebas de resistencia de las células vegetales en viscosímetros y por micromanipulación, indican que estas células son organismos más resistentes que otros tipos celulares como las células de animales superiores, las células de insecto y las células de levaduras (Dunlop y Namdev, 1993; Hua *et al*, 1993; MacLoughlin *et al*, 1997; Thomas y Zhang, 1998).

En los estudios en viscosímetros y mediante micromanipulación resulta muy difícil de evaluar efectos subletales o las posibles respuestas de las células al estrés hidrodinámico. Por esta razón, los estudios en biorreactores se han visto favorecidos, como el sistema más usado para evaluar efectos del estrés en cultivos celulares, aun con las limitaciones que implica la presencia de gradientes de estrés que dependen de la ubicación dentro del biorreactor y además por que representan las condiciones reales de cultivo (Meijer *et al*, 1993).

Las células de *B. vulgaris* representan un caso de interés particular para estudiar la fragilidad de las células vegetales, debido a que las células de esta especie habían sido consideradas en la literatura como frágiles al estrés hidrodinámico (Wagner y Vogelmann, 1977; Taticcek *et al*, 1991). Sin embargo, no existían los estudios que demostraran la existencia de tal fragilidad. Por el contrario, Rodríguez *et al* (1994b) reportaron el desarrollo satisfactorio de un cultivo de *B. vulgaris* en un biorreactor agitado a 150 rpm, pero los cultivos no se desarrollaron al ensayar velocidades de agitación mayores. Debido a la incertidumbre en los resultados anteriores, el objetivo principal de este estudio se centró en estudiar la fragilidad de esta especie para crecer en un biorreactor agitado mecánicamente y en los efectos que tiene el

estrés hidrodinámico en su crecimiento, morfología, producción de betalainas y en las propiedades reológicas del caldo de cultivo.

En el capítulo 7.1 se analizó la fragilidad de las células de *B. vulgaris* frente a condiciones de estrés definidas. En un viscosímetro de cilindros concéntricos se ensayó su fragilidad a una velocidad de deformación de $1,170 \text{ seg}^{-1}$. A pesar de que se observaron daños letales que provocaron la pérdida de la viabilidad en el 25 % de la población (figura 5) y que fueron muy evidentes por la ruptura de la pared y de la membrana celular (figura 7), existe una población mayoritaria de células (75 %) que es resistente a tan alta velocidad de deformación. Estas células lograron crecer en matraces agitados, alcanzando rendimientos celulares similares a los de los cultivos no sometidos a estrés en el viscosímetro (figura 9). Esto sugiere que, en caso de haber algún daño subletal en las células sobrevivientes, estas tienen la capacidad de desarrollarse cuando cesa de actuar la condición de alto estrés sobre ellas.

La resistencia de las células de *B. vulgaris* a la prueba en el viscosímetro, es comparable a la resistencia observada en otras especies de células vegetales como *D. carota* (Dunlop y Namdev, 1993), *Periella frutescens* (Zhong *et al*, 1994), *M. citrifolia* (MacLoughlin *et al*, 1997) y *Taxus cuspidata* (Sun y Linden, 1999). Además, apoya la afirmación de otros autores (Meijer *et al*, 1993, Kieran *et al*, 1997), en el sentido de que las células vegetales no son tan frágiles como originalmente se postuló en la literatura (Stafford *et al*, 1986; Panda *et al*, 1989; Taticek *et al*, 1991; Dörnenburg y Knorr, 1995). Esta resistencia de las células de *B. vulgaris* a tan alta velocidad de deformación en el viscosímetro ($1,170 \text{ seg}^{-1}$) contribuye a demostrar porqué no se observó pérdida de viabilidad en las células crecidas en el fermentador agitado (figura 13A). La velocidad de deformación máxima en este sistema (176 seg^{-1} para 400 rpm y 305 seg^{-1} para 700 rpm) no excedió a la ensayada en el viscosímetro. Los resultados de este trabajo demuestran que la viabilidad de las células en el fermentador agitado se mantuvo constante (80 %) durante la mayor parte de la cinética de crecimiento (figura 13A). Sin embargo, en las células crecidas en el biorreactor a 400 rpm y 700 rpm, durante la fase estacionaria de crecimiento, la viabilidad disminuyó notoriamente.

Esta pérdida de la viabilidad, concuerda con la fragilidad reportada para las células de *N. tabacum* en la fase estacionaria, que es la etapa de crecimiento donde las células presentan su mayor contenido de vacuolas (Hooker *et al*, 1989) y sugiere que las células de *B. vulgaris* en fase estacionaria también pudieran ser sensibles al estrés.

Los resultados de resistencia de las células de *B. vulgaris* apoyan también los estudios de Rodríguez *et al* (1994b), quienes reportaron el crecimiento de las células de esta especie en un tanque agitado a 150 rpm, condición con la que se alcanza el 5 % de la velocidad de deformación ensayada en el viscosímetro.

Otro aspecto importante de este estudio fue conocer e interpretar los efectos del estrés hidrodinámico sobre el desarrollo de los cultivos en el fermentador. Tomando en cuenta que existía un reporte previo del crecimiento de las células de *B. vulgaris* a una agitación de 150 rpm (Rodríguez *et al*, 1994b), se decidió probar condiciones de agitación superiores. Se realizaron experimentos a velocidades de agitación de 400 y 700 rpm, condiciones que representaban una velocidad de deformación máxima de 176 y 305 seg^{-1} , respectivamente. Además de los experimentos en el fermentador, se consideró conveniente evaluar el comportamiento de los cultivos en matraces agitados, ya que este sistema es representativo de una condición de bajo estrés y es ampliamente utilizada en el laboratorio, para experimentos de selección de líneas celulares, así como en estudios de optimización de medios de cultivo. El cultivo de *B. vulgaris* en matraces agitados se ha reportado como satisfactorio y no se considera que a este nivel existan efectos dañinos por el estrés hidrodinámico (Leathers *et al*, 1992; Rodríguez *et al*, 1994a; Jiménez, 1995).

Con fines comparativos se adoptó el uso de la potencia suministrada al sistema, como una aproximación a la condición de estrés imperante en cada sistema. El valor de potencia calculado, demuestran que existe una diferencia de entre uno a dos órdenes de magnitud entre las condiciones de estrés presentes en los matraces (0.011 kW m^{-3}) y las generadas en el fermentador (0.313 y 1.661 kW m^{-3} , para 400 y 700 rpm, respectivamente). Los resultados demuestran que las células de *B. vulgaris* fueron capaces de crecer bajo las

diferentes condiciones de estrés evaluadas y desde luego explica porqué no se reportaron efectos negativos en el estudio de Rodríguez *et al* (1994b), ya que la agitación de 150 rpm usada por esos autores, alcanza una potencia de 0.006 kW m^3 .

Los resultados de resistencia de las células de *B. vulgaris* para crecer en tanques agitados, presentados en este trabajo, contrastan con las afirmaciones de otros autores, en relación con la fragilidad observada para esta especie ante la agitación mecánica (Wagner y Vogelmann, 1977; Taticek *et al*, 1991). Estos autores, presentaron como la única evidencia de la fragilidad, la lisis de las células al intentar agitar con una propela marina cultivos creciendo en un fermentador *airlift* de 10 L. Sin embargo, aquellos cultivos se encontraban en su fase estacionaria de crecimiento, cuando se ha reportado que las células vegetales pueden ser más frágiles. En contraste a lo anterior, en el presente estudio, se fundamenta la resistencia de las células de *B. vulgaris* por su crecimiento a diferentes niveles de estrés en un fermentador agitado (secciones 7.2 y 7.3) y con la resistencia de las células observada en el viscosímetro (sección 7.1).

La resistencia de las células de *B. vulgaris* utilizadas en este trabajo, puede ser consecuencia de las variaciones genéticas que se producen en las células mantenidas bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Kieran *et al*, 1997). Por ejemplo, en los cultivos con *C. roseus*, la cual es una especie de gran interés para la producción de ajmalicina en biorreactores, se ha observado que existen variaciones en la respuesta de este cultivo para crecer en diferentes tipos de biorreactores. Este fenómeno se ha relacionado con la respuesta de los genotipos de las semillas usadas y con sus posibles mutaciones provocadas durante el régimen de cultivo *in vitro*. A este mismo respecto, Meijer *et al* (1994) estudiando cuatro especies de células vegetales, reportan que existen diferencias entre ellas a la resistencia para crecer en un fermentador agitado mecánicamente. Los autores afirman que una de las causas que pudieran explicar las diferencias de resistencia, es el mantenimiento *in vitro* de las células por largos períodos de tiempo, lo que favorece la selección de genotipos resistentes al estrés hidrodinámico. En el caso particular de los cultivos de *B. vulgaris* usados en este estudio,

los callos se han mantenido por resiembras durante cinco años. Con los cultivos recién obtenidos, se tuvieron problemas de lisis al intentar crecerlos en el mismo fermentador a 400 rpm (Rodríguez *et al*, 1994b), por lo tanto, es muy probable que la resistencia de esta línea celular se haya seleccionado durante su subcultivo.

Los rendimientos de biomasa ($10-14 \text{ g L}^{-1}$) y betalainas ($15-30 \text{ mg g}^{-1}$) obtenidos en el fermentador agitado mecánicamente, son comparables con los obtenidos en otros biorreactores descritos como de bajo estrés, tales como uno de lecho fluido (Khlebnikov *et al*, 1995) y un biorreactor del tipo *Taylor-Coutte* (Jones *et al*, 1987). En estos biorreactores se reportan rendimientos celulares de $10-17 \text{ g L}^{-1}$ y de betalainas de $2-36 \text{ mg g}^{-1}$. Sin embargo, uno de los inconvenientes que presentan los biorreactores anteriores, es que existen limitaciones de mezclado cuando se logran altas concentraciones celulares, lo que ocasiona la aparición de zonas mal mezcladas en el fermentador (Scragg, 1995; Kieran *et al*, 1997). En este contexto, los biorreactores agitados mecánicamente, representan una mejor alternativa para lograr un mezclado adecuado, simplemente aumentando la velocidad de agitación o cambiando la geometría del impulsor. Contar con cultivos vegetales resistentes a las condiciones de estrés de los tanques agitados, como los cultivos de *B. vulgaris* descritos en este estudio, permitiría desarrollar cultivos con altas concentraciones celulares. Esta es una estrategia propuesta por otros autores para incrementar la productividad en el cultivo de células vegetales (Scragg, 1992; Scragg, 1995; Kieran *et al*, 1997).

Es reconocido en la literatura que los cultivos de células vegetales en suspensión presentan una tendencia a formar agregados celulares. Esta tendencia agrava los problemas de mezclado y de transferencia de masa durante la fermentación (Panda *et al*, 1989; Taticek *et al*, 1991; Dörnenburg y Knorr, 1995). Para los cultivos de *B. vulgaris* se había reportado un efecto del cambio de la morfología de los cultivos sobre la producción de betalainas (Khlebnikov *et al*, 1995). Este cambio de morfología, de cultivos altamente dispersos (cultivos de matraces) a cultivos creciendo en forma de agregados con diámetros de hasta 8 mm (cultivos en el biorreactor de lecho fluidizado), redujo la producción de betalainas en

60 % (Khlebnikov *et al*, 1995). Los resultados de este trabajo, contrastan con la tendencia anterior. Se observó que los cultivos de *B. vulgaris* crecidos en matraces y en un tanque agitado mecánicamente, crecen en forma de suspensiones homogéneas constituidas por células individuales o por pequeños agregados celulares de un tamaño promedio de 100 μm de diámetro.

La viabilidad de la población de células de *B. vulgaris* no se afectó bajo las condiciones de estrés hidrodinámico ensayadas en el presente estudio. Este fenómeno contrasta con los resultados presentados por Ho *et al* (1995). Ellos reportaron para cultivos de *Nicotiana tabacum* un efecto negativo en la viabilidad de las células, al cambiar las condiciones de cultivo de matraces agitados a biorreactor. Además, reportaron una pérdida de la viabilidad celular, al incrementar la velocidad de agitación en un reactor tipo tanque agitado desde 100 a 325 rpm. Aquí se postula que la razón principal por la cual las células de *B. vulgaris* no presentaron éstos efectos negativos, fue el cambio de las propiedades reológicas del caldo (figura 3-artículo), que ocurre como una consecuencia de proteínas del tipo AGPs y polisacáridos en los cultivos sometidos a alto estrés y que constituyen un mecanismo de defensa para las células de *B. vulgaris* a los insultos físicos imperantes en el fermentador.

La reología de los caldos de cultivo constituye una característica fundamental en los procesos de fermentación. Las propiedades reológicas de los caldos determinan el consumo de potencia necesario para el mezclado de los cultivos. También, afectan la transferencia de masa y de energía durante las diferentes operaciones del proceso, desde la fermentación hasta las operaciones de recuperación y purificación de productos. Sin embargo, el conocimiento de la reología de los caldos de células vegetales es un tópico que ha sido muy poco estudiado (Scragg, 1992; Curtis y Emery, 1993; Kieran *et al*, 1997). Los resultados de este trabajo demuestran, por primera vez, que el aumento de la viscosidad del medio filtrado y su cambio en las propiedades reológicas están determinados por un efecto del estrés hidrodinámico. Este resultado es congruente con las observaciones de Meijer *et al* (1994), quienes reportaron un aumento cualitativo de la viscosidad de los medios filtrados para los

cultivos de *N. tabacum* crecidos en un tanque agitado (después del sexto día de crecimiento).

Curtis y Emery (1993) observaron que el comportamiento pseudoplástico de los caldos de células vegetales está determinado por la morfología de las células. En los cultivos de *N. tabacum* y *D. carota*, la morfología de células alargadas generó caldos con comportamiento pseudoplástico. Esto contrastó con el comportamiento Newtoniano observado en los caldos de *Papaver somniferum*, algodón, soya y papa, que estuvieron formados por células esféricas. El comportamiento reológico de los caldos de *B. vulgaris*, apoyan la propuesta de Curtis y Emery (1993), debido a que las células de *B. vulgaris* presentaron morfología alargada en un alto porcentaje (> 75 %) y sus propiedades reológicas estuvieron caracterizadas por la pseudoplasticidad.

En cultivo de células vegetales, está es la primera vez que se reporta que la condición de estrés hidrodinámico determina el aumento de la viscosidad del medio filtrado y el cambio de sus propiedades reológicas (figura 3-artículo y figura 11). El análisis de este fenómeno puede considerarse como el principal aporte del trabajo al estado del conocimiento. El aumento de la viscosidad del medio libre de células fue asociado con cambios cualitativos y cuantitativos en las proteínas obtenidas para los cultivos crecidos a bajo y alto estrés. Esta acumulación no tuvo relación alguna con lisis celular. Prueba de ello es que la viabilidad de los cultivos se mantuvo alta (valores cercanos al 80 %) durante las cinéticas de crecimiento (figuras 2-artículo y 13A) y la integridad en las cubiertas celulares (figura 14). Además, en el análisis por electroforesis de las muestras precipitadas del caldo obtenido del fermentador (solución viscosa), se observó la presencia de una proteína mayoritaria de peso molecular de 109 Kda (figuras 16 y 19). En caso de que ésta proteína hubiera provenido de lisis celular, deberían estar presentes otras proteínas en el análisis electroforético. Estos datos apoyan la posibilidad de que la proteína acumulada extracelularmente en los cultivos de *B. vulgaris*, provengan de la secreción de las células sometidas a las condiciones de alto estrés hidrodinámico en el tanque agitado.

Los resultados de las figuras 5-artículo y 12 muestran que la concentración de proteína extracelular estuvo afectada directamente por el aumento de la condición de estrés en el sistema (desde 0.011 a 1.66 kW m⁻³), lo que sugiere que existe una respuesta celular de mayor secreción de proteína que es proporcional al aumento del estrés.

En cultivos de *N. tabacum* crecidos en un fermentador agitado a 1,000 rpm, se había reportado un incremento de la viscosidad del medio filtrado (Meijer *et al*, 1994). Sin embargo, los autores no analizaron el fenómeno. Por las condiciones de crecimiento usadas en ese trabajo, podría esperarse que se tratara de un fenómeno de secreción de macromoléculas por las células de *N. tabacum*, en forma similar al observado en este estudio para los cultivos de *B. vulgaris*.

El cultivo de células vegetales para la producción de biopolímeros con propiedades reológicas interesantes, podría no ser una novedad para la industria (*Corporate Research Center for Industrial Plant Biopolymers, 1996-1997*). En este informe, se citan proyectos encaminados a la producción de polímeros por medio del cultivo de células de *Acacia senegal*, *Pyrus* y *Nicotiana*. Los polímeros producidos por cultivos *in vitro*, presentan propiedades emulsificantes, gelificantes y reológicas similares a las de la goma arábiga, obtenida tradicionalmente de exudados del árbol de *A. senegal*. Además, se cita que tales sistemas han sido cultivados en tanques agitados. Sin embargo, por la naturaleza de aquella investigación, no es posible disponer de mayores datos. Estos reportes, sin embargo, constituyen información alterna en el sentido de la acumulación de arabinogalactoproteínas (como biopolímero), observado en este trabajo y su consecuente influencia en las propiedades reológicas. Adicionalmente, demuestran que esta goma puede tener un amplio potencial comercial y que podrían incluso representar un mayor interés que las betalainas.

Los análisis realizados del material precipitado, indican que en el material precipitado hay proteínas del tipo AGPs y un polisacárido (figura 18). En el caso de las AGPs, el ensayo positivo con el reactivo de Yariv, su pH isoelectrico ácido y sus pesos moleculares,

concuerdan con las características propias reportadas para este tipo de moléculas (Clark *et al*, 1979; Showalter, 1993; Nothnagel, 1997).

Las arabinogalactoproteínas son moléculas que se encuentran ubicadas en la parte externa de la membrana celular y frecuentemente en la lamina media de los tejidos vegetales. Son moléculas hidrosolubles que se han aislado del medio de cultivo de células vegetales de otras especies como *N. tabacum* (Akiyama y Kato; 1981; Mau *et al*, 1995), rosa (Komalavilas *et al*, 1991) y *Pyrus communis* (Mau *et al*, 1995). Aunque no se conoce con precisión el papel biológico que desempeñan estas moléculas en las plantas, su presencia en diferentes exudados celulares, se asocia con mecanismos de defensa celular a condiciones de estrés mecánico o hídrico y también como moléculas de comunicación celular (Clark *et al*, 1979; Showalter, 1993; Nothnagel, 1997). Algunos reportes muy recientes (presentados en el 20th *Symposium in Plant Physiology, Cell and developmental biology of arabinogalactan-protein*, 1999) documentan la presencia de AGPs en cultivos de *B. vulgaris*. El estudio de Mejewska-Sawka *et al* (1999) considera que estas moléculas juegan un papel importante en el proceso de regeneración de la pared celular de protoplastos. En otro trabajo, se propone a las AGPs como moléculas de respuesta a las condiciones de estrés químico, impuesta por la presencia de peróxidos (Reuzeau y Kjellbom, 1999). Estos autores reportan que los cultivos crecidos en presencia de peróxidos, tienen un cambio en el patrón de electroforesis de las proteínas liberadas al medio, con relación a los cultivos crecidos sin peróxidos.

Los resultados de este trabajo, sugieren que la secreción celular de AGPs y polisacáridos en el medio de cultivo es debida a una respuesta a las condiciones de estrés hidrodinámico. Este fenómeno tiene analogía con la respuesta de los tejidos vegetales (*in vivo*), que responden a un daño por lesión, secretando gomas y otros compuestos. En los cultivos *in vitro*, el medio puede estar sirviendo como una continuación a la lamina media presente en los tejidos vegetales. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que los AGPs pudieran estar participando en mecanismos de reparación o robusteciendo la pared celular, con base en los resultados recientes de Mejewska-Sawka *et al* (1999). Por otro lado, el efecto que tiene el estrés hidrodinámico en el cambio en el patrón de electroforesis de las AGPs entre los

cultivos desarrollados en bajo y alto estrés, concuerda con la respuesta de las células de *B. vulgaris* ante una condición de estrés por peróxidos (Reuzeau y Kjellbom, 1999) y sugiere que puede existir un mecanismo similar en la respuesta de las células de *B. vulgaris* expuestas a diferentes condiciones de estrés.

En cultivo de células animales, se reconoce que la adición de polímeros al medio ayuda a reducir los daños ocasionados por los insultos físicos que provocan la agitación y la aireación en biorreactores (Hua *et al*, 1993; Joshi *et al*, 1996; Wu, 1995). Por ejemplo, Lakhotia y Papoutsakis (1992) reportaron que un incremento de 1.4 cP de la viscosidad del medio de células embrionarias de hígado bovino, produjo una reducción en el número de Reynolds de 4.4×10^3 a 1.6×10^3 y redujo la velocidad de muerte celular. Los resultados del presente trabajo, sugieren un fenómeno similar en los cultivos de *B. vulgaris*. El aumento de la viscosidad y el cambio de reología del medio produjo una disminución de uno a dos órdenes de magnitud en el número de Reynolds (figura 6B-artículo) y se observó un crecimiento celular sin daños aparentes. Estos resultados abren la posibilidad para evaluar el crecimiento de otras especies de células vegetales, consideradas como frágiles, en presencia de sustancias que aumenten la viscosidad del medio.

8. Conclusiones

Las células de *B. vulgaris* usadas en este trabajo fueron resistentes para crecer en un biorreactor agitado mecánicamente. Las células en el biorreactor soportaron una condición de estrés hidrodinámico de hasta 1.6 kW m^{-3} .

La resistencia de las células de *B. vulgaris* para crecer en el biorreactor está soportada por pruebas en un viscosímetro. En este sistema, las células expuestas a una velocidad de deformación de hasta $1,170 \text{ seg}^{-1}$, no sufrieron daños considerables. La velocidad de deformación ensayada en el viscosímetro fue muy superior a la calculada como máxima para el fermentador (305 seg^{-1}), a la mayor potencia suministrada (1.6 kW m^{-3}).

El comportamiento reológico del caldo de cultivo de *B. vulgaris* fue pseudoplástico. Las condiciones de estrés hidrodinámico impuestas en el biorreactor (0.3 y 1.6 kW m^{-3}) determinan un aumento en la viscosidad y en el cambio de las propiedades reológicas del medio filtrado. Este contrasta con la baja viscosidad y la reología Newtoniana del medio filtrado de los caldos obtenidos en los cultivos en matraces, en condiciones de bajo estrés (0.01 kW m^{-3}). Este cambio de la viscosidad genera una disminución en la turbulencia del sistema (número de Reynolds) al que están sometidas las células en el biorreactor.

El aumento de la viscosidad y el cambio de las propiedades reológicas del medio filtrado, para los cultivos sometidos a potencia volumétrica de 0.3 y 1.6 kW m^{-3} , fue determinado por una alta acumulación de arabinogalactoproteínas y polisacáridos. Esta secreción de polímeros, parece ser una respuesta de las células de *B. vulgaris* a las condiciones de estrés hidrodinámico.

9.- Perspectiva para trabajos futuros

En este trabajo se demostró que la línea celular de *B. vulgaris* usada en el trabajo fue suficientemente resistente para crecer en un fermentador de tipo agitado mecánicamente, soportando hasta una condición de estrés tan alta como 1.66 kW m^{-3} . Sería interesante poder comparar la resistencia de cultivos recién obtenidos *in vitro*, incluyendo materiales de otras variedades de *B. vulgaris*, con la finalidad de analizar si la resistencia observada en las células es propia de la variedad crossbar's Egyptian o si esta se pudo seleccionar durante sus resiembras *in vitro*.

Sería interesante precisar, si los compuestos extracelulares acumulados en los caldos de cultivo obtenidos bajo condiciones de alto estrés, además de jugar un papel importante en la reducción de la turbulencia del sistema. Pudieran estar relacionados con algún mecanismo de robustecimiento o de reparación de las cubiertas celulares en las células sometidas a estrés. También es importante conocer, si las proteínas que se acumulan extracelularmente son secretadas por las células o son liberadas de las cubiertas celulares, como consecuencia de las fuerzas de estrés que actúen facilitando su liberación de las paredes celulares.

Con la finalidad de conocer la fragilidad de otras especies vegetales cultivadas *in vitro*, se podría usar del viscosímetro como un sistema experimental para comparar, bajo el mismo criterio, la fragilidad de otras especies antes de someterlas a crecimiento en un biorreactor.

En cultivos de células animales en tanques agitados con aireación, se ha comprobado que la condición de estrés que se genera durante la liberación de las burbujas en la superficie del medio es más dañina que la que se produce por el mezclado del impulsor. En el caso de cultivos de células vegetales sería importante estudiar por separado los efectos que estas variables.

10. Bibliografía

- Akiyama, Y. and Kato, K. 1981. An extracellular arabinogalactan-protein from *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**. 20: 2507-25010.
- Alferman, A. and Paterson, M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 43: 199-205
- Allan, E., Scragg, H. and Pugh, K. 1988. Cell suspension culture of *Picrasma quassioides*: the development of a rapidly growing, shear resistant cell line capable of quassin formation. **J. Plant Physiol.** 132: 176-183.
- Ballica, R., Ryu, D., Powell, R. and Owen, D. 1992. Rheological properties of plant cell suspensions. **Biotechnol. Prog.** 8: 413-420.
- Becker, G., Hui, P. and Albersheim, P. 1964. Synthesis of extracellular polysaccharide by suspensions of *Acer pseudoplatanus* cells. **Plant Physiol.** 39: 913-920.
- Böhm, H. and Rink, E. 1986. Betalains. In “**Phytochemicals in Plant Cell Cultures**”, Vasil, I. and Constabel, F. (Eds.). Academic Press. p. 449-463.
- Boysan, F., Cliffe, K., Lekie, F. and Scragg, A. 1988. The growth of *Catharanthus roseus* in stirred tank bioreactors. In “**Procc. 2nd Int. Conference on Bioreactor Fluid Dynamics**”, King, R. (Ed.). Elsevier Appl. Sci. Publish., London & New York. p. 245-258.
- Bowen, R. 1986. Unrevealing the mysteries of shear-sensitive mixing systems. **Chem. Eng. I**: 55-63.
- Bradford, V. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Clark, A., Anderson, R. and Stone, B. 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. **Phytochemistry**. 18: 521-540.
- Corporative Research Center for Industrial Plant Biopolymers 1996-1997. **Corporative Research Center for Industrial Plant Biopolymers. Annual report**. Parkville Victoria, Australia. 44 p.

- Curtis, R. and Emery, A. 1993. Plant cell suspension culture rheology. **Biotechnol. Bioeng.** 42: 520-526.
- Díaz, M., García, A. and García, L. 1996. Mixing power, external convection, and effectiveness in bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.** 51: 131-140.
- Doran, P. 1993. Design of reactors for plant cells and organs. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 48: 117-168.
- Dörnenburg, H. and Knorr, D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme Microb. Technol.** 17: 674-684.
- Dubois, M., Gilles, A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28: 350-356.
- Dunlop, E. and Namdev, P. 1993. Effect of fluid forces on plant cell suspension. In "Procc. 3rd Int. Conference on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics", Nienow, A. (Ed.). Mechanical Eng. Pub. Ltd., London. p. 447-455.
- Einsele, A. 1978. Scaling-up of bioreactors. **Process Biochem.** 7: 13-14
- Francis, J. 1994. Food Color. The World Ingredients. **J. Practicing Food Technol.** October: 7-11.
- Fujita, I. 1988. Shikonin: production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell culture. In "Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medical and Aromatic Plants I". Bajaj, Y. (Ed). Springer-Verlag. Berlin. p. 225-236.
- Fujita, I. and Tabata, M. 1987. Secondary metabolites from plant cells: pharmaceutical applications and progress in commercial production. In "Plant Tissue and Cell Culture". Green, C., Somers, D., Hackett, W. and Biesboer, D. (Eds.) Alan R. Liss, New York. p. 169-185.
- Gamborg, O., Miller, R. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.** 50: 151-158.
- García-Briones, M. and Chalmers, J. 1994. Flow parameters associated with hydrodynamic cell injury. **Biotechnol. Bioeng.** 44: 1089-1098.
- Gerrit-Jan, V. and Clark, E. 1985. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extract by single radical gel diffusion. **Anal. Biochem.** 148: 446-450.

- Girod, P. and Zyrd, J. 1991. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris*) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 25: 1-12.
- Glicklis, R., Mills, D., Sitton, D., Stortelder, W. and Merchuk, F. 1998. Polysaccharide production by plant cells in suspension: Experiments and mathematical modeling. **Biotechnol. Bioeng.** 57: 732-740.
- Goosen, M. 1992. Large-scale insect cell culture. **Current Opinion Biotechnol.** 3: 99-104.
- Hale, A., Pollock, C. and Dalton, S. 1987. Polysaccharide production in liquid cell suspension culture of *Phleum L.* **Plant Cell Rep.** 6: 435-438.
- Ho, C., Henderson, K. and Rorrer, G. 1995. Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. **Biotechnol. Prog.** 11: 140-145.
- Hooker, B., Lee, J. and An, G. 1989. Response of plant tissue culture to high shear environment. **Enzyme Microb. Technol.** 11: 484-490.
- Hooker, B., Lee, J. and An, G. 1990. Cultivation of plant cells in a stirred vessel: effect of impeller design. **Biotechnol. Bioeng.** 35: 296-304.
- Hua, J., Erickson, L., Yiin, T and Glasgow, L. 1993. A review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability. **Crit. Rev. Biotechnol.** 13:305-328
- Jiménez, A. 1995. Producción de colorantes de interés alimentario por cultivo de células vegetales: las betalainas del betabel (*Beta vulgaris L.*) como caso de estudio. *Tesis de Doctorado*. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F., México.
- Jiménez-Aparicio, A., del Villar, A., Dávila, G., Gutierrez, G. y Rodríguez, M. 1997. Estabilidad fisicoquímica de la betanina producida por cultivo de células de betabel (*Beta vulgaris L.*). **Acta Mex. Ciencia Tecnología.** 12 (42): 67-80.
- Jolicouer, M., Chavarie, C., Carreau, J. and Archambault, J. 1992. Development of a helicoidal-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. **Biotechnol. Bioeng.** 39: 511-521.
- Jones, D., Thomas, N. and Callow, J. 1987. Red beet batch culture demonstration of a bubble-free Taylor-couette bioreactor. **Biotechnol. Techniques** 1 (4): 257-262.

- Joshi, J., Elias, C. and Patole, M. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. **Biochem. Eng. J.** 62: 121-141.
- Kato, A., Kawazoe, S. and Soh, Y. 1978. Viscosity of the broth of tobacco cells in suspension culture. **J. Ferment. Technol.** 56(3): 224-228.
- Khlebnikov, A., Dubuis, B., Kut, O. and Prenosil, J. 1995. Growth and productivity of *Beta vulgaris* cell culture in fluidized bed reactors. **Bioproc. Eng.** 14: 51-56.
- Kieran, P., Malone, D. and MacLoughlin, P. 1993. Variation of aggregate size in plant cell suspension batch and semi-continuous cultures. **Trans. I. Chem. E. part C.** 71: 40-46.
- Kieran, P., O'Donnell, H., Malone, D. and MacLoughlin, P. 1995. Fluid shear effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. **Biotechnol. Bioeng.** 45: 415-425.
- Kieran, P., Mac Loughlin, P. and Malone, D. 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. **J. Biotechnol.** 59: 39-52.
- Komalavilas, P., Zhu, J. and Nothnagel, E. 1991. Arabinogalactan-proteins from the cell suspension culture medium and plasma membrane of rose cells. **J. Biol. Chem.** 266: 15956-15965.
- Kresta, S. 1998. Turbulence in stirred tanks: Anisotropic, approximate, and applied. **Can. J. Chem. Eng.** 76: 563-576.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.
- Lakhotia, S. and Papoutsakis, E. 1992. Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: experimental and modeling. **Biotechnol. Bioeng.** 39: 95-107.
- Leathers, R., Davin, C. and Zryrd, J. 1992. Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. var. *bikores monogerm* (red beet). **In Vitro Cell Dev. Biol.** 28P: 39-45.
- Leckie, F., Scraggs, H. and Cliffe, K. 1991. Effect of impeller design and speed on the large-scale cultivation of suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **Enzyme Microb. Technol.** 13:801-810.
- Liau, D. and Boll, W. 1972. Extracellular polysaccharide from cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). **Can. J. Bot.** 50: 2031-2037.

- MacLoughlin, P., Malone, D., Murtagh, J. and Kieran, P. 1997. The effects of turbulent jet flows on plant cell suspension cultures. **Biotechnol. Bioeng.** 58(6): 595-604.
- Märkl, H., Bronnenmeier, R. and Wittek, B. 1991. The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. **Int. Chem. Eng.** 31 (2): 185-196.
- Markx, G., ten Hoopen, H., Meijer, J. and Vinke, K. 1991. Dielectric spectroscopy as a novel and convenient tool for the study of the shear sensitivity of plant cells in suspension culture. **J. Biotechnol.** 19: 145-158.
- Mau, S., Chao-Goang, C., Zhao-Yan, P., Robert, M., Simpson, R., Bacic, A. and Clarke, A. 1995. Molecular cloning of cDNAs encoding the protein backbones of arabinogalactan-proteins from the filtrate of suspension-cultured cells of *Pyrus communis* and *Nicotiana glauca*. **Plant J.** 8 (2): 269-281.
- Meijer, J., ten Hoopen, H., Luyben, K. and Libbenga, R. 1993. Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: A literature survey. **Enzyme Microb. Technol.** 15: 234-238.
- Meijer, J., ten Hoopen, H., van-Gameren, I., Luyben, K. and Libbenga, K. 1994. Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 467-477.
- Mejewska-Sawka, A., Butowt, R. and Nothnagel, E. 1999. Characterization of AGPs secreted by suspension cells and protoplasts of sugar beet. 20th Symposium in Plant Physiology (Cell and developmental biology of arabinogalactan-protein). Riverside California, USA. Poster 9.
- Metzner, A. and Otto, R. 1957. Agitation of non-Newtonian fluids. **A.I.Ch E. J.** 3(1): 3-9.
- Nothnagel, E. 1997. Proteoglycans and related components in plant cells. **Int. Review Cytology.** 174: 195-290.
- Oldshue, J. 1983. **Fluid Mixing Technology, Chemical Engineering**, MacGraw-Hill publications Co. New York, N.Y. p. 574.
- Olsvik, E. and Kristiansen, B. 1994. Rheology of filamentous fermentations. **Biotechnol. Adv.** 12: 1-39.
- Ontiveros, J. 1994. Aislamiento de líneas celulares de *Beta vulgaris* productoras de betalinas. **Tesis de Licenciatura**, Facultad Ciencias, UNAM.

- Ontiveros, J. y Rodríguez, M. 1993. Selección de líneas celulares de *Beta vulgaris* productoras de betalainas. **Biotecnología (México)** 3(3-4): AV35-39.
- Panda, A., Mishra, S., Bisaria V., and Bhojwan, S. 1989. Plant cell reactors a perspective. **Enzyme Microb. Technol.** 11: 386-397.
- Parr, A., Smith, J., Robins, R. and Rhodes, M. 1984. Apparent free space and cell volume estimation: a non-destructive method for assessing the growth and membrane integrity/viability of immobilized plant cells. **Plant Cell Rep.** 3: 161-164.
- Prokop, A., and Bajpai, R. 1992. The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. **Adv. Appl. Microbiol.** 37: 165-232.
- Reuzeau, Ch. and Kjellbom, P. 1999. Molecular analysis of genes encoding arabinogalactan proteins. 20th Symposium in Plant Physiology (Cell and developmental biology of arabinogalactan-protein). Riverside California, USA. Poster 14.
- Rodríguez, M., Jiménez, A., Dávila, G. and Sepúlveda, G. 1994a. Effect of carbon source in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. **Biotechnol. Lett.** 16(8): 853-858.
- Rodríguez, M., Jiménez, A, Dávila, G. y Sepúlveda, G. 1994b. Producción de betalainas por cultivo de *Beta vulgaris* a nivel de bioreactor. **Memorias 1er Encuentro de Tecnólogos en Alimentos del Cono Sur.** Buenos Aires, Argentina. p. 231-233.
- Rosemberg, M. 1987. The hydrodynamic shear sensitivity of suspension cultures plant cells. **Ph. D. Thesis.** Washington University. St. Luis, MO.
- Schipsema, J., Erkelns, C. and Verporte, R. 1991. Intra-and extracellular carbohydrates in plant cell cultures investigated by H-NMR. **Plant Cell Report.** 9: 527-530.
- Scragg, A., Allan, E. and Leckie, F. 1988. Effect of shear on the viability of plant cell suspension. **Enzyme Microb. Technol.** 10: 361-367.
- Scragg, A. 1992. Large-scale plant cell culture: methods, applications and products. **Current Opinion Biotechnol.** 3:105-109.
- Scragg, A. 1995. The problems associated with high biomass levels in plant cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue Organ Culture.** 43: 163-170.
- Showalter, A. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. **Plant Cell.** 5: 9-23.
- Stafford, A., Morris, P. and Fowler, M. 1986. Plant cell biotechnology; a perspective. **Enzyme Microb. Technol.** 8: 578-586.

- Stafford, A. 1991. The manufacture of food ingredients using plant cell and tissue cultures. **Trends Food Sci. Technol.** 5(2): 116-122.
- Steghis, W. and Strack, D. 1991. Betalains. In "The Alkaloids", Vol 39. Brossi, A. (Ed.), Academic Press, Orlando, Florida. p. 1-62.
- Strack, D., Steglich, W. and Wray, V. 1993. Betalains. In "Methods in Plant Biochemistry", Vol. 8, Academic Press. p. 421-450.
- Su, W. 1995. Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 50: 189-230.
- Sun, X. and Linden, J. 1999. Shear stress effects on plant cell suspension cultures in a rotating wall vessel bioreactor. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 22: 44-47.
- Taiz, L. 1992. The plant vacuole. **J. Exp. Biol.** 172: 113-122.
- Takeda, T., Seki, M. and Furusaki, S. 1994. Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. **J. Chem. Eng. Jpn.** 27(4): 466-471.
- Tan, W., Dai, G. and Chen, I. 1994. Quantitative investigations of cell-bubble interactions using a foam fractionation technique. **Cytotechnology** 15(1-3): 321-328.
- Tanaka, H. 1981. Technological problems in cultivation of plants cells at high density. **Biotechnol. Bioeng.** 23: 1203-1218.
- Tanaka, H. 1982. Oxygen transfer in broths of plant cells at high density. **Biotechnol. Bioeng.** 24: 425-442
- Tanaka, H., Semba, H., Jitsufuchi, T. and Harada, H. 1988. The effect of physical stress on plant cells in suspension cultures. **Biotechnol. Lett.** 10: 485-490.
- Taticek, R., Moo-Young, M. and Legge, L. 1991. The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 24: 139-158.
- Thomas, C. 1990. Problems of shear in biotechnology. In "Chemical Engineering Problems in Biotechnology". Winkler, M. (Ed.) Elsevier, Sci. Pub. England. p. 25-93.
- Thomas, R. and Zhang, Z. 1993. Micromanipulation: a new approach to studying animal cell damage in bioreactors. **Genetic Eng. Biotechnologist** 13(1): 19-29.

- Thomas, R. and Zhang, Z. 1998. The effects of hydrodynamics on biological materials. In **Advances in Bioprocess Engineering. II**. Galindo, E. and Ramírez, O. (Eds). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p. 137-170.
- Tramper, J., Gooijer, D. and Vlask, J. 1993. Scale-up considerations and bioreactor development for animal cell cultivation. In **"Insect Cell Culture Engineering"**. Goosen, M., Daugulis, A. and Faulkner, P. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. p. 139-177.
- Ushiyama, K. 1991. Large scale culture of ginseng. In **"Plant cell culture in Japan"**. Komamine, A., Misawa, M. and Dicosmo, F. (Eds.). CMC, Tokyo, Jpn. p. 92-98.
- Van-den-Akker, 1997. On status and merits of computational fluid dynamics. In **"4th Int. Conf. on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics"**. Nienow, A. (Ed.), Mechanical Engineering Publications Limited. U.K. p. 407-431.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., Shripsema, J., Hoge, J. and ten-Hoopen, H. 1993. Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. **J. Nat. Prod.** 56: 186-207.
- Vogelman, H., Bischof, A., Pape, D. and Wagner, F. 1978. Some aspects on mass cultivation. In: **"Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods"**. Alfermann, A. and Reinhard, E. (Eds.), GSF. Munich. p 136-146.
- Wagner, F. and Vogelmann, H. 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. In **"Plant tissue culture and its biotechnological application"**. Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, H. (Eds.) , Springer-Verlag, Berlin. p. 245-255.
- Withers, L. 1985. Cryopreservation and storage of germplasm. In **"Plant Cell Culture, A Practical Approach"**. Dixon, R. (Ed.) IRL Press. p. 184-185.
- Wu, J. 1995. Mechanism of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. **J. Biotechnol.** 43: 81-94.
- Zhong, J., Seki, T., Kinoshita, S. and Yoshida, T. 1992. Rheological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*. **Biotechnol. Bioeng.** 40: 1256-1262.

- Zhong, J., Fujiyama, K., Seki, T. and Yoshida, T. 1994. A quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens* in bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.** 44: 649-654.
- Zhong, J. Yu, J. and Yoshida, T. 1995. Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 11: 461-467