



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**Centro de Desarrollo De Productos Bióticos**

**Departamento de Biotecnología**

**Cultivo de *Beta vulgaris* L. por lote alimentado para la  
producción de arabinogalactano-proteínas**

**TESIS**

Que para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

**PRESENTA**

Jorge Alberto Cantor del Angel

Directores:

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez



Yautepec, Morelos, Noviembre 2011



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos siendo las 15:00 horas del día 7 del mes de Octubre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI para examinar la tesis titulada:  
Cultivo de *Beta vulgaris* L. por lote alimentado para la producción de arabinogalactano-proteínas

Presentada por el alumno:

Cantor	Del Angel	Jorge Alberto
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro:
		B 0 9 1 3 5 5

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez

Dra. Gabriela Trejo Tapia

Dra. Edith Agaña Acevedo

Dra. Maria Soledad Córdova Aguilar

Dra. Perla Osorio Díaz

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



SEP IPN  
CENTRO DE DESARROLLO  
DE PRODUCTOS BIÓTICOS  
YAUTEPEC, MOR.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Yautepec, Morelos el día 24 del mes Octubre del año 2011, el (la) que suscribe Jorge Alberto Cantor del Angel alumno (a) del Programa de con número de registro B091355, adscrito a Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Mario Rodríguez Monroy y Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez y cede los derechos del trabajo intitulado Cultivo de *Beta vulgaris* L. por lote alimentado para la producción de arabinogalactano-proteínas, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62731, Apartado postal 24. Teléfonos: (735) 394 20 20, 394 18 96, (55) 57 29 69 00 Ext. 82500 / 82505. Fax 82512, 82521. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Jorge Alberto Cantor del Angel

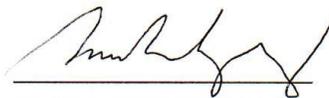
Nombre y firma

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yautepec, Morelos a 24 de Octubre del 2011

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis "Cultivo de *Beta vulgaris* L. por lote alimentado para la producción de arabinogalactano-proteínas" es responsabilidad del Dr. Mario Rodríguez Monroy, Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez y I.I.A. Jorge Alberto Cantor del Angel, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el texto.

ATENTAMENTE



Dr. Mario Rodríguez Monroy  
Director de tesis



Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez  
Director de tesis



Jorge Alberto Cantor del Angel  
Alumno

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de los Drs. Mario Rodríguez Monroy y Gabriela Sepúlveda Jiménez. La realización del trabajo contó con el financiamiento económico del proyecto SIP (20110311) y la beca CONACYT (No. de Registro: 331612).

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todos aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización del presente trabajo.

A mis directores de tesis Dr. Mario Rodríguez Monroy y Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez, por el apoyo y paciencia brindados durante la realización de este trabajo.

A los integrantes del comité tutorial y de revisión de tesis:

Dra. Gabriela Trejo Tapia, Dra. Edith Agama Acevedo, Dra. María Soledad Córdova Aguilar, Dra. Perla Osorio Díaz por cada una de las observaciones pertinentes para la mejora del trabajo de tesis.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la conclusión de mis estudios de Maestría.

---

---

*A mis padres Isabel Cantor de Jesús y Mauricia del Angel Escobar  
y hermanos Adrián, Mario, Diana Bellaly, Aurora Isabel y Jesús  
Ulises por estar presentes aún en la distancia.*

*A Edith Montes Hernández por su apoyo, cariño y comprensión*

*iii ESTAMOS AGRADECIDOS!!!!*

---

# ÍNDICE

	Páginas	
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	i
	<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	iii
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	iv
	<b>RESUMEN</b>	1
	<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
	2.1. Arabinogalactano-proteínas	5
	2.2. Función de las AGPs	6
	2.3. Producción de AGPs en cultivos <i>in vitro</i>	8
	2.4. Cultivo por lote alimentado	11
	2.5. Técnicas de control con retroalimentación	13
	2.5.1. El pH- <i>stat</i>	13
	2.6. Cultivo de células vegetales por lote alimentado	14
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	21
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	22
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
	5.1 Objetivo general	22

	5.2	Objetivos específicos	22
<b>6.</b>		<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
	6.1	Planteamiento experimental	23
	6.2.	Material biológico	23
	6.3.	Biorreactor	25
	6.4.	Cinéticas de crecimiento del cultivo de <i>B. vulgaris</i> por lote y lote alimentado en biorreactor	26
	6.5.	Evaluación del crecimiento celular	28
	6.6.	Determinación de sacarosa residual	28
	6.7	Análisis de correlación entre el consumo de HCl vs biomasa y sacarosa residual vs consumo de HCl	29
	6.8.	Cálculo de los rendimientos del cultivo por lote	30
	6.9.	Recuperación de proteínas extracelular y cuantificación del contenido de AGPs	30
	6.10.	Predicción del cultivo por lote alimentado de <i>B. vulgaris</i> en base al pH- <i>stat</i> a partir del cultivo por lote	32
	6.11.	Determinación de las curvas de flujo del medio de cultivo a diferentes concentraciones de sacarosa (50-400 g L <sup>-1</sup> )	33
<b>7.</b>		<b>RESULTADOS</b>	
	7.1.	Cinética de crecimiento del cultivo de <i>B. vulgaris</i> por lote en biorreactor: producción de AGPs y	35

	consumo de la fuente de carbono	
7.2.	Análisis de correlación entre el consumo de HCl con el crecimiento celular y el consumo de azúcares totales	37
7.3.	Predicción del crecimiento celular y producción de AGPs en los cultivos de <i>B. vulgaris</i> generados por el modelaje del cultivo por lote alimentado.	40
7.4	Comportamiento al flujo del medio de cultivo a diferentes concentraciones de sacarosa	43
7.5.	Cinética de crecimiento, producción de AGPs y sacarosa residual del cultivo por lote alimentado de <i>B. vulgaris</i> en biorreactor	45
7.6.	Parámetros cinéticos del cultivo por lote, del modelo y del lote alimentado	52
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Figura	Página
1	Esquema de la estructura de arabinogalactano-proteínas.	6
2	Planteamiento experimental general. Cinéticas de crecimiento en cultivo por lote de <i>B. vulgaris</i> para la determinación de los parámetros de alimentación (A). Evaluación experimental de los parámetros de alimentación obtenidos en un cultivo de <i>B. vulgaris</i> por lote alimentado con sacarosa (B).	24
3	Dimensiones del biorreactor (A) y el impulsor (B) empleados para el desarrollo de los cultivos de <i>B. vulgaris</i>	25
4	Configuración de la tapa del biorreactor usado para el cultivo por lote (CL) y en cultivo por lote alimentado (CLA) de las células de <i>B. vulgaris</i> .	27
5	Sistema de fermentación utilizado para el cultivo por lote alimentado de <i>B. vulgaris</i> . (A) Bomba peristáltica con cabezal doble para la adición de HCl y sacarosa; (B) bomba peristáltica para la adición de NaOH; (C) frasco de 1 L para trampa de espuma y salida de venteo.	27
6	Curva tipo de azúcares totales por el método de Dubois <i>et al.</i> (1956), utilizando sacarosa como estándar.	29
7	Curva tipo de goma arábica para la cuantificación del contenido de AGPs con el reactivo de Yariv.	31
8	Viscosímetro Haake Rotovisco modelo RV20, cabezal M5.	34
9	Sensor convencional GCC-NV de amplitud de gap de 0.35 mm.	34

10	Cinética de crecimiento del cultivo de <i>B. vulgaris</i> y consumo de sustrato en biorreactor. A) Crecimiento y producción de AGPs y B) sacarosa residual.	36
11	A) Control de pH y B) el perfil de consumo de HCl en el cultivo por lote de <i>B. vulgaris</i> .	38
12	A) Correlación entre al consumo de HCl y el crecimiento celular y B) relación entre el consumo de HCl y la sacarosa residual.	39
13	Cinéticas de crecimiento y producción de AGPs obtenidas del modelaje del cultivo por lote alimentado. A) Crecimiento celular y B) producción de AGPs.	41
14	Sacarosa residual del cultivo por lote alimentado en base al modelo.	42
15	Curvas del comportamiento al flujo del medio a diferentes concentraciones de sacarosa.	44
16	Cinética de crecimiento del CLA de <i>B. vulgaris</i> y consumo de sustrato en biorreactor. A) Crecimiento y producción de AGPs y B) sacarosa residual.	46
17	A) Control de pH y B) el perfil de consumo de HCl en el cultivo por lote de <i>B. vulgaris</i> .	48
18	Cinética de crecimiento del CLA de <i>B. vulgaris</i> y consumo de sustrato en biorreactor. A) Crecimiento y producción de AGPs y B) sacarosa residual.	50

19	A) Control de pH y B) el perfil de consumo de HCl en el cultivo por lote de <i>B. vulgaris</i> .	51
----	--	----

## ÍNDICE DE CUADROS

Número	CUADRO	Página
1	Características del cultivo de células vegetales por lote alimentado.	16
2	Viscosidad del medio a diferentes concentraciones de sacarosa.	44
3	Parámetros cinéticos del cultivo por lote, del modelo y del cultivo por lote alimentado.	53

## LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

CLA	Cultivo por lote alimentado
AGPs	Arabinogalactano-proteínas
CL	Cultivo por lote
X	Biomasa (g PS L <sup>-1</sup> o g PF L <sup>-1</sup> )
P.S.	Peso seco
P.F.	Peso fresco
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento (d <sup>-1</sup> )
AGPs <sub>SCL</sub>	Arabinogalactano-proteínas del cultivo por lote
Y <sub>X/S</sub>	Rendimiento (g de biomasa/g de sustrato)
HCl	Ácido clorhídrico
Y <sub>AGPs/X</sub>	Rendimiento (mg de AGPs/g de biomasa)
Q <sub>AGPs</sub>	Productividad (mg de AGPs L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
S	Sustrato (g L <sup>-1</sup> )
$\eta$	Viscosidad (Pa s <sup>-1</sup> )
Pa	Pascales
T	Esfuerzo de corte (Pa)
rpm	Revoluciones por minutos
Td	Tiempo de duplicación
kDa	Kilo Dalton
TR	Turbina Rushton
IPI	Impulsor de paletas inclinadas
$\mu_m$	Velocidad máxima de crecimiento (d <sup>-1</sup> )
K <sub>m</sub>	Constante de saturación

F	Velocidad de alimentación ( $\text{g h}^{-1}$ )
OD	Oxígeno disuelto
DO	Densidad óptica
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
Ln	Logaritmo natural
Vf	Volumen final del cultivo por lote alimentado (L)
Vi	Volumen inicial del cultivo por lote alimentado (L)
HCL <sub>A</sub>	Ácido clorhídrico adicionado (L)
Me <sub>A</sub>	Medio alimentado (L)
NaOH <sub>A</sub>	Hidróxido de sodio adicionado (L)
CMe <sub>A</sub>	Concentración de sacarosa del medio alimentado ( $\text{g L}^{-1}$ )
S <sub>E</sub>	Sacarosa residual experimental del cultivo por lote ( $\text{g L}^{-1}$ )
S <sub>CL</sub>	Sacarosa del cultivo por lote (g)
S <sub>A</sub>	Sacarosa alimentada (g)
S <sub>CLA</sub>	Sacarosa del cultivo por lote alimentado ( $\text{g L}^{-1}$ )
$\Delta X_{CLA}$	Incremento de la biomasa en el cultivo por lote alimentado ( $\text{g L}^{-1}$ )
X <sub>E</sub>	Biomasa experimental del cultivo por lote ( $\text{g L}^{-1}$ )
X <sub>Mo</sub>	Biomasa total del modelo para la técnica pH- <i>stat</i> ( $\text{g L}^{-1}$ )
AGP <sub>S<sub>Mo</sub></sub>	Producción de AGPs del modelo para la técnica de pH- <i>stat</i> ( $\text{mg L}^{-1}$ )
AGP <sub>S<sub>E</sub></sub>	Producción experimental de AGPs del cultivo por lote ( $\text{mg L}^{-1}$ )
CLA <sub>A</sub>	Cultivo por lote alimentado con tiempo de cinética de 4 días
CLA <sub>B</sub>	Cultivo por lote alimentado con tiempo de cinética de 9 días

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue establecer un cultivo de *Beta vulgaris* L. en biorreactor, bajo un régimen de lote alimentado (CLA), para la producción de arabinogalactano-proteínas (AGPs). El CLA consideró el uso del control pH-*stat* y sacarosa como la fuente de carbono. El cultivo por lote (CL) de *B. vulgaris* fue realizado para obtener las constantes cinéticas siguientes: concentración celular máxima ( $X_{CL}=12.15$  g PS L<sup>-1</sup>), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.21 d<sup>-1</sup>, producción de AGPs<sub>CL</sub> (67.42 mg L<sup>-1</sup>), rendimiento de biomasa a sacarosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) (0.336 g de células g<sup>-1</sup> de sacarosa), rendimiento de AGPs a sacarosa consumida  $Y_{AGPs/X}$  (4.92 mg de AGPs g<sup>-1</sup> de biomasa) y la productividad de AGPs ( $Q_{AGPs}$ ) de 0.985 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Un consumo de HCl de 72.13 mL fue necesario para mantener el pH del medio en 5.5 a lo largo del cultivo. Los parámetros  $Y_{x/s}$  y  $Y_{AGPs/X}$  del CL, la relación entre el HCl alimentado y de la sacarosa residual ( $R^2=0.89$ ) fueron usadas para ensayar diferentes concentraciones de sacarosa (50 a 400 g L<sup>-1</sup>) usando las ecuaciones del CLA. La concentración de sacarosa de 300 g L<sup>-1</sup> fue la condición que predijo la mejor producción de la biomasa (1.64 veces) y de AGPs (1.66 veces). El CLA de *B. vulgaris* en biorreactor, con el control de pH-*stat*, con 300 g de sacarosa L<sup>-1</sup> en la corriente de alimentación fue realizado. La producción de  $X_{CLA}$  y de AGPs<sub>CLA</sub> fue de 20.65 g PS L<sup>-1</sup> y 143.84 mg L<sup>-1</sup> con una  $\mu_{CLA}$  de 0.55 d<sup>-1</sup>, el consumo de HCl y sacarosa fue de 48.73 mL. En CLA, se obtuvo un  $Y_{AGPs/X}$  de 8.01 mg g<sup>-1</sup> y  $Q_{AGPs}$  de 2.0 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, con un consumo de 46.9 mL de HCl para controlar el pH del medio en 5.5. El CLA alcanzó la fase estacionaria al día 4; pero como la producción de AGPs seguía en aumento. Como consecuencia se continuó el CLA al día 9; los resultados mostraron una disminución de la biomasa del día 4 (11.52 g PS L<sup>-1</sup>), mientras que la producción de AGPs aumentó hasta 491.46 mg L<sup>-1</sup> (7.2 veces en relación al CL). La sacarosa alimentada no fue consumida por las células y esta fue acumulada en el caldo (45 g de sacarosa L<sup>-1</sup>). Esta condición puede ser un estrés que induce la secreción de AGPs por las células al medio de cultivo. Los resultados de este trabajo usando el CLA son pioneros para el crecimiento de las células de *B. vulgaris* en biorreactor y particularmente para la

producción de AGPs. La técnica de CLA mejora la producción de AGPs 7.2 en relación al CL.

### ABSTRACT

The objective of this study was to establish a culture of *Beta vulgaris* L. developing in bioreactor, under fed-batch regime (CLA), for the production of arabinogalactan-proteins (AGPs). CLA regime considered the use of pH-*stat* control and sucrose as carbon source. Batch culture (CL) of *B. vulgaris* was performed, and the next kinetic parameters were obtained: maximal biomass concentration ( $X_{CL} = 12.15 \text{ g DW L}^{-1}$ ), specific growth rate ( $\mu$ ) of  $0.21 \text{ d}^{-1}$ ,  $AGPs_{CL}$  production ( $67.42 \text{ mg L}^{-1}$ ), biomass yield to sucrose consumed ( $Y_{X/S} = 0.336 \text{ g cells g}^{-1}$  of sucrose), AGPs yield to sucrose consumed ( $Y_{AGPs/X} = 4.92 \text{ mg AGPs g}^{-1}$  of biomass) and AGPs productivity ( $Q_{AGPs} = 0.985 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). A consume of 72.13 mL of HCl was necessary in order to maintain the pH broth in 5.5 during the kinetic. The parameters obtained from the CL ( $Y_{X/S}$  and  $Y_{AGPs/X}$ ), the relation between the HCl feed and sucrose residual ( $R^2 = 0.89$ ) were used to essay different concentrations of sucrose (50 to 400  $\text{g L}^{-1}$ ) using the equations of CLA. Sucrose concentration of  $300 \text{ g L}^{-1}$  was the best condition to improve of biomass (1.64 fold) and AGPs (1.66 fold). The CLA of *B. vulgaris* in bioreactor, with the pH-*stat* control with  $300 \text{ g sucrose L}^{-1}$  in the feed stream was conducted. Production  $X_{CLA}$  and  $CLA_{AGPs}$  was  $20.65 \text{ g PS L}^{-1}$  and  $143.84 \text{ mg L}^{-1}$  with a  $\mu_{CLA}$  of  $0.55 \text{ d}^{-1}$ , the HCl and sucrose consumption was 48.73 mL. Under CLA  $Y_{AGPs/X}$  was  $8.01 \text{ mg g}^{-1}$  and  $Q_{AGPs}$  was  $2.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , 46.9 mL of HCl was necessary to control the pH broth in 5.5. The CLA reached the stationary phase at day 4; however AGPs production presents a trend to increase. In consequence, CLA was continued at day 9; results showed a reduction of biomass concentration ( $11.52 \text{ g DW L}^{-1}$ ), while AGPs production increased to  $491.46 \text{ mg of AGPs L}^{-1}$  (7.2 fold to CL). The sucrose fed was not consumed by the cell and it was accumulated in the broth ( $45 \text{ g sucrose L}^{-1}$ ). This condition could be an osmotic stress that induces the secretion of AGPs by the cell in the culture medium. Results of this work using the CLA are pioneer with *B. vulgaris* cell growing in bioreactor, and particularly to produce AGPs. The technique of CLA improve AGPs production 7.2 fold up in relation with CL.

## 1. Introducción

Las arabinogalactano-proteínas (AGPs) son proteínas altamente glicosiladas implicadas con el desarrollo de las plantas. En los cultivos de células en suspensión, las AGPs son secretadas al medio de cultivo. Las AGPs son inductores de la embriogénesis somática, aspecto de interés en programas de micropropagación de plantas. En la industria de los alimentos, las AGPs son importantes por sus propiedades emulsificantes y estabilizantes (Kreuger y Van Holst, 1993).

En particular, las AGPs de *B. vulgaris* son producidas por los cultivos de células en suspensión a nivel de matraz y de biorreactor (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999; Hernández-Sánchez, 2007; Capataz-Tafur *et al.* 2010). Uno de los requerimientos del cultivo es la necesidad controlar el pH en 5.5 mediante la adición de ácido clorhídrico (Hernández-Sánchez, 2007). Así mismo, tanto en matraz como en biorreactor se encontró que los perfiles de crecimiento son similares a los de la producción de AGPs en el medio de cultivo.

Capataz-Tafur *et al.* (2010), trabajaron con cultivos de *B. vulgaris* en matraces y observaron que el aumento de sacarosa inicial favorece la producción de biomasa y de AGPs, pero concentraciones superiores a  $30 \text{ g L}^{-1}$  inhiben el crecimiento celular. Con la alimentación de sacarosa al día 7 del cultivo, cuando las células consumieron parte de la sacarosa inicial, se reporta un aumento de 7 veces en la producción de AGPs. Los resultados anteriores, indican que un cultivo por lote alimentado (CLA), podría ser una estrategia para mejorar la productividad del cultivo de *B. vulgaris* con la posibilidad de controlar la alimentación de sacarosa de forma semiautomática.

Un CLA, es un proceso que se inicia con el biorreactor operando con un tercio del volumen nominal; al llegar a la etapa exponencial, se inicia una alimentación de uno o más nutrientes, sin salida del cultivo durante el proceso. Esta estrategia es utilizada para obtener cultivos de alta densidad celular de más de  $20 \text{ g PS L}^{-1}$  (Dörnenburg y Knorr, 1995; Doran, 1999; Nielsen *et al.*, 2002).

Por otra parte, existen varias formas de realizar un control de la alimentación de un CLA, una de ellas es las que se hace por medio de control por retroalimentación,

esto se refiere a que la alimentación se realiza en respuesta al cambio de una variable que se mide directamente en el biorreactor (en línea); las variables pueden ser: el pH (*pH-stat*) y la tensión de oxígeno disuelto (*DO-stat*). Tomando en consideración los antecedentes de crecimiento de *B. vulgaris* en biorreactor (CL) en los que las células demandan de ácido para mantener el pH del cultivo, la implementación de un CLA, pudiera estar basada en el *pH-stat*. Sin embargo, es necesario cuantificar el consumo del ácido y definir si este puede asociarse con el crecimiento de las células, para establecer las posibilidades de alimentar la sacarosa de forma asociada al consumo de HCl.

Aún no hay reportes del uso del CLA para la producción de AGPs. Aunque se reporta que en cultivos de células vegetales, en un CLA alimentando glucosa de manera lineal se obtiene un incremento de 9 veces en la producción de clorofila (Dalton, 1983). La alimentación con los precursores de los metabolitos en la corriente de alimentación también da como resultado incrementos en la producción del compuesto de interés. Edahiro *et al.* (2005) reportaron en cultivos de *Fragaria ananassa* que con un CLA alimentado intermitentemente con L-fenilalanina hay un incremento de 3.3 veces en la producción de antocianinas.

En el presente trabajo, se estableció un cultivo de *B. vulgaris* por lote alimentado con sacarosa en base al *pH-stat* para la producción AGPs.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Arabinogalactano-Proteínas

Las arabinogalactano-proteínas (AGPs) pertenecen a la familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina. La estructura de las AGPs consta de 1.5 a 9.0% de proteínas y de 91.0 a 98.5% de carbohidratos. El carbohidrato consiste en arabinogalactanos del tipo II, los cuales poseen una cadena lineal de D-galactosas unidas mediante enlaces  $\beta$  (1-6), estos carbohidratos se unen a la proteína por medio de hidroxiprolina (figura 1) y posiblemente a treonina y serina. Estos oligosacáridos varían en tamaño desde 30 a 150 residuos de azúcares, entre los cuales destacan: arabinosa, galactosa, fucosa, ramnosa y en algunos casos ácido glucurónico. Estas glicoproteínas presentan un peso molecular entre 60 y 300 kDa (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000; Showalter, 2001; Hernández-Sánchez, 2007). A nivel celular, las AGPs se encuentran localizadas en la pared celular, en la membrana plasmática y en forma soluble en el espacio de la pared celular, así como en organelos citoplasmáticos (Hernández-Sánchez *et al.*, 2009).

Las AGPs se relacionan con el desarrollo de las plantas, en la adhesión célula-célula, reconocimiento en polen-estigma, desarrollo del tejido vascular en el tallo, la expansión y división celular en las hojas. En cultivos *in vitro* estimulan la embriogénesis y la organogénesis (Komalavilas *et al.*, 1991; Wisniewska y Majewska-Sawka, 2007).

Las AGPs se pueden identificar por medio de una reacción específica de precipitación con el reactivo sintético  $\beta$ -glicosil-Yariv (Yariv *et al.*, 1962). Este reactivo es de gran utilidad en estudios bioquímicos, se usa para purificar las AGPs, para la localización histoquímica de la distribución subcelular y para conocer la función y repercusión de estas glicoproteínas en los procesos de crecimiento y de diferenciación de plantas. Hasta el momento solo se tienen posibles modelos de interacción AGP- $\beta$ GlcY, que sugieren que el reactivo de Yariv forma agregados entre

10 y 50 moléculas, donde el fenilglucósido queda hacia la parte externa del agregado (Immerzeel, 2005).

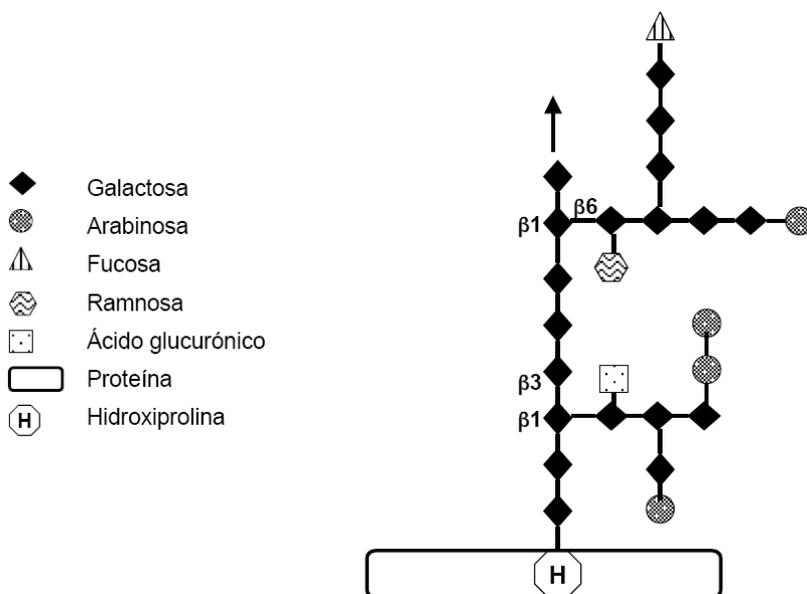


Figura 1. Esquema de la estructura de arabinogalactano-proteínas (Tomados de Hernández-Sánchez, 2007)

La biosíntesis de la parte proteica de las AGPs se lleva a cabo en el retículo endoplasmático y la prolina se modifica en hidroxiprolina por medio de la enzima peptidil-prolina hidrolasa. Mientras que la glicosilación se realiza en el aparato de Golgi, donde participan glicosil-transferasas, como la galactosil-transferasa para generar las uniones  $\beta$ -(1,6)-D-galactano. Al término de la síntesis, las AGPs son secretadas hacia la superficie celular por medio de vesículas (Schultz *et al.*, 1998; Hernández-Sánchez *et al.*, 2009).

## 2.2. Función de las AGPs

Debido a la amplia distribución de las AGPs en plantas, su estudio y caracterización bioquímica es fundamental, pues se sugiere que juegan un papel importante en diversos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas. En la embriogénesis somática, que es el proceso mediante el cual las células somáticas en cultivo de

tejidos llegan a formar embriones completos, se sugiere que las AGPs son moléculas clave para el desarrollo del embrión (Kreuger y Van Holst, 1993).

Van Hengel *et al.* (2001) observaron que la adición de arabinogalactanos al medio de cultivo, incrementó 30 veces el número de embriones somáticos de callos derivados de protoplastos de *Daucus carota*. En este mismo contexto, Wisniewska y Majewska-Sawka (2007) reportaron que al adicionar extractos ricos en AGPs al medio de cultivo, se puede inducir la embriogénesis en callos derivados de protoplastos de *B. vulgaris*, así como incrementar el número de brotes. Más recientemente, Zagorchev *et al.* (2008), observaron que la embriogénesis de cultivos de *Dactylis glomerata* L. se afectó, cuando el cultivo fue tratado bajo una condición de estrés salino (0.255 M NaCl). Este estrés salino, también provocó un incremento en la acumulación de AGPs de 0.76 mg g<sup>-1</sup> PF.

Por otra parte, el contenido de las AGPs se relaciona con la expansión celular, pero este proceso no está aún bien documentado. Zhu *et al.* (1993) realizaron estudios comparativos de los niveles de AGPs extracelular y de la membrana plasmática en cultivo de células de *Nicotiana tabacum* en medios con y sin sal; reportan que en el cultivo con sal, en la membrana celular no se encontraron AGPs; sin embargo, para las células control (sin sal) el contenido de AGPs fue de 0.16 µg µg<sup>-1</sup>. La falta de AGPs en el medio de cultivo con sal se correlaciona con una baja extensibilidad de la pared celular y sugiere la hipótesis que las AGPs están relacionados con la expansión celular. Lamport *et al.* (2006) señalan que en células de *N. tabacum* BY-2 estresadas con sal, hay una sobreacumulación de AGPs, además proponen que las AGPs clásicas actúan como una pectina plastificante, lo que explica como el reactivo de Yariv puede inhibir la expansión celular por la desactivación de la AGP monomérica.

En cultivos en suspensión de *Rosa sp*, las células tratadas con el reactivo de Yariv presentaron inhibición del crecimiento, asociando este efecto a la disminución de la división celular (Serpe y Nothnagel, 1993). Por otra parte, se reporta que el reactivo de Yariv, inhibe el crecimiento de los cultivos en suspensión de *Arabidopsis* ya que induce la muerte celular programada. Gao y Showalter (2000) proponen que las

AGPs pueden ser un componente importante de la traducción de la señal de apoptosis.

Cheng *et al.* (2008) estudiaron la relación que existe entre la acumulación de AGPs y la producción de taxol en células inmovilizadas de *Taxus cuspidata* y encontraron que ambos grupos de moléculas se incrementó 1.43 y 2.2 veces respectivamente en las células inmovilizadas a los 25 días del cultivo. Por lo que los autores sugieren, que las AGPs pueden ser moléculas de señal que están involucradas en la regulación de la producción de taxol en las células inmovilizadas de *T. cuspidata*.

### **2.3. Producción de AGPs en cultivos *in vitro***

Las AGPs pueden servir como moléculas inmunoestimulantes, además de presentar propiedades emulsificantes en las gomas vegetales que las contienen y se usan en la industria farmacéutica y de los alimentos (Verbeken *et al.*, 2003). En programas de micropropagación por medio de la embriogénesis somática, el uso de las AGPs resulta muy promisorio, por el efecto que tienen sobre la inducción de la embriogénesis somática (Pal *et al.*, 2003).

Algunos antecedentes sobre la producción de AGPs son el trabajo de Roja *et al.* (2005), que reportan que cultivos de callos de *Tinospora cordifolia* inmovilizados y elicitados con quitosano, presentó un aumento de 10 veces en la producción de AGPs, con respecto al control.

Pal *et al.* (2003) reportaron que un cultivo de embriones somáticos de *Echinacea purpurea* en un biorreactor *air-lift*, alcanzan una acumulación de AGPs en el medio de cultivo de 26-35 mg L<sup>-1</sup>.

Xu *et al.* (2004), expresaron en células de *N. tabacum* un gen sintético (GA)<sub>8</sub> que codifica para polipéptidos de la glicoproteína de la goma arábiga (GAGP); también el gen fue expresado junto con la proteína verde fluorescente (GFP). Los autores reportaron que la goma con (GA)<sub>8</sub> presenta una baja viscosidad, similares a la de la

goma arábica obtenida de plantas y que la proteína (GA)<sub>8</sub>GFP posee 1.28 más capacidad de emulsión que la goma arábica.

La goma de mezquite (*Prosopis laevigata*) posee propiedades emulsificantes y microencapsulantes, que pueden ser comparables a las de la goma arábica (Vernon-Carter *et al.*, 2000). Trejo-Espino *et al.* (2011) reportaron un protocolo para el establecimiento del cultivo de células en suspensión en matraces de *P. laevigata* como estrategia para la producción de la goma de mezquite. La producción de AGPs en los cultivos en suspensión fue de 51.5 mg L<sup>-1</sup>, la goma producida en el cultivo de callo y en suspensión tuvieron la misma capacidad emulsificante que la goma obtenida del árbol. Los cultivos de *P. laevigata* en el biorreactor mostraron una producción de 64.5 mg de AGPs L<sup>-1</sup> y se sugiere una relación entre el crecimiento y la producción de AGPs. La goma producida en biorreactor, tuvo mayor capacidad de emulsificar, pero su estabilidad fue menor al de la goma obtenida del árbol (Trejo-Espino *et al.*, 2010). Lo anterior indica que es factible el escalamiento de los cultivos de *P. laevigata* al biorreactor, pero las propiedades funcionales de la goma parecen modificarse con relación a las de la planta. Este resultado es consistente con el observado por Xu *et al.* (2004) con los cultivos de *N. tabacum* presentado anteriormente.

Otro sistema estudiado para la producción de AGPs es en cultivos de células de *Beta vulgaris* L. Rodríguez-Monroy y Galindo (1999), utilizaron el material extracelular precipitado con etanol, proveniente de cultivos de células de *B. vulgaris* desarrolladas en matraces Erlenmeyer y en biorreactor, para realizar una prueba cualitativa para la identificación de AGPs con el reactivo de Yariv; el ensayo resultó positivo. En ese mismo reporte se evidencio mediante electroforesis la existencia de una proteína de peso molecular de 116 kDa, con un punto isoeléctrico de 4. Posteriormente, Hernández-Sánchez (2007) reportó que el cultivo de *B. vulgaris* en biorreactor de 3 L, presenta una producción máxima de AGPs de 45.5 mg L<sup>-1</sup> y que el peso molecular de estas glicoproteínas fue de 115 a 159 kDa; mediante una electroforesis cruzada se demostró que se trataba de AGPs. Asimismo, se reporta que para el crecimiento del cultivo de *B. vulgaris* en biorreactor es necesario

controlar el pH a 5.5 mediante la adición de HCl; ya que las células tienden a bajar el pH del medio de cultivo, cuando se presenta el crecimiento celular y de no hacerlo el cultivo presenta un oscurecimiento y muerte celular. Lo anterior, permite suponer que se podría establecer un cultivo por lote alimentado, suministrando la fuente de carbono al mismo tiempo que las células demandan del HCl para el control de pH.

Por otro lado, en los mismos cultivos de células de *B. vulgaris*, la inhibición de la producción de las AGPs por su precipitación con el reactivo de Yariv, mostraron que la viabilidad de las células no es afectada, sin embargo la producción de AGPs en la pared celular, así como en el medio de cultivo disminuyen considerablemente con respecto al control. El crecimiento celular no fue afectado por el reactivo de Yariv, pero tuvo efecto de inhibición sobre la agregación celular, ocasionando la pérdida de la capacidad de crecimiento de los cultivos (Hernández-Sánchez, 2007; Capataz *et al.*, 2011). Todos éstos estudios indican que la producción de AGPs es un evento ligado al crecimiento de las células de *B. vulgaris*.

Santiago-Martínez (2009), realizó un estudio comparativo utilizando dos tipos de impulsores en un biorreactor tipo tanque agitado, encontrando que la mejor producción de estas glicoproteínas se obtiene con la turbina Rushton (flujo radial) con un máximo de 73 mg de AGPs L<sup>-1</sup>. Mientras que la acumulación de las AGPs con un impulsor de paletas inclinadas (flujo axial) fue de 26.10 mg de AGPs L<sup>-1</sup>. Los resultados anteriores, sugieren que las AGPs podrían producirse como respuesta al aumento del estrés hidrodinámico o que el estrés hidrodinámico del impulsor radial, pudiera favorecer la liberación de las AGPs presentes en la membrana y/o pared celular.

Capataz-Tafur *et al.* (2010) probaron el efecto de la concentración inicial de la fuente de carbono (sacarosa a 15, 30 y 45 g L<sup>-1</sup>) sobre el crecimiento y la secreción de AGPs al medio en cultivos en suspensión de *B. vulgaris*. Sugiriendo que la producción de AGPs está ligada al crecimiento celular. También, los autores evaluaron la adición de sacarosa mediante un pulso al día 7 de crecimiento del cultivo y observaron un aumento de 2 veces más en la biomasa y 4 veces en el rendimiento de las AGPs. Sin embargo, al alimentar manitol, como agente osmótico

no observaron cambios en el crecimiento celular, pero el rendimiento de las AGPs incrementó de forma notable. Los resultados anteriores, sugieren que la secreción de las AGPs está ligada al proceso de crecimiento celular, además de formar parte de la respuesta de las células al estrés osmótico.

#### **2.4. Cultivo por lote alimentado**

Las tres maneras de operar un biorreactor son: en régimen de lote (CL), por lote alimentado (CLA) y en cultivo continuo. El CL es un proceso cerrado, donde los sustratos se añaden desde el inicio del cultivo, a excepción de soluciones ácidas y alcalinas que permiten ajustar el pH y un suministro de aire, que proporciona el oxígeno a las células; la biomasa y productos extracelulares son removidos al término del proceso (Doran, 1999; Nielsen *et al.*, 2002). Para cultivos de células vegetales, el CL es reportado ampliamente para los estudios de producción de metabolitos secundarios (Chen y Huang, 2000; Nguyen *et al.*, 2006; Prakash y Srivastava, 2007; Bustos *et al.*, 2008).

El cultivo continuo se caracteriza por mantener de forma constante y con el mismo flujo, una corriente de entrada de nutrientes y una salida de productos, de tal manera que el volumen del medio en el biorreactor permanece constante y todos los nutrientes en el medio están presentes en una concentración constante (Doran, 1999; Nielsen *et al.*, 2002).

Para el caso del CLA, el proceso consta de dos etapas, en la etapa inicial se opera el biorreactor a un tercio del volumen nominal y al momento de que el cultivo llega a la fase exponencial de crecimiento, se inicia una alimentación de uno o más nutrientes, sin que exista salida alguna del cultivo durante el proceso, de esta forma el volumen de medio se incrementa hasta llegar a la máxima capacidad de trabajo del biorreactor.

En el CLA la concentración de uno o más de los nutrientes en el medio puede ser manipulado desde el exterior, mediante la alteración de la velocidad de alimentación,

de acuerdo a los parámetros de control y a las necesidades nutricionales de las células. Cuando termina el CLA, se puede retirar la misma cantidad de volumen alimentado para su procesamiento y obtener el producto, dejando a las células con la capacidad de dividirse para iniciar un nuevo cultivo, a tal proceso se le llama CLA repetido. La simple implementación de este tipo de cultivo, lo hace una estrategia eficiente para obtener un cultivo de alta densidad celular con más de  $20 \text{ g PSL}^{-1}$  (Minihane y Brown, 1986; Dörnenburg y Knorr, 1995; Doran, 1999; Nielsen *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2011).

La ventaja principal que ofrece el CLA, es la capacidad de controlar o alterar la concentración de uno o más nutrientes en el medio de cultivo. La alimentación de los nutrientes puede hacerse por medio de una bomba a flujo constante, variable o exponencial dependiendo del tipo de control de alimentación. Por tanto, es ideal para procesos en los que el crecimiento celular o la formación del producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante. Sin embargo, un punto crítico para obtener cultivos de alta densidad celular, es asegurar que el suministro de oxígeno no se vea limitado. Cuando la concentración celular y el metabolismo de los productos se incrementa, la transferencia de oxígeno disminuye, por lo cual se debe de tener un suministro adicional de oxígeno puro, para que al obtener un cultivo de alta densidad, el crecimiento no se vea afectado por la falta de oxígeno en el medio (Dalton, 1983; Minihane y Brown, 1986; Chung *et al.*, 2006).

El CLA se caracteriza por alimentar de manera continua o semicontinua, esto puede realizarse de forma controlada por retroalimentación y no controlada (Rodríguez-Monroy, 1991; Georgiev *et al.*, 2009). Las formas de alimentación que no tienen control por retroalimentación, se basan en modelos matemáticos para llegar a establecer las velocidades de alimentación de los nutrientes. Estos modelos se pueden clasificar en estructurados y no estructurados, siendo los no estructurados los más usados. Uno de ellos es el modelo de Monod, que describe el crecimiento en estado de equilibrio y se usa para predecir el comportamiento de crecimiento utilizando uno o varios nutrientes que limitan el crecimiento celular. El modelo de

Monod se basa en la velocidad de dilución, velocidad máxima de crecimiento y afinidad por el sustrato. Las ecuaciones utilizadas son:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad \text{Ec. 1}$$

$$F = \frac{\mu}{Y_{X/S} S_o} XV \quad \text{Ec. 2}$$

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $d^{-1}$ ),  $\mu_m$  es la velocidad máxima de crecimiento ( $d^{-1}$ ),  $K_s$  es la constante de saturación,  $S$  es el sustrato limitante ( $g L^{-1}$ ).  $F$  es la velocidad de alimentación,  $Y_{X/S}$  es el rendimiento de la biomasa respecto a la fuente de carbono,  $X$  es la densidad celular ( $g L^{-1}$ ) y  $V$  es el volumen del cultivo.

Estas fórmulas se utilizan para modelar el crecimiento celular en el CLA e inclusive se realizaron trabajos para la optimización de la velocidad de alimentación basados en ellas (Shuler y Kargi, 2002; Versyck y Van-Impe, 1999).

## 2.5. Técnicas de control con retroalimentación

La alimentación controlada con retroalimentación, es aquella alimentación que se realiza en respuesta al cambio de una variable que se mide directamente en el sistema. Las variables pueden ser: pH (*pH-stat*), tensión de oxígeno disuelto (*DO-stat*), densidad óptica (*OD-stat*). En general, estos sistemas de alimentación se basan en la medición en línea de cada una de las variables (por medio de electrodos o densímetros), sin embargo presentan el mismo fundamento (Minihane y Brown, 1985; Weuster-Botz *et al.*, 2001).

### 2.5.1. El *pH-stat*

En el CLA de microorganismos, es común utilizar las técnicas de control de alimentación de *pH-stat*, *DO-stat* y *OD-stat*, donde cada uno de las variables tiene un punto de control. Para el caso del *pH-stat*, el punto de control del pH es fijado en un

biocontrolador, pero en el momento que se rebasa el punto de control, se acciona el control de pH mediante la adición de un ácido o una base según sea el caso para mantener el valor de control constante. Esto provoca el control de las variables adicionando alguna de estas sustancias amortiguadoras y también acciona una bomba que alimenta el o los nutrientes que afectan el crecimiento celular (Minihane y Brown, 1985; Weuster-Botz *et al.*, 2001; García-Arrazola *et al.*, 2005).

Otra de las formas de control por retroalimentación es la medición de la conductividad del medio. Este método de control sobre el CLA permite obtener un aumento en la biomasa de las raíces cultivadas en biorreactor (Uozumi *et al.*, 1991; Uozumi *et al.*, 1995; Sim y Cham, 1999). Este tipo de control también ofrece la posibilidad de una alimentación intermitente a lo largo del cultivo.

## **2.6. Cultivo de células vegetales por lote alimentado**

Uno de los nutrientes que afecta el crecimiento celular es la fuente de carbono, debido a que provee energía requerida para el crecimiento y el mantenimiento celular, además el carbono es necesario para la formación de metabolitos secundarios (Rokem y Goldberg, 1985). De acuerdo a lo anterior, el uso de diferentes fuentes de carbono y la forma de alimentar a los cultivos de células vegetales es motivo de estudio.

En el cuadro 1 se presenta un resumen de los trabajos realizados sobre el cultivo de células vegetales por CLA. A continuación se describen los resultados más relevantes: Dalton (1983) publicó el primer trabajo de CLA en células vegetales, en donde se estudió el efecto de diferentes velocidades de alimentación de glucosa sobre la producción de clorofila en cultivos de *Ocimum basilicum* en biorreactor. Observando que la mejor producción de clorofila ( $14 \mu\text{g g}^{-1} \text{PS}$ ) se produce con la velocidad de alimentación de  $0.031 \text{ g h}^{-1}$ .

Wesgate *et al.* (1990) observaron un crecimiento diauxico para un cultivo en suspensión de *Cephalotaxus harrintonia* dado por un consumo diferencial de la

glucosa y la fructosa. Tomando en cuenta lo anterior, propusieron alimentar glucosa a diferentes concentraciones y fructosa con el objeto de que el cultivo mantuviera la velocidad de crecimiento específica constante a lo largo de la cinética y permaneciera en el estado de equilibrio (*steady state*), lo que sería lo más cercano a un cultivo continuo. Los resultados mostraron que al aumentar la concentración de glucosa en la alimentación, permitió mejorar la densidad celular, sin embargo, el estado de equilibrio se rompe. Por otra parte, al alimentar fructosa se obtuvo un estado en equilibrio, es decir el perfil de la densidad celular y de la concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo son similares a un cultivo continuo, no así para cuando se alimentó sacarosa. Los autores llegan a la conclusión que el modelo de Monod, no puede describir adecuadamente el crecimiento celular y que sería difícil utilizar un cultivo continuo en estado de equilibrio para el cultivo *C. harrintonia*.

El CLA se estudió como una forma de mejorar la producción de shikonina durante la fase estacionaria de crecimiento del cultivo de *Lithospermum erythrorhizon*; se ensayó una alimentación de un medio rico en sacarosa y un medio rico en nitrógeno. Los mejores resultados de producción de shikonina se obtuvieron al adicionar el medio rico en sacarosa al día 13 del cultivo; mientras que el nitrógeno no tuvo efecto sobre la producción de shikonina (Srinivasan y Ryu, 1993).

Cuadro 1. Cultivo de células vegetales por lote alimentado.

Espece	Sistema	Sustrato que alimentan	Forma de alimentación	Metabolito	Incremento en la producción	Referencia
<i>Ocimum basilicum</i>	Biorreactor	Glucosa 0.031 g h <sup>-1</sup>	Lineal	Clorofila	9	Dalton (1983)
<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Matraz	Glucosa 30, 45 y 90 g L <sup>-1</sup> Fructosa 30 g L <sup>-1</sup>	Lineal (1.5 mL d <sup>-1</sup> )	Biomasa		Westgate <i>et al.</i> (1991)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Matraz	Glucosa (30 y 40 g L <sup>-1</sup> )	Pulso	Shikonina	2 a 3	Srinivasan y Ryu (1993)
<i>Perilla frutescens</i>	Matraz	Sacarosa 100 g L <sup>-1</sup>	Intermitente	Antocianinas	1.15	Zhong y Yoshida (1995)
<i>Panax notoginseng</i>	Matraz	Sacarosa (5, 7.5 y 60 g L <sup>-1</sup> )	Intermitente	Saponinas Polisacáridos	2.3 1.18	Zhang <i>et al.</i> (1996)
<i>Panax notoginseng</i>	Matraz	Sacarosa (20 g L <sup>-1</sup> )	Intermitente	Saponinas Polisacáridos	2.8 3.4	Zhang y Zhong (1997)
<i>Thalictrum rugosum</i>	Biorreactor	Sacarosa	Intermitente	Berberina	4.4	Choi <i>et al.</i> (1999)
<i>Taxus chinensis</i>	Matraz	Sacarosa 20 g L <sup>-1</sup>	Pulso (7 d)	Taxoides	1.3	Wang <i>et al.</i> (1999)
<i>Taxus chinensis</i>	Matraz	Maltosa 1 y 2 p v <sup>-1</sup>	Intermitente	Taxoides	4.46	Choi <i>et al.</i> (2000)
<i>Taxus chinensis</i>	Matraz	Sacarosa 20 g L <sup>-1</sup>	Pulso (7 d)	Taxoides	3.4	Dong y Zhong (2001)
<i>Panax notoginseng</i>	Biorreactor	Sacarosa 10 g L <sup>-1</sup>	Pulso (14 d)	Saponinas Polisacáridos	2.39 g L <sup>-1</sup> 2.73 g L <sup>-1</sup>	Hu y Zhong (2001)
<i>Panax notoginseng</i>	Biorreactor	Sacarosa	Pulso (13 d)	Saponinas Polisacáridos	2.3 2.3	Hu <i>et al.</i> (2001)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Biorreactor	Glucosa 300 g L <sup>-1</sup>	Lineal	GFP	2	Liu <i>et al.</i> (2001)
<i>Taxus chinensis</i>	Biorreactor	Sacarosa (20 g L <sup>-1</sup> )	Pulso (16 d)	Taxoides	4.9	Luo <i>et al.</i> (2002)
<i>Fragaria ananassa</i>	Matraz	Fenilalanina (1mM)	Intermitente	Antocianinas	3.3	Edahiro <i>et al.</i> (2005)

Cuadro 1. Continuación

Espece	Sistema	Sustrato que alimentan	Forma de alimentación	Metabolito	Incremento en la producción	Referencia
<i>Panax ginseng</i>	Matraces	Sacarosa (30 g L <sup>-1</sup> )	Pulso (10 d)	Saponinas	3.5	Wu et al. (2005)
<i>Taxus chinensis</i>	Matraz Biorreactor	Sacarosa 20 mg L <sup>-1</sup>	Pulso (7 d)	Taxoides	5.4 7.7	Qian et al. (2005)
<i>Azadirachta indica</i>	Biorreactor	Glucosa (500 g L <sup>-1</sup> ) Nitrato y fosfato (35 y 0.5 g L <sup>-1</sup> )	Lineal (0.05 L d <sup>-1</sup> )	Azadirachtina	1.82	Prakash y Srivastava (2006)
<i>Dendrobium huoshanense</i>	Matraz	Sacarosa (50 g L <sup>-1</sup> )	Pulso (30 d)	Polisacáridos	109	Zha et al. (2007)
<i>Psoralea corylifolia</i>	Matraz	Sacarosa (1, 3 y 5 %)	Pulso (15 d)	Daidzeina Genisteina	1.55 1.3	Shinde et al. (2009)
<i>Commiphora wightii</i>	Matraz	Sacarosa y glucosa 1:1, 4%	Pulso (7 y 10 d)	Gugulsterona	1.6	Suthar y Ramawat (2009)
<i>Beta vulgaris</i>	Matraz	Sacarosa 23 g L <sup>-1</sup>	Pulso (7 d)	AGPs	5	Capataz-Tafur et al. (2010)
<i>Oryza sativa</i>	Biorreactor	Aminoácidos	Pulso (7 d)	hCTLA4Ig	1.07	Park et al. (2010)
<i>Vitis vinífera</i>	Biorreactor	Sacarosa 30 g L <sup>-1</sup>	Pulso (14 d)	Estilbeno Catequina	9.3 8.6	Ferri et al. (2011)

La producción de saponinas y polisacáridos con usos como anti-tumorantes, cardio-protectivos, hepato-protectivo e inmuno-estimulantes, es también reportada usando cultivos de células vegetales en CLA (Zheng y Yang, 1994; Zhang et al., 1996). Al evaluar el efecto de la concentración inicial de sacarosa para la producción de saponinas y polisacáridos, con el fin de establecer un CLA de células de *Panax notoginseng*, se encontró que una concentración inicial de sacarosa de 60 g L<sup>-1</sup>, produce un estrés osmótico que estimula la síntesis de saponinas, los autores reportan que para establecer el CLA para la producción de saponinas es necesaria la alimentación de sacarosa intermitentemente en los días 8 y 12 del cultivo, esto

para incrementar la biomasa activa; pero para la acumulación de saponinas es necesario alimentar sacarosa al día 16 del cultivo, donde se obtuvo una producción 2.3 veces más que el control. Sin embargo, la producción de polisacáridos tuvo un aumento de 1.18, que es similar al control. De acuerdo a estos resultados, los autores concluyen que la estrategia de la alimentación de sacarosa que adaptaron, es eficiente para el aumento en la producción de saponinas (Zhang *et al.*, 1996). En este mismo contexto, Zhang y Zhong (1997) optimizaron el medio de CL para *P. notoginseng* y propusieron un CLA por medio de una alimentación intermitente de sacarosa en la fase exponencial, para la producción de saponinas y polisacáridos. Los autores enfatizan que un CLA favorece el escalamiento para la producción simultánea de polisacáridos y saponinas en cultivos en suspensión en biorreactor de *P. notoginseng*. Posteriormente, Hu *et al.* (2001), llevaron a cabo el escalamiento del cultivo de células en suspensión de *P. notoginseng* de matraces a dos tipos de biorreactores (*air-lift* y columna de burbujeo) para la producción de saponinas y polisacáridos ginseng, obteniendo un mejor resultado con el biorreactor *air-lift*. Utilizando un CLA con sacarosa mediante un pulso al día 13.

Por otra parte, Choi *et al.* (1999) desarrollaron un modelo para un CLA de *Thalictrum rugosum* con sacarosa. La premisa del modelo fue mantener a las células activas. Los autores reportan que si se utiliza un CLA manteniendo la viabilidad celular, se pueden obtener hasta 4.4 veces más berberina a una densidad celular de 30.23 g PS L<sup>-1</sup>.

Wang *et al.* (1999) reportaron una mejora de la producción de taxoides en cultivos en suspensión de *Taxus chinensis*, por medio de una sola adición de sacarosa (20 g L<sup>-1</sup>) al día 7 de la cinética de crecimiento. Los autores reportaron una producción de taxano de 274.4 mg L<sup>-1</sup> y un rendimiento celular de 27g PS L<sup>-1</sup>. Choi *et al.* (2000) ensayaron una alimentación intermitente de sacarosa y maltosa en cultivos de *T. chinensis*. Con la maltosa la producción de taxoides fue mayor que con la sacarosa. Lo que sugiere que la producción de taxoides es una respuesta de las células a un choque osmótico. Por otra parte, Dong y Zhong (2001) combinaron el CLA de *T. chinensis* con sacarosa y la elicitación con metil-jasmonato, con lo que se obtuvo

una producción de taxanos de 527 mg L<sup>-1</sup>. Luo *et al.* (2002) emplearon la alimentación de diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa) a diferentes tiempos (8, 12, 16 y 20 d) de la cinética de crecimiento en cultivos en suspensión de *T. chinensis* para la producción de paclitaxol. Los autores reportan un aumento de 4.9 veces de la producción de paclitaxol cuando se alimenta sacarosa (20 g L<sup>-1</sup>) al día 16 del cultivo. Quian *et al.* (2005) reportaron que el cultivo en suspensión de *T. chinensis* en matraz y en biorreactor tipo *air-lift* con una alimentación de un pulso de sacarosa (20 g L<sup>-1</sup>) puede aumentar su producción de hasta 5.4 en matraz y 7.7 veces en biorreactor con respecto al control.

La producción de la proteína verde fluorescente (GFP) tiene importancia como proteína reportera de bioprocesos. Las células transgénicas de *Nicotiana tabacum* en cultivo por lote, secretan GFP al medio de cultivo. Además su producción está ligada al crecimiento, por lo que se propuso un CLA con glucosa para la producción de GFP. Con éste proceso se alcanzó una producción de hasta dos veces más GFP, con respecto al control (Liu *et al.*, 2001).

En otro estudio, la alimentación intermitentemente de L-fenilalanina en el cultivo de células en suspensión de *Fragaria ananassa*, aumentó la producción total de antocianinas hasta en 3.3 veces (Edahiro *et al.*, 2005). Wu *et al.* (2005), evaluaron el efecto osmótico (sorbitol) y la alimentación de sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), en cultivos en suspensión de *Panax ginseng* sobre la producción de saponinas. Con este sistema se reporta un aumento de 3.5 veces de saponinas con respecto al control. El aumento de la producción de saponinas es quizás debido a un efecto sinérgico provocado por la alimentación de sacarosa y el sorbitol.

Prakash y Srivastava (2006) propusieron un modelo para determinar la velocidad de alimentación de sacarosa, nitrato y fosfato en un CLA de *Azadirachta indica* en biorreactor de 3L y mejorar la producción de azadirachtina. Con los parámetros cinéticos obtenidos de un CL se usaron como la base del modelo propuesto por Monod y determinar que la velocidad de alimentación de los nutrientes era de 0.05 L d<sup>-1</sup>; con esta velocidad los autores reportar una producción de 0.082 g de azadirachtina L<sup>-1</sup>, valor que es 1.82 veces más alto al obtenido con el CL y

concluyen que los resultados experimentales fueron muy similares a los predichos por el modelo.

*Dendrobium huoshanense* es una especie que produce polisacáridos que tienen efecto inmunoestimulante, antitumoral y antimutagénico, por lo que se planteó la posibilidad de la producción de estos polisacáridos por medio de cultivos de protocormos en suspensión y mejorar el medio de cultivo a través de la alimentación de sacarosa a diferentes días de la cinética de crecimiento (Zha *et al.*, 2007). La mejor producción se reportó mediante la alimentación de sacarosa (50 g L<sup>-1</sup>) al día 30 del cultivo. La cantidad de polisacáridos es 109 veces más alta que la obtenida en los controles (Zha *et al.*, 2007).

Con el fin de aumentar la productividad de daidzeína y genisteína en cultivos en suspensión de *Psoralea corylifolia*, se implementó la alimentación de sacarosa a diferentes concentraciones al día 15 del cultivo, observando un aumento en la concentración celular de 2.1 veces, cuando se alimentó 5% de sacarosa. Sin embargo, al alimentar una concentración de 1% de sacarosa, se aumentó 1.5 veces la producción de daidzeína y 1.3 veces de genisteína (Shinde *et al.*, 2009).

Suthar y Ramawat (2009) evaluaron la acumulación de guggulsterona en un CLA de *Commiphora wightii* con sacarosa y glucosa, en una relación 1:1. Con la alimentación de las fuentes de carbono a los 7 y 10 días del cultivo, la producción de guggulsterona fue de 353 mg L<sup>-1</sup>, esto es 3 veces más con respecto al control.

Park *et al.* (2010) utilizaron un CLA con aminoácidos, para evitar un recambio del medio en la producción de la proteína recombinante hCTLA4Ig en el cultivo de células en suspensión de *Oryza sativa*. Por medio de esta estrategia, lograron que la concentración de esta proteína en el CLA fuera prácticamente igual a la que obtenían con el cultivo en dos etapas. Además, el escalamiento del CLA a un biorreactor de 15 L causó un alto contenido de proteína; sin embargo, la composición de monosacáridos entre la proteína nativa y la producida *in vitro* son diferentes.

Finalmente, Ferri *et al.* (2011) propusieron un CLA de células en suspensión de *Vitis vinifera* mediante un pulso de sacarosa, para la producción de estilbeno y catequina.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las arabinogalactano-proteínas (AGPs) son compuestos de interés como inductores de la embriogénesis somática, dentro de sistemas de micropropagación de plantas. Además éstas moléculas presentan actividad emulsificante y estabilizante que las hace atractivas para su uso en la industria de alimentos. En particular, los cultivos de *B. vulgaris* secretan AGPs al medio de cultivo. El cultivo por lote es el régimen de operación usado para cultivar las células de *B. vulgaris* tanto en matraces como en biorreactor. La producción de AGPs está ligada al crecimiento celular, además es necesario el control del pH del cultivo a 5.5 mediante la adición de HCl. Estas características sugieren que el control del crecimiento del cultivo repercutirá en la producción de AGPs.

En tal sentido, el cultivo por lote alimentado (CLA) podría generar cultivos de alta densidad e incrementar la producción de las AGPs. Así mismo, el CLA tiene formas de control de alimentación, basados en la medición en línea de alguna variable relacionada al crecimiento celular, como lo es el control de la alimentación en base al pH-*stat*. Por ello, es necesario realizar el modelaje de las condiciones de alimentación, en vísperas de predecir la velocidad de alimentación o la concentración del nutriente que se alimentará.

Tomando en cuenta lo anterior, en éste trabajo se plantea establecer un cultivo por lote alimentado basado en el control de pH ligado a una alimentación de la fuente de carbono (pH-*stat*), que permitirá incrementar la producción de AGPs de los cultivos de *B. vulgaris*.

## 4. HIPÓTESIS

El cultivo de *B. vulgaris* en biorreactor bajo un régimen por lote alimentado, en donde la alimentación de la sacarosa basada en el pH-*stat* incrementará la producción de AGPs con relación al cultivo por lote.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Establecer un cultivo de *B. vulgaris* en biorreactor, operado en régimen por lote alimentado con sacarosa basado en el pH-*stat* para la producción de arabinogalactano-proteínas.

### 5.2. Objetivos específicos

- Obtener los parámetros de crecimiento de un cultivo de *B. vulgaris* en un régimen de lote y cuantificar el consumo de HCl.
- Realizar un análisis de la relación entre el consumo de HCl, de sacarosa y el crecimiento celular de los cultivos de *B. vulgaris* crecidos en un régimen de lote.
- Predecir el crecimiento y la producción de AGPs de un cultivo de *B. vulgaris* mediante el uso de las ecuaciones de cultivo por lote alimentado, utilizando los parámetros cinéticos del cultivo por lote y considerando la alimentación de sacarosa basada en el pH-*stat*.
- Evaluar experimentalmente las condiciones obtenidas en el modelo para el cultivo por lote alimentado, que permitirían generar una mayor producción de AGPs.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Planteamiento experimental

Para poder cumplir los objetivos del trabajo, se propuso el diagrama experimental presentado en la figura 2. El estudio constó de tres etapas:

A) Para obtener los parámetros cinéticos de los cultivos y cuantificar el consumo de ácido por parte de las células, se realizaron cinéticas de crecimiento en cultivo por lote en un biorreactor de 3L tipo tanque agitado utilizando un impulsor de tipo radial (TR) (Rodríguez-Monroy y Galindo 1999; Santiago-Martínez, 2009). Se determinaron las siguientes variables de respuesta: velocidad específica de crecimiento, rendimientos biomasa-sustrato y biomasa-producto, sacarosa residual y el consumo de HCl. Con los resultados se analizó la pertinencia de un control mediante el pH-*stat*.

B) Mediante el uso de las ecuaciones de CLA se simuló las condiciones de cultivo, para definir la concentración de sacarosa de alimentación al cultivo.

C) La implementación de algunas modificaciones en el biorreactor para operar en CLA y la evaluación de las condiciones predichas por los modelos matemáticos, con base en la cuantificación de los resultados de crecimiento celular, producción de AGPs, consumo de sacarosa y HCl.

### 6.2. Material biológico

Se utilizó un cultivo de *B. vulgaris* variedad Crosby's Egyptian de fenotipo rojo obtenido por Ontiveros (1994). El mantenimiento de la línea celular se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968), adicionado con sacarosa al 3%, cinetina ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ácido diclorofenoxiacético ( $0.02 \text{ mg L}^{-1}$ ). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.5 con NaOH 1N o HCl 1N antes de la esterilización. Los cultivos se sembraron cada 14 días y se incubaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, en agitación orbital a 120 rpm.

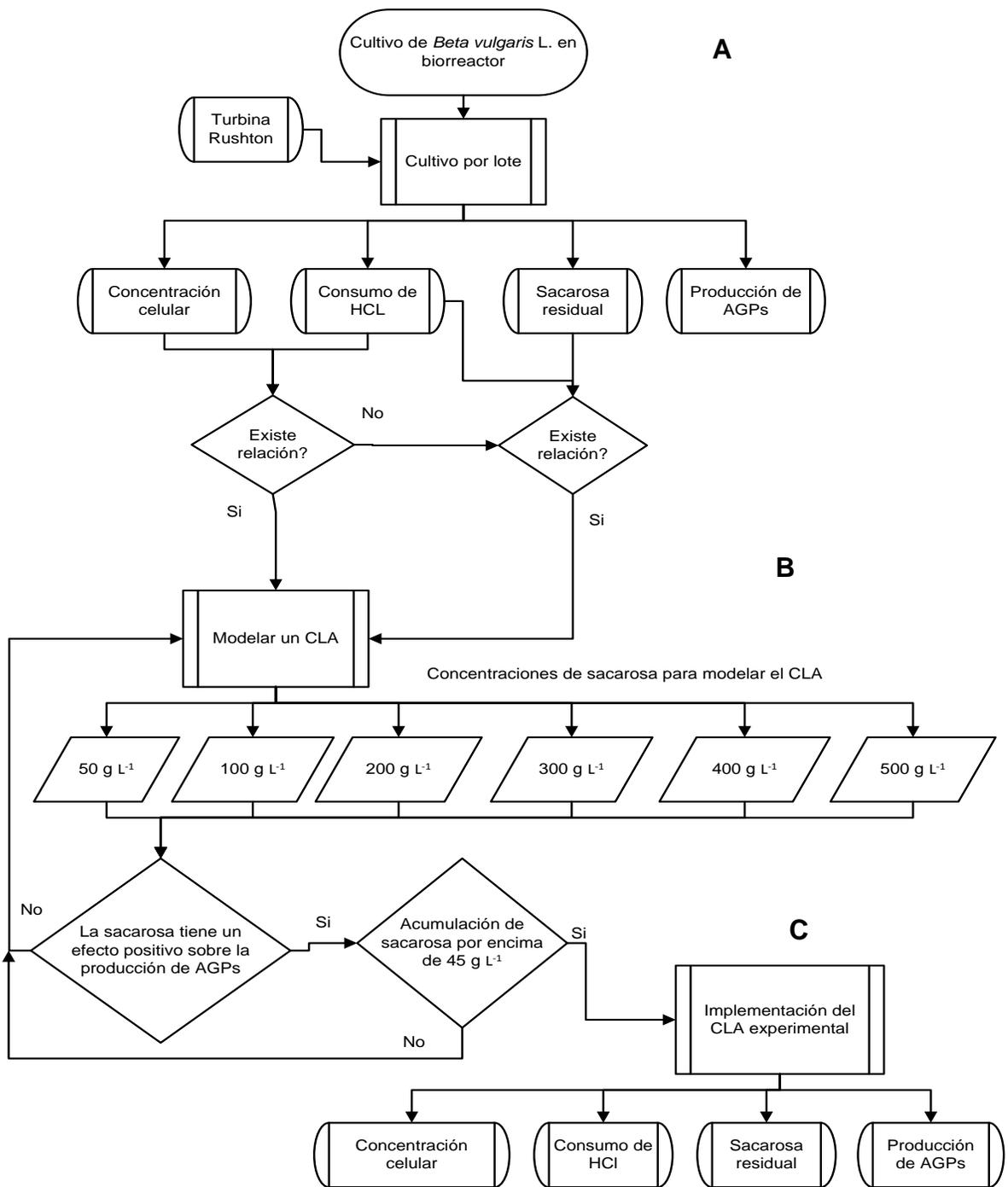


Figura 2. Diagrama experimental. Cinéticas de crecimiento en cultivo por lote de *B. vulgaris* para la determinación de los parámetros de alimentación (A). Simulación del cultivo por lote alimentado (B). Evaluación experimental de los parámetros de alimentación obtenidos en un cultivo de *B. vulgaris* por lote alimentado con sacarosa(C).

### 6.3. Biorreactor

Se utilizó un biorreactor de 3 L de volumen nominal (Applikon, Schiedam, Holanda) provisto de una tapa de acero inoxidable con multipuertos (figura 3A). En la entrada de aire, en las salidas de venteo y de toma de muestra, se colocaron filtros de tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  (POLYCAP, Whatman). Los electrodos de pH y oxígeno se conectaron a un biocontrolador modelo ADI 1030 (Applikon, Schiedam, Holanda) para realizar el registro y control de pH y tensión de oxígeno disuelto en el medio (TOD). Se usó un impulsor tipo turbina Rushton (TR) (figura 3B) que se colocó a 2.6 cm del fondo del tanque. La relación diámetro del impulsor/diámetro del tanque fue de 0.35. La agitación de los cultivos se realizó con un motor de velocidad variable y un controlador de velocidad modelo ADI 1012 (Applikon, Schiedam, Holanda).

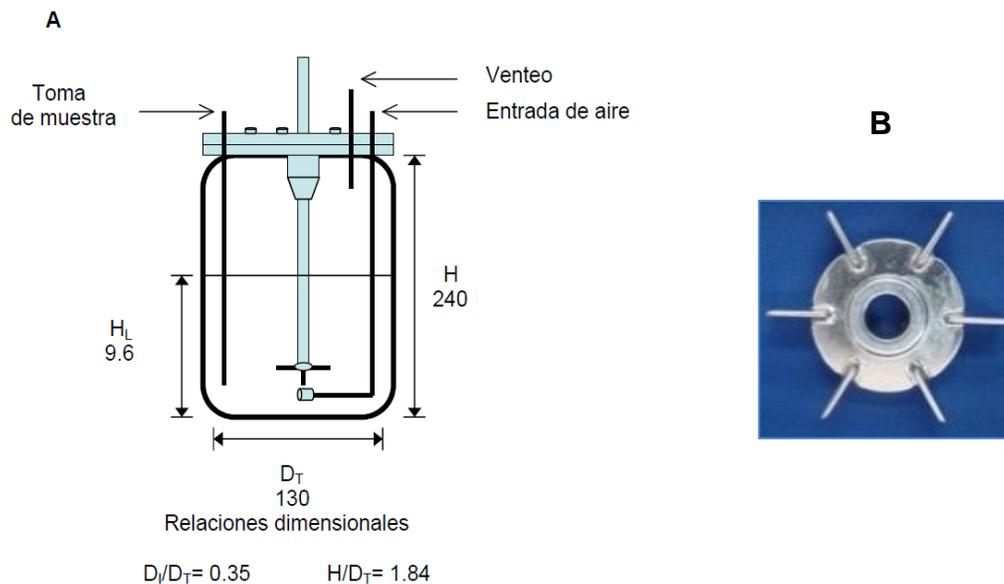


Figura 3. Dimensiones (mm) del biorreactor (A) y el impulsor turbina Rushton (B) empleados para el desarrollo de los cultivos de *B. vulgaris* (Hernández-Sánchez, 2007; Santiago-Martínez, 2009).

#### **6.4. Cinéticas de crecimiento del cultivo por lote y por lote alimentado en biorreactor.**

En el cultivo por lote de *B. vulgaris*, el biorreactor de 3 L se operó con 900 mL de medio de cultivo Gamborg's B5 con sacarosa al 3%, cinetina ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ácido diclorofenoxiacético ( $0.02 \text{ mg L}^{-1}$ ), se inoculó con 200 mL de un cultivo de *B. vulgaris* de 7 días. El biorreactor se operó a 400 rpm, 0.1 vvm y  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad con ayuda de 3 lámparas de luz fría. El pH y la tensión de oxígeno fueron monitoreados con electrodos durante toda la cinética de crecimiento. El pH se controló a 5.5 mediante la adición de HCl 0.1 N con un biocontrolador (ADI 1030, Applikon). La tensión de oxígeno disuelto se mantuvo por arriba del 10% de saturación, sin necesidad de adicionar oxígeno puro. El muestreo se realizó cada 24 horas, retirando 50 mL del cultivo y se evaluó la biomasa, el contenido de AGPs y la sacarosa residual.

En la figura 4, se presenta la configuración de los puertos del biorreactor para el cultivo por lote. Para el CLA, se cambió la configuración de algunos de los puertos de entrada del biorreactor (figura 4), específicamente en el puerto 3 es un tapón con tres conductos, se colocó el puerto de alimentación de sacarosa en lugar de la salida de venteo, manteniendo la alimentación de HCl y NaOH. Mientras que en el puerto 6 se colocó una trampa de espuma seguida de la salida de venteo. Otras adaptaciones necesarias, para operar el CLA fueron en el uso de las bombas peristálticas de velocidad lineal (figura 5 A y B), además de una trampa de espuma. En la bomba A se instaló un cabezal de doble entrada, para la alimentación de la sacarosa y del HCL, lo que permitió disminuir el error de operación al momento de la alimentación. En la bomba B, se mantuvo la alimentación de NaOH (0.3 M) para ajuste de pH.

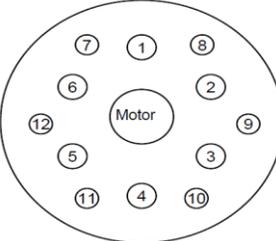
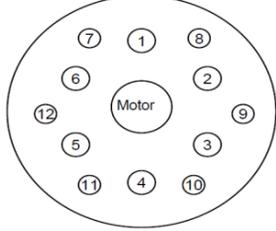
CL		1,2 Electrodos de oxígeno y pH <b>3</b> <b>Entrada de HCl, de NaOH y venteo</b> 4,5 Tapones <b>6</b> <b>Venteo</b> 7 Entrada de aire 9 Toma de muestra 11 Termopozo 8,10,12 Mamparas
CLA		1,2 Electrodos de oxígeno y pH <b>3</b> <b>Entrada de HCl, de NaOH y Sacarosa</b> 4,5 Tapones <b>6</b> <b>Trampa de espuma y venteo</b> 7 Entrada de aire 9 Toma de muestra 11 Termopozo 8,10,12 Mamparas

Figura 4. Configuración de la tapa del biorreactor usado para el cultivo por lote (CL) y en cultivo por lote alimentado (CLA) de las células de *B. vulgaris*.

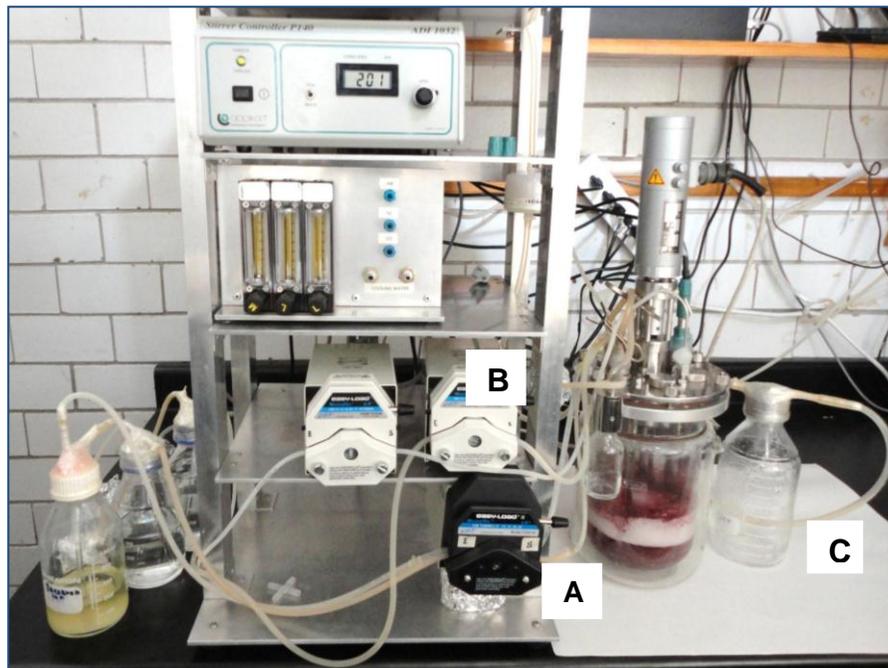


Figura 5. Sistema de fermentación utilizado para el cultivo por lote alimentado de *B. vulgaris*. (A) Bomba peristáltica con cabezal doble para la adición de HCl y sacarosa; (B) bomba peristáltica para la adición de NaOH; (C) frasco de 1 L para trampa de espuma y salida de venteo.

## 6.5. Evaluación del crecimiento celular

El crecimiento celular se evaluó por medio de la determinación del peso fresco y seco. Se filtraron 4 mL del cultivo en un sistema de vacío (matraz Kitazato y embudo de porcelana) sobre un papel filtro (Whatman No. 1) de peso conocido y se determinó el peso de la biomasa fresca. El peso seco, se obtuvo al secar la muestra en un horno a 70 °C durante 24 h. Para caracterizar el crecimiento de los cultivos, se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en la fase exponencial. Para esto, se construyó una gráfica de los logaritmos naturales de los valores de peso seco vs el tiempo de cultivo, en donde en la región lineal se obtiene la pendiente de la recta, la cual correspondió a la velocidad de crecimiento del cultivo.

El tiempo de duplicación se calculó mediante la ecuación:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ec.3}$$

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $d^{-1}$ ) y  $td$  es el tiempo de duplicación en d.

## 6.6. Determinación de sacarosa residual

Se siguió la metodología propuesta por Dubois *et al.* (1956) para la determinación de azúcares reductores totales. Las muestras del medio de cultivo se diluyeron con agua hasta alcanzar concentraciones menores a 200 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente a 1 mL de la solución de medio se le adicionó 1 mL de fenol al 5 % y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%). Las muestras se leyeron a una absorbancia de 490 nm. Para construir la curva tipo se utilizó sacarosa en un intervalo de 0 a 200 mg L<sup>-1</sup> (figura 6).

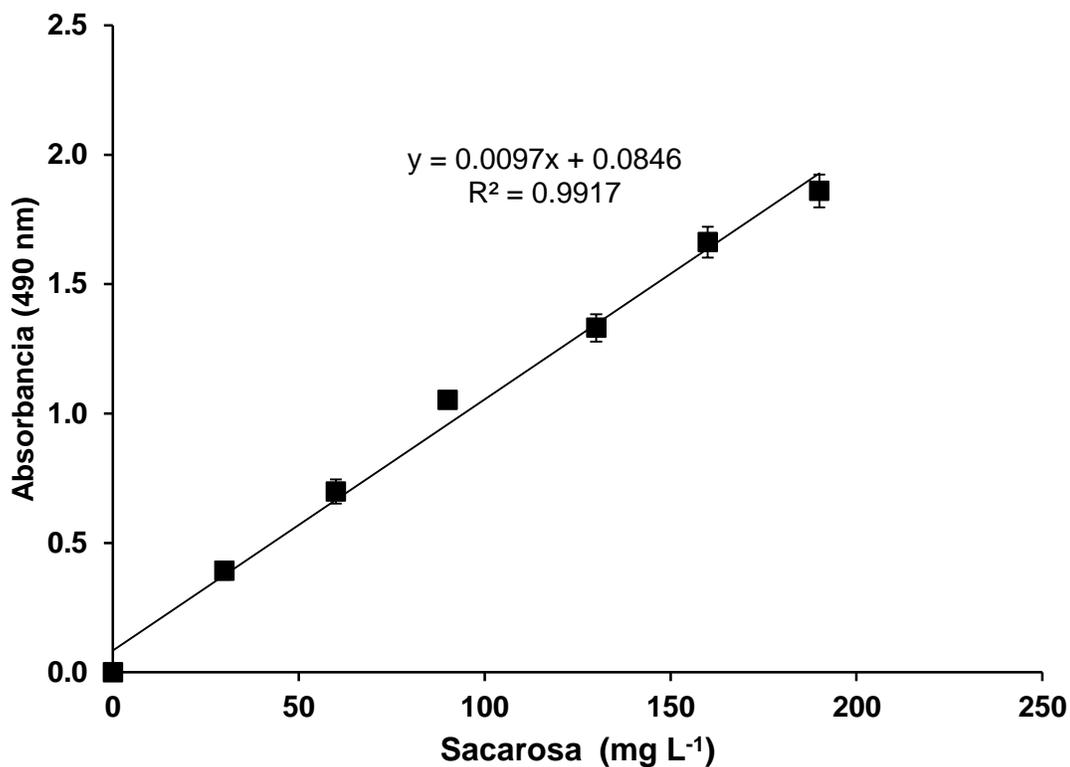


Figura 6. Curva tipo para la determinación de azúcares totales por el método de Dubois *et al.* (1956).

### 6.7. Análisis de correlación entre el consumo de HCl vs biomasa y sacarosa residual vs consumo de HCl

Los gráficos de correlación del HCl consumido en función de las diferenciales de crecimiento, así como el de sacarosa residual vs consumo de HCl se obtuvieron con una hoja de cálculo Microsoft Office Excel 2007 (Windows XP) y se determinaron los valores de regresión de las curvas ( $R^2$ ).

## 6.8. Cálculo de rendimientos en cultivo por lote

En los cultivos de células vegetales se requiere conocer los rendimientos que se presentan es decir, definir la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido (usualmente la fuente de carbono). El rendimiento celular se calculó mediante la ecuación:

$$Y_{x/s} = \frac{dX}{dS} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde X es la biomasa en g L<sup>-1</sup> y S la concentración del sustrato g L<sup>-1</sup>

El rendimiento en producto estará dado por la ecuación:

$$Y_{p/s} = \frac{dP}{dS} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde P es el producto final (AGPs) en mg L<sup>-1</sup> y S la concentración de sustrato g L<sup>-1</sup>.

La productividad de los cultivos está dada por:

$$Q_{AGPs} = \frac{AGPs_f - AGPs_o}{t(X_f - X_o)} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde Q<sub>AGPs</sub> es la productividad en mg de AGPs L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, t es el tiempo en días.

## 6.9. Recuperación de proteína extracelular y cuantificación de AGPs

La proteína extracelular se recuperó a partir del filtrado. Los componentes del medio de cultivo fueron separados de la proteína a través de una diálisis en membranas de celulosa (Sigma, Chemical Company) con un corte de peso molecular de 12 kDa. La diálisis contra agua desionizada se realizó durante 48 h a 4 °C. El material dializado se concentró por liofilización y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para la cuantificación de las AGPs, se realizó una difusión radial en gel de agarosa de acuerdo a la metodología de van Holst y Clarke (1985). Se elaboraron geles de 7.7 x 2.6 x 0.1 cm de agarosa al 1% con NaCl (0.15 mM), azida de sodio (0.02 %) y β-(D-glucosil) (10 μg mL<sup>-1</sup> de gel) sobre vidrios de portaobjetos. Cuando el gel solidificó, se realizaron dos filas de 7 pozos, cada uno de 1.2 mm de diámetro con una separación de un centímetro entre cada pozo y entre las filas. En cada pozo se

colocó 1  $\mu\text{L}$  de una solución del material que se recuperó de la diálisis y la liofilización. La concentración de las soluciones fueron de 1  $\text{mg L}^{-1}$  o 2  $\text{mg L}^{-1}$ , de acuerdo al día del cultivo. Los geles se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 20 h. Después se tomaron imágenes con una cámara Sony de 14 megapíxeles. Se calcularon los diámetros de los halos de precipitación que se formaron por la reacción de las AGPs con el reactivo de Yariv con el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). El área del halo se calculó mediante la ecuación del área de un círculo. Para obtener la cantidad de AGPs en la alícuota, el valor de área del halo se interpoló en una curva tipo (figura 7) la cual se realizó con goma arábiga a concentraciones que van de 0.1 a 0.7  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ .

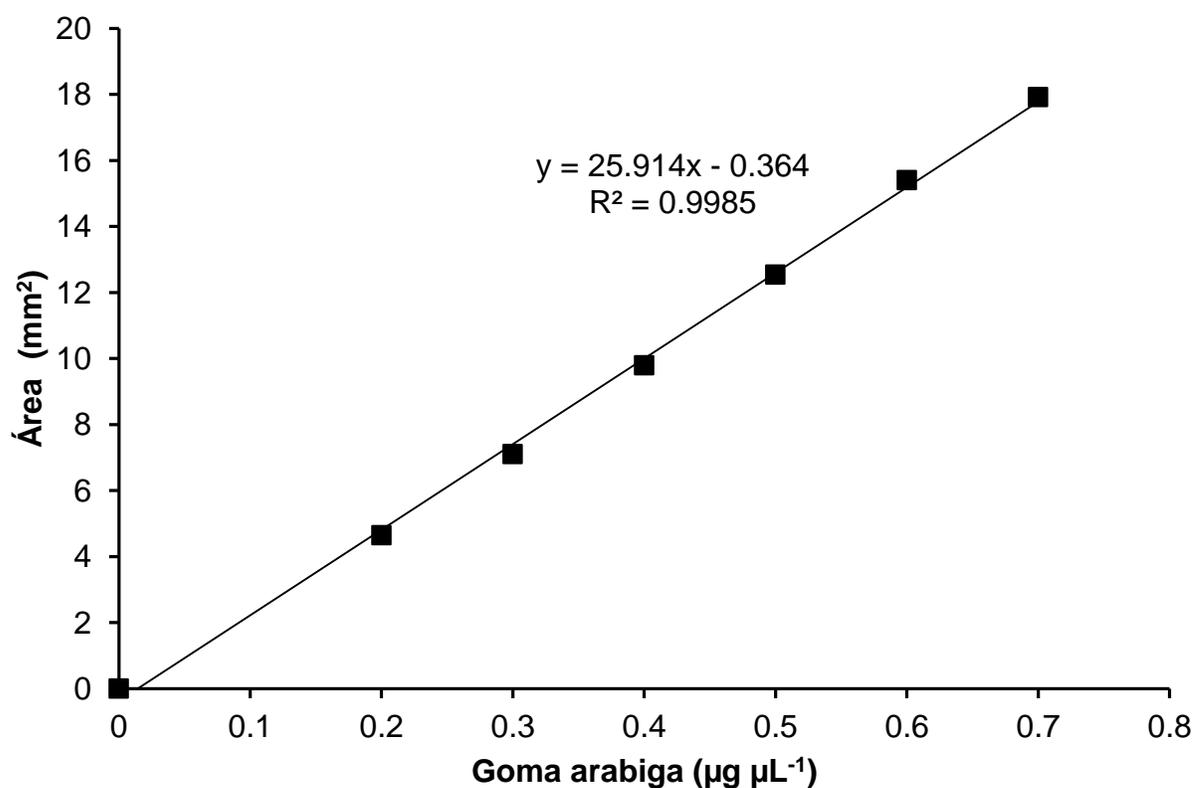


Figura 7. Curva tipo de goma arábiga para la cuantificación de AGPs con el reactivo de Yariv, siguiendo la metodología de van Holst y Clarke (1985).

## 6.10. Predicción del cultivo por lote alimentado de *B. vulgaris* en base al pH-*stat* a partir de parámetros cinéticos obtenidos del cultivo por lote

Para predecir el crecimiento celular y la acumulación de AGPs en el CLA, considerando la alimentación de sacarosa asociada al consumo de HCl (pH-*stat*), se tuvieron las siguientes consideraciones: a) los rendimientos puntuales biomasa-sustrato y producto-biomasa del CL, b) la relación que existe entre la sacarosa residual con el consumo de HCl del CL, y c) los datos obtenidos, se extrapolaron al CLA utilizando las siguientes formulas (considerando las variaciones del volumen, los cambios en la concentración de sustrato y de los productos (células y AGPs):

$$V_f = V_i + HCl_A + Me_A + NaOH_A \quad \text{Ec. 7}$$

$$S_{CL} = S_E * V_i \quad \text{Ec. 8}$$

$$S_A = Me_A(CMe_A) \quad \text{Ec.9}$$

$$S_{CLA} = \frac{S_{CL} + S_A}{V_F} \quad \text{Ec. 10}$$

$$\Delta X_{CLA} = (Y_{X/S})(S_{CLA} - S_E) \quad \text{Ec. 11}$$

$$X_{M_0} = \Delta X_{CLA} + X_E \quad \text{Ec. 12}$$

$$AGPs_{M_0} = (\Delta X_{CLA})(Y_{P/X}) + AGPs_E \quad \text{Ec. 13}$$

Donde:

- $V_f$ = Volumen final del cultivo por lote alimentado (L)
- $V_i$ = Volumen inicial del cultivo por lote alimentado (L)
- $HCl_A$ = Ácido clorhídrico adicionado (L)
- $Me_A$ = Medio alimentado (L)
- $NaOH_A$ = Hidróxido de sodio adicionado (L)
- $CMe_A$ = Concentración de sacarosa del medio alimentado ( $g L^{-1}$ )
- $S_E$ = Sacarosa residual experimental del cultivo por lote ( $g L^{-1}$ )
- $S_{CL}$ = Sacarosa del cultivo por lote (g)
- $S_A$ = Sacarosa alimentada (g)
- $S_{CLA}$ = Sacarosa del cultivo por lote alimentado ( $g L^{-1}$ )
- $\Delta X_{CLA}$ = Incremento de la biomasa en el cultivo por lote alimentado ( $g L^{-1}$ )
- $X_E$ = Biomasa experimental del cultivo por lote ( $g L^{-1}$ )
- $X_{M_0}$ = Biomasa total del modelo para la técnica pH-*stat* ( $g L^{-1}$ )

- $AGPs_{Mo}$  = Producción de AGPs del modelo para la técnica de *pH-stat* ( $mg L^{-1}$ )
- $AGPs_E$  = Producción experimental de AGPs del cultivo por lote ( $mg L^{-1}$ )

### 6.11. Determinación de las curvas de flujo del medio de cultivo a diferentes concentraciones de sacarosa

Para poder determinar las curvas de flujo del medio a diferentes concentraciones de sacarosa ( $50-400 g L^{-1}$ ), se utilizó un viscosímetro Haake Rotovisco (modelo RV20, Germany), con cabezal M5 (figura 8). El equipo registra un par de torsión máximo de 4.9 nN. En todos los experimentos, se tomaron las lecturas después de alcanzar la estabilidad del par de torsión en el cambio de la velocidad rotacional. Las mediciones se hicieron manteniendo una temperatura de 24 °C, controlada por medio de un baño de recirculación de agua (Haake K20, Germany) y una bomba de recirculación (Haake DC3, Germany). El viscosímetro, proporciona los valores de velocidad de deformación y esfuerzo cortante. Se utilizó el sensor GCC-NV (figura 9) que presenta una amplitud de gap de 0.35 mm. El intervalo de velocidades de deformación que permite obtener el sensor es de 27 a 2700  $s^{-1}$ . El volumen utilizado para las muestra fue de 9 mL.

Se procedió a determinar el porcentaje del esfuerzo cortante, utilizando las diferentes concentraciones de sacarosa. Se graficó la velocidad de deformación vs el esfuerzo de corte y se calculó la viscosidad ( $\eta$ ) de acuerdo a la ecuación 14. Todos los datos se procesaron en una hoja de cálculo Microsoft Office Excel 2003 (Windows XP), donde se obtuvieron todos los gráficos para cada muestra por triplicado.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{Ec. 14}$$



Figura 8. Viscosímetro Haake Rotovisco modelo RV20, cabezal M5.



Figura 9. Sensor convencional GCC-NV de amplitud de gap de 0.35 mm.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Cinética de crecimiento del cultivo de *B. vulgaris* por lote en biorreactor: producción de AGPs y consumo de la fuente de carbono

En la figura 10 A se muestra la cinética de crecimiento del cultivo de *B. vulgaris* operando el biorreactor en un régimen por lote. El cultivo inició con un tamaño de inóculo de  $5.2 \pm 0.28$  g PS L<sup>-1</sup> y se observó el crecimiento del cultivo desde el día 0 hasta el día 4, las células crecieron con un  $\mu$  de  $0.21$  d<sup>-1</sup> y con un tiempo de duplicación de 3.24 d. La producción máxima de biomasa fue de  $12.15 \pm 0.26$  g PS L<sup>-1</sup> al día 5, donde inició la fase estacionaria hasta el día 7. La producción de AGPs al día 7 alcanzó su máximo ( $67.42 \pm 0.80$  mg L<sup>-1</sup>). Este perfil de producción de AGPs es semejante al del crecimiento del cultivo, ello sugiere que la producción de las glicoproteínas está ligada al crecimiento celular. El rendimiento específico de AGPs ( $Y_{AGP/X}$ ) del cultivo de *B. vulgaris* fue de 4.92 mg de AGPs g<sup>-1</sup> de biomasa y la productividad ( $Q_{AGPS}$ ) fue de  $0.985$  mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

En cuanto al consumo de la fuente de carbono (figura10B), se observó que la sacarosa se consumió gradualmente desde el día 0 hasta el día 7, llegando a una concentración de sacarosa residual de  $6.10$  g L<sup>-1</sup>. En cuanto al rendimiento celular con respecto a la sacarosa ( $Y_{X/S}$ ) fue de  $0.336$  g de células g<sup>-1</sup> de sacarosa. Por otro lado, el rendimiento de las AGPs respecto a la sacarosa ( $Y_{AGPs/S}$ ) fue de  $1.65$  mg de AGPs g<sup>-1</sup> de sacarosa.

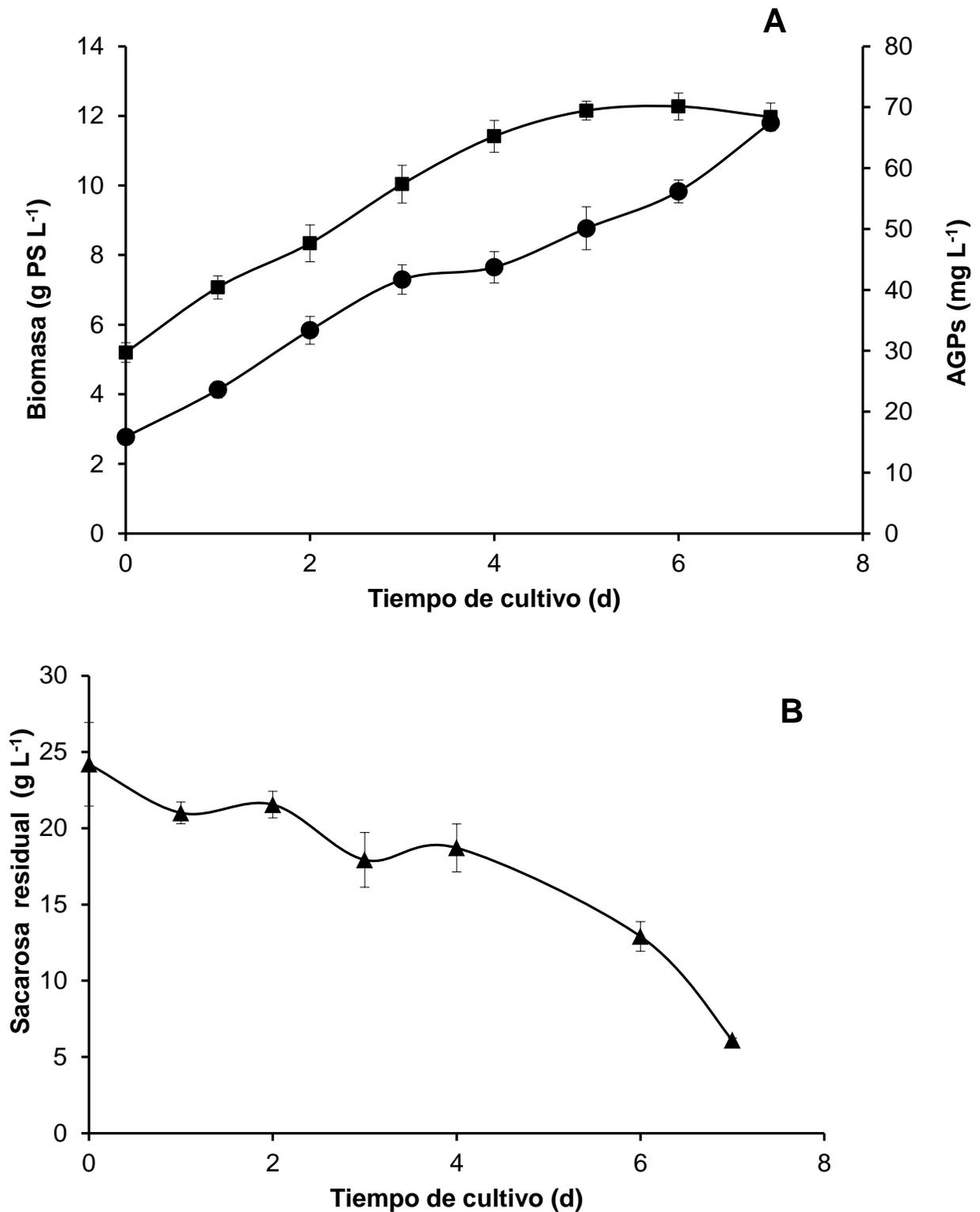


Figura 10. Cinética de crecimiento del cultivo de *B. vulgaris* y consumo de sustrato en biorreactor. A) Crecimiento (■) y producción de AGPs (●) y B) sacarosa residual (▲).

En la figura 11A, se muestra el perfil de evolución del pH durante el cultivo de *B. vulgaris* por lote. El punto de control de pH reportado en la literatura es de 5.5 (Henández-Sánchez, 2007). Con base en ello se fijó en el biocontrolador, los resultados indican un control satisfactorio, con pequeñas oscilaciones de 0.1 unidades de pH que se presentaron principalmente en los 4 primeros días de cultivo y coinciden con la fase de crecimiento. El perfil de consumo de HCl se presenta en la figura 11B, y se observa un aumento de forma lineal conforme transcurre el cultivo, alcanzando un valor máximo de consumo de  $72.13 \pm 2.33$  mL al final de la cinética.

## **7.2. Análisis de correlación entre el consumo de HCl con el crecimiento celular y el consumo de azúcares totales.**

Con el objeto de analizar la posible correlación entre el crecimiento celular y el consumo de HCl, se procedió a determinar los gradientes del crecimiento celular y de consumo de HCl. En la figura 12A se presentan los datos obtenidos, el análisis no arrojó una posible relación, el valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) fue de 0.0225. Por otra parte, en la figura 12B, se presenta el análisis del consumo de la sacarosa y el consumo de HCl, observando una tendencia de disminución lineal, con un valor de  $R^2$  de 0.892. Los resultados anteriores, permitieron utilizar la posible correlación entre el consumo de la sacarosa y el consumo de HCl para modelar el CLA.

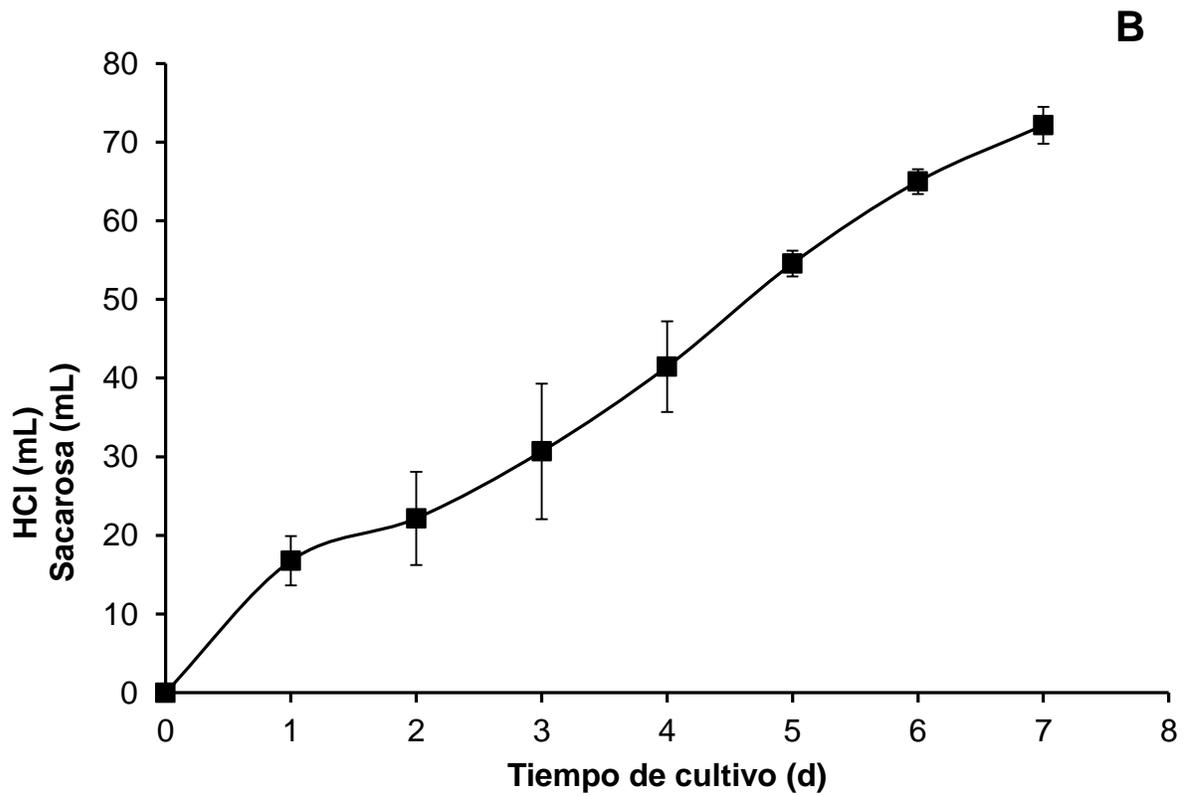
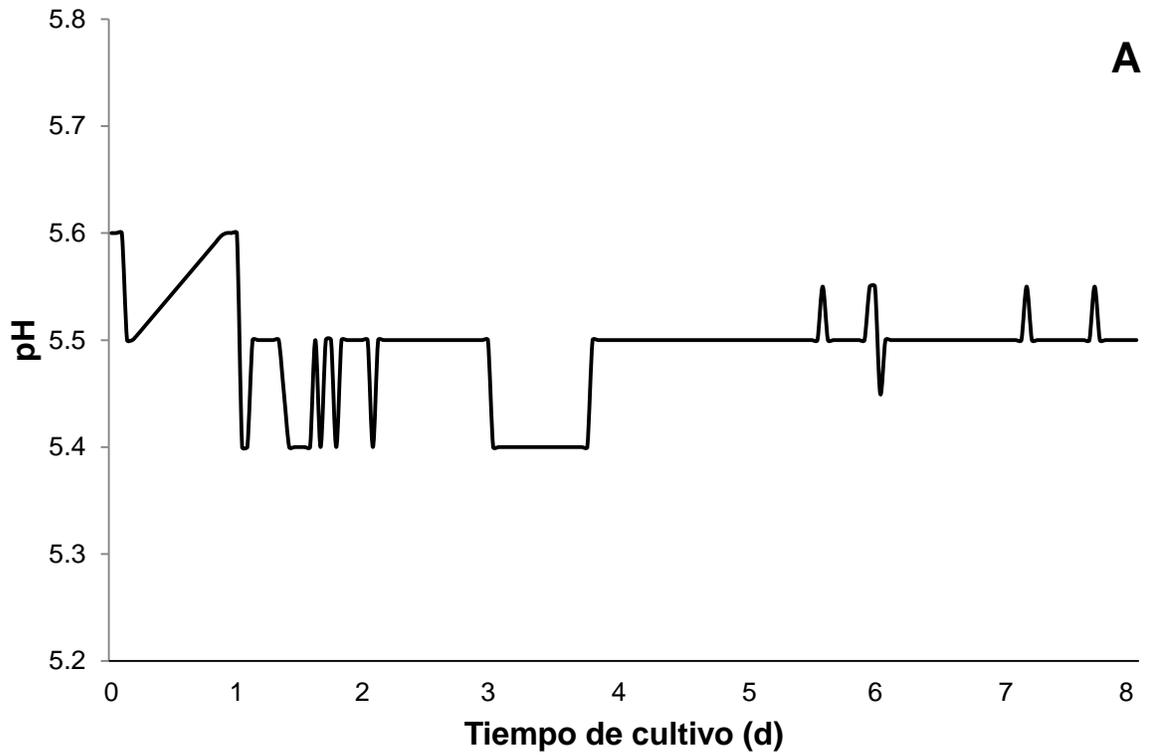


Figura 11. A) Control de pH y B) el perfil de consumo de HCl en el cultivo por lote de *B. vulgaris*.

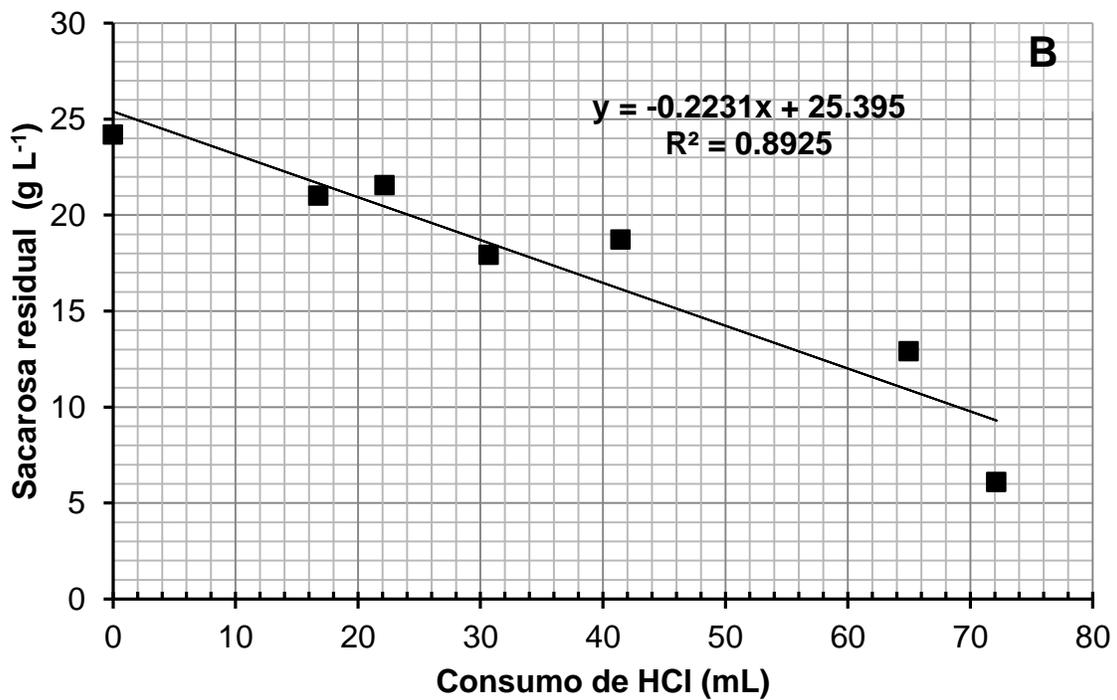
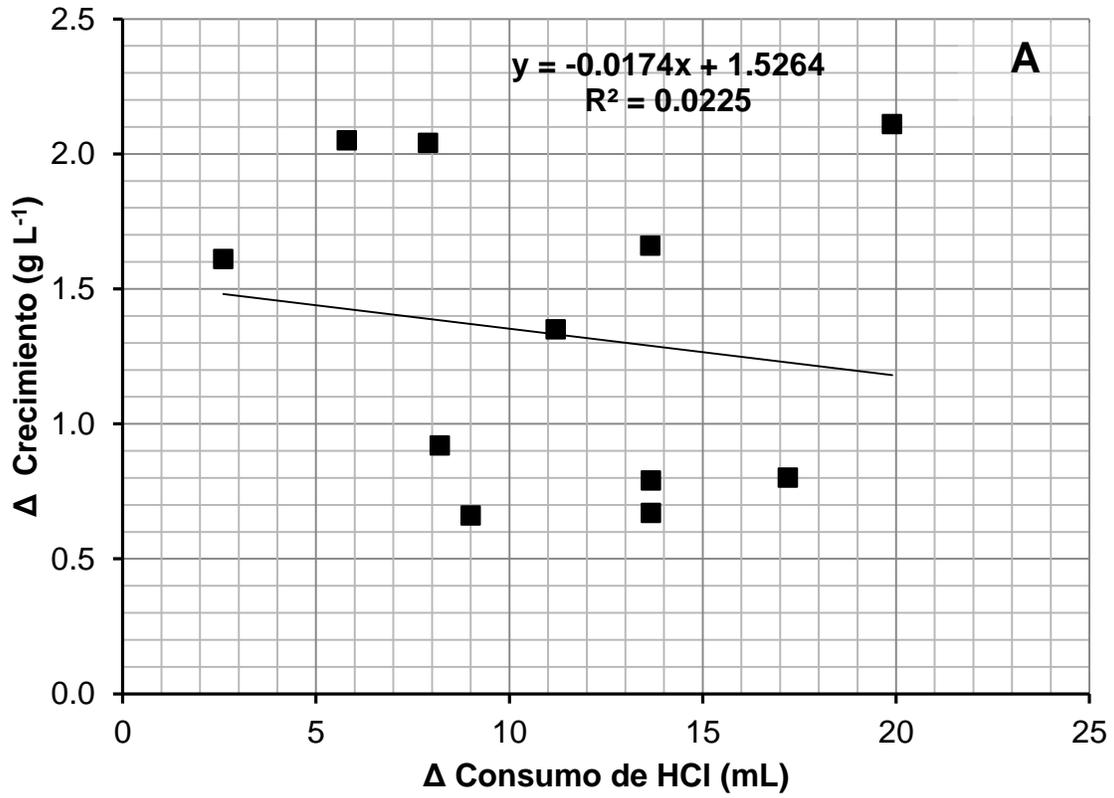


Figura 12. A) Correlación entre al consumo de HCl y el crecimiento celular y B) relación entre el consumo de HCl y la sacarosa residual.

### **7.3. Predicción del crecimiento celular y producción de AGPs en los cultivos de *B. vulgaris* generados por el modelaje del cultivo por lote alimentado.**

En la figura 13, se muestran las cinéticas de crecimiento y producción de AGPs con diferentes concentraciones de sacarosa (50, 100, 200, 300, 400 y 500 g L<sup>-1</sup>). La sacarosa a 50 g de sacarosa L<sup>-1</sup> en la corriente de alimentación, no tiene un efecto sobre el crecimiento celular, ya que se obtienen con el modelo 12.6 g PS L<sup>-1</sup>, valor similar al obtenido en el cultivo por lote (12.15 ± 0.2g PS L<sup>-1</sup>). Sin embargo, concentraciones de sacarosa por encima de los 50 g L<sup>-1</sup>, predicen un incremento de la biomasa, alcanzando con 300 g L<sup>-1</sup>, una producción de células de 19.96 g PS L<sup>-1</sup> al día 3, con una  $\mu$  de 0.63 d<sup>-1</sup>.

En cuanto a la producción de AGPs (figura 13B), se observa que al aumentar la concentración de sacarosa, las AGPs se ven favorecidas. Para una concentración de 300 g de sacarosa L<sup>-1</sup> en la corriente de alimentación, el modelo predice una producción máxima de 112.21 mg L<sup>-1</sup> que es 1.66 veces más que el cultivo por lote. Pero con una concentración de 500 g de sacarosa L<sup>-1</sup> en la corriente de alimentación, se obtendrían 172.86 g de AGPs L<sup>-1</sup>.

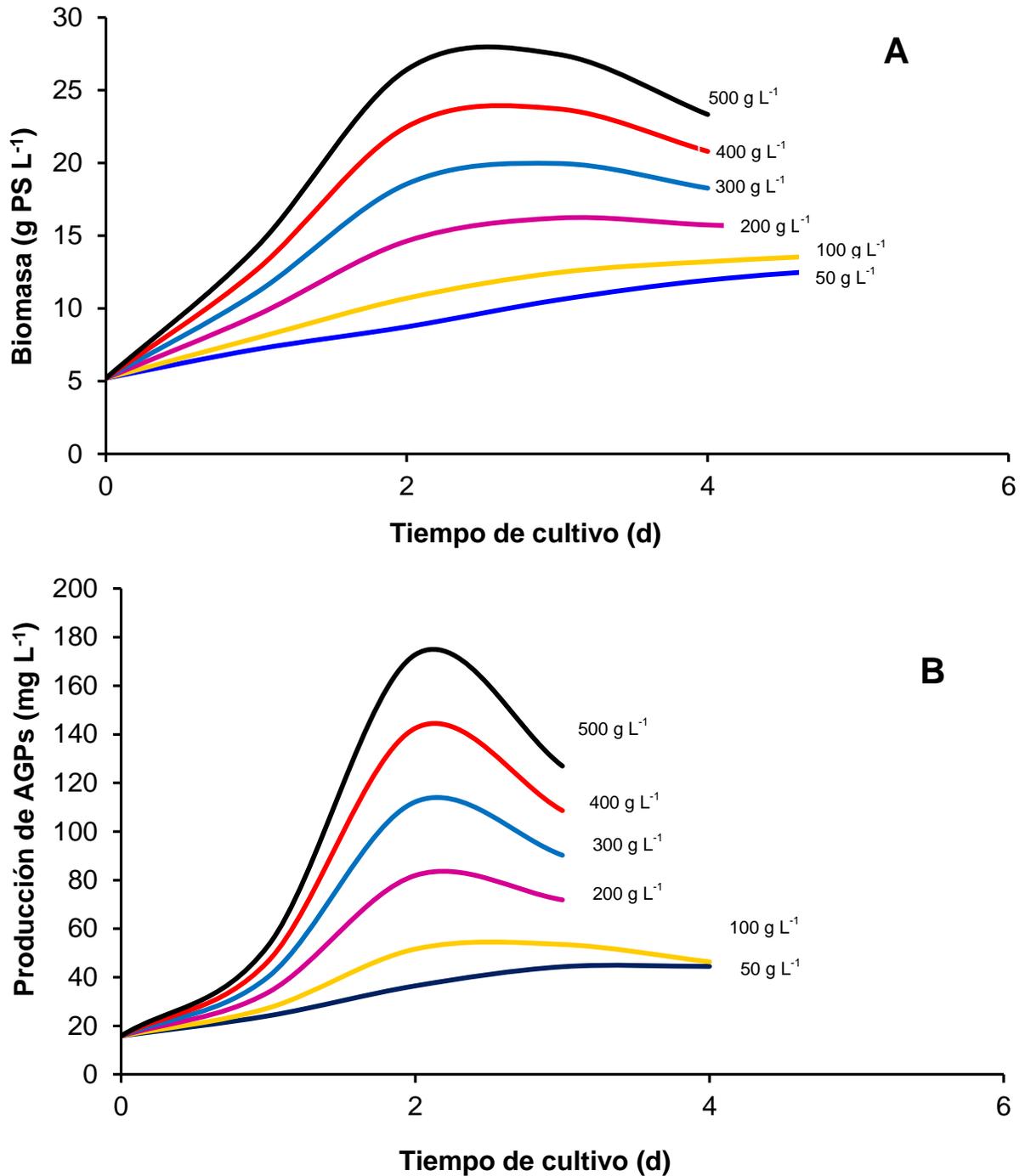


Figura 13. Cinéticas de crecimiento y producción de AGPs obtenidas del modelaje del cultivo por lote alimentado. A) Crecimiento celular (50 —, 100—, 200 —, 300—, 400 —, y 500 —g PS L<sup>-1</sup>) y B) producción de AGPs (50 —, 100—, 200 —, 300 —, 400 —, y 500 — g de sacarosa L<sup>-1</sup>).

En relación al análisis de la sacarosa residual predicha por el modelo (figura 14), se observa que al utilizar una concentración de 50 g de sacarosa L<sup>-1</sup>, no existe una acumulación de sacarosa, similar a la sacarosa del cultivo por lote. Sin embargo, al ir aumentando la concentración de sacarosa en la corriente de alimentación, y de acuerdo a los rendimientos obtenidos en el cultivo por lote, las células no consumirán la sacarosa alimentada, y se observa una acumulación del sustrato en el medio. En concentraciones de 300, 400 y 500 g de sacarosa L<sup>-1</sup>, la acumulación sobrepasa a la sacarosa inicial del cultivo (24.20 g L<sup>-1</sup>) y con concentraciones de 400 y 500 g L<sup>-1</sup>, existe una acumulación por encima de 30 g de sacarosa L<sup>-1</sup>, lo cual podría inhibir el crecimiento celular, además de la producción de AGPs. Tomando en cuenta los datos anteriores, se procedió a elegir la concentración de sacarosa de 300 g L<sup>-1</sup> en la corriente de alimentación para hacer los ensayos de CLA experimentalmente.

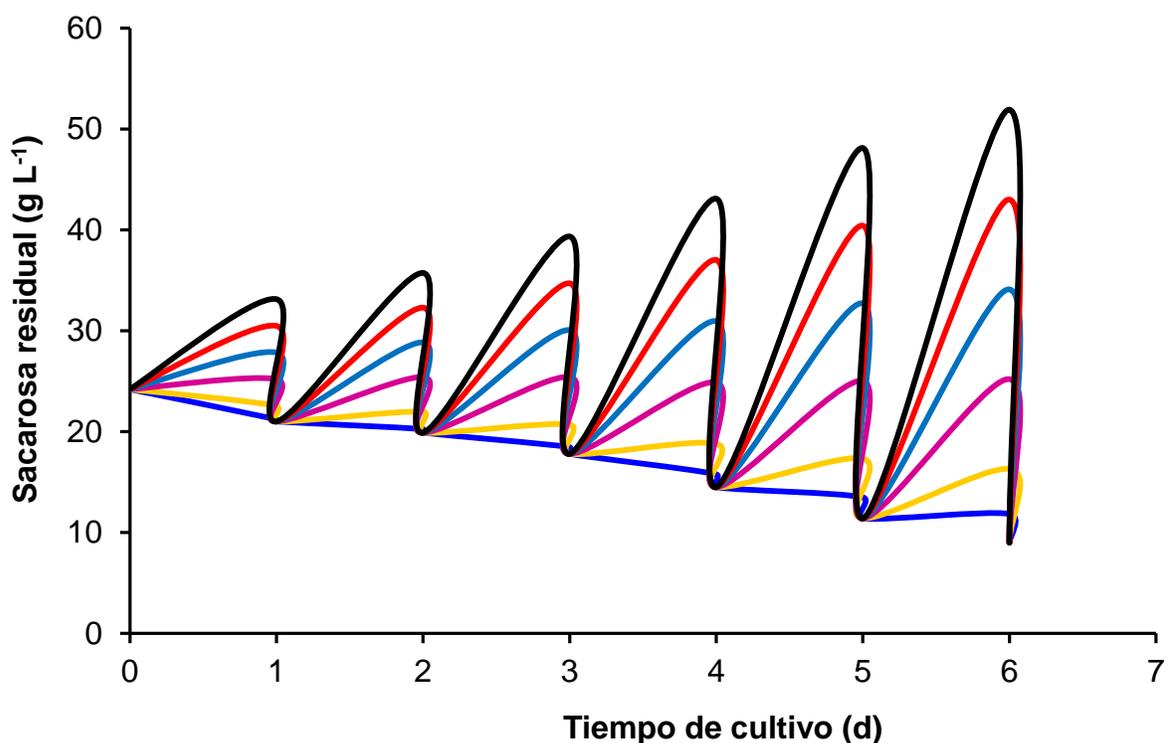


Figura 14. Sacarosa residual del cultivo por lote alimentado en base al modelo (50 —, 100 —, 200 —, 300 —, 400 —, y 500 — g de sacarosa L<sup>-1</sup>).

#### **7.4. Comportamiento al flujo del medio de cultivo a diferentes concentraciones de sacarosa**

Al tener la concentración de sacarosa ( $300 \text{ g L}^{-1}$ ) en la corriente de alimentación para el CLA, una de las preguntas que surgieron fue, ¿si la concentración de  $300 \text{ g de sacarosa L}^{-1}$  no generaría problemas de viscosidad? Para poder responder a esta pregunta, se realizaron las mediciones del comportamiento al flujo del medio de cultivo a las diferentes concentraciones de sacarosa. En la figura 15, se presentan las curvas del comportamiento al flujo. Para todas las concentraciones se observa un comportamiento de tipo Newtoniano el valor de la viscosidad ( $\mu$ ) del medio (cuadro 2) pasa de  $0.001 \text{ Pa s}^{-1}$  para  $50 \text{ g de sacarosa L}^{-1}$  a  $0.0017 \text{ Pa s}^{-1}$  para  $300 \text{ g de sacarosa L}^{-1}$ . El comportamiento fue Newtoniano y la viscosidad fue cercana a la del agua, por lo cual con esto se comprueba que si utilizamos la concentración de  $300 \text{ g de sacarosa L}^{-1}$  en la corriente de alimentación en el CLA, el sistema no tendría algún problema de operación con esta concentración.

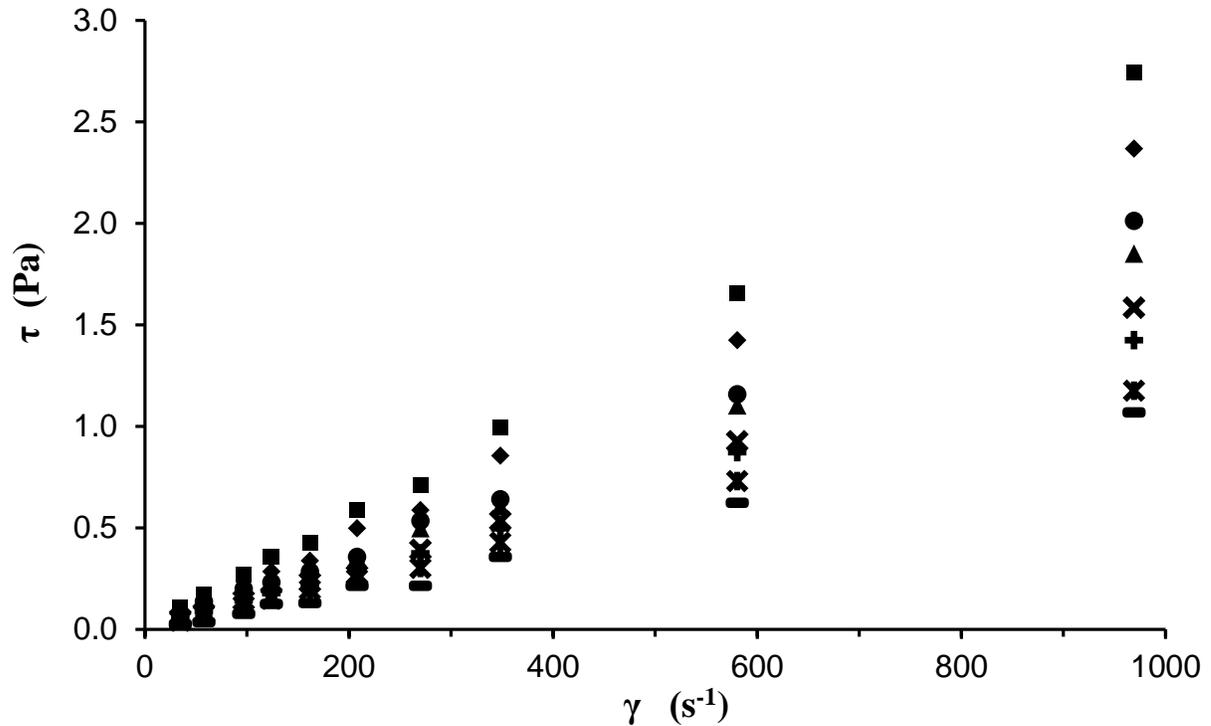


Figura 15. Curvas del comportamiento al flujo del medio a diferentes concentraciones de sacarosa (50  $\square$ , 100  $\times$ , 150  $+$ , 200  $\times$ , 250  $\blacktriangle$ , 300  $\bullet$ , 350  $\blacklozenge$  y 400  $\blacksquare$  g L<sup>-1</sup>).

Cuadro 2. Viscosidad del medio a diferentes concentraciones de sacarosa

Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )	Viscosidad (Pa s <sup>-1</sup> )
50	0.001
100	0.0012
150	0.0014
200	0.0013
250	0.0017
300	0.0017
350	0.0024
400	0.0029

### 7.5. Cinética de crecimiento, producción de AGPs y sacarosa residual del cultivo por lote alimentado de *B. vulgaris* en biorreactor.

Se estableció el CLA con una concentración de 300 g de sacarosa L<sup>-1</sup> en la corriente de alimentación, mediante la técnica de alimentación de pH-*stat*. En la figura 16A, muestra que la cinética de crecimiento y la producción de AGPs en el CLA. El CLA se inició con una biomasa de 5.57 ± 0.2 g PS L<sup>-1</sup>, las células crecieron con una velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) de 0.55 d<sup>-1</sup> y una td de 1.2 d alcanzando una producción celular máxima de 20.65 ± 1.18 g PS L<sup>-1</sup> al día 4. En cuanto a las AGPs, se observa al día 0 un contenido de 23.06 ± 0.9 mg L<sup>-1</sup>, que se incrementó hasta 143.84 ± 5.4 mg L<sup>-1</sup>. El rendimiento específico de AGPs ( $Y_{AGPs/X}$ ) fue de 8.01 mg de AGPs por g<sup>-1</sup> de biomasa y una productividad ( $Q_{AGPs}$ ) de 2.0 mg de AGPs L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. De acuerdo al perfil de la producción de AGPs, se observa que, aunque la biomasa llega a su fase estacionaria, la producción de AGPs parece continuar.

En la figura 16B se muestra que la sacarosa residual al inicio es de 21.63 ± 1.7 g de sacarosa L<sup>-1</sup>, pero durante la cinética existe una acumulación de sacarosa que alcanza valores de 29.90 ± 2.5 g L<sup>-1</sup>. Al término del CLA, el balance de consumo de sacarosa fue de 16.19 g L<sup>-1</sup>, con un incremento de biomasa de 15.07 g L<sup>-1</sup>. Esto genera un rendimiento de biomasa con respecto al sustrato de 0.89 g de biomasa por g<sup>-1</sup> de sacarosa.

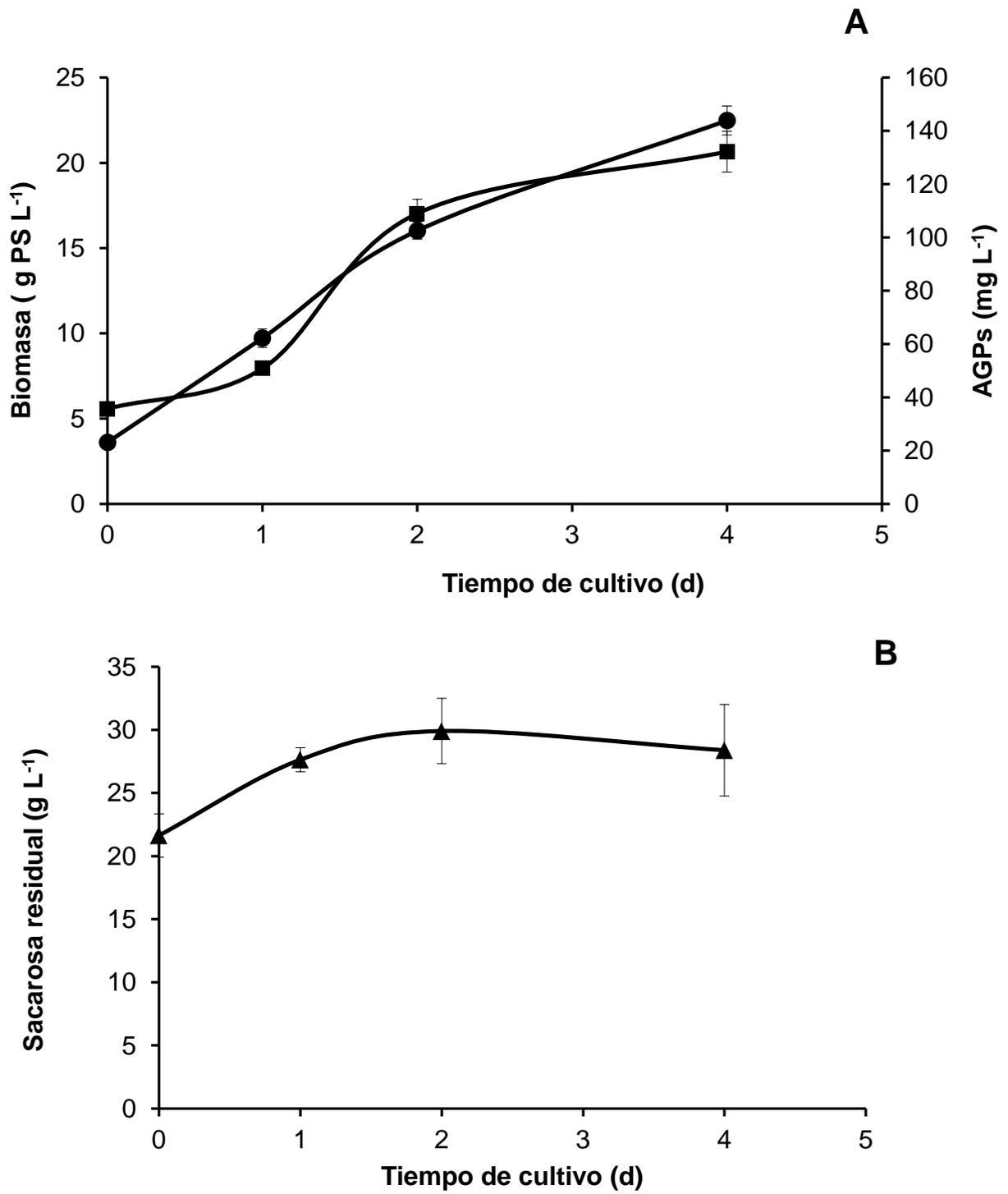


Figura 16. Cinética de crecimiento del CLA de *B. vulgaris* y consumo de sustrato en biorreactor. A) Crecimiento (■) y producción de AGPs (●) y B) sacarosa residual (▲).

En la figura 17A, se muestra que el control de pH se llevó a  $5.5 \pm 0.1$  durante toda la cinética. En cuanto al consumo de HCl y de sacarosa alimentada (*pH-stat*) se observa en la figura 17B, que al día 2 el cultivo consumió  $46.9 \pm 4.40$  mL. Dicho valor corresponde al periodo de crecimiento celular donde el incremento en la biomasa fue de  $11.55$  g PS L<sup>-1</sup>; para el período del día 2 al día 4, el consumo de HCL fue de tan solo  $1.83$  mL, que corresponde a la fase estacionaria del cultivo.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, una de las interrogantes era saber ¿si la producción de las AGPs continuaría en aumento al dejar más tiempo la cinética de los cultivos? (figura 16), ya que además la concentración de sacarosa residual permanecía alta al cuarto día ( $28$  g L<sup>-1</sup>), momento en que se dio por terminada la cinética. Por lo que se llevaron los ensayos del CLA dejando la cinética hasta el día 9.

En la figura 18 se observa que la biomasa disminuye hasta una concentración de  $11.52 \pm 0.79$  g PS L<sup>-1</sup> al día 9, lo que sugiere que después del día 4 existe una lisis celular. Por otra parte, la producción de AGPs se incrementó desde  $197.46$  mg L<sup>-1</sup> (del día 4) hasta llegar a  $491.46 \pm 19.9$  mg L<sup>-1</sup> (en el día 6), pero posteriormente desciende a  $321.24 \pm 21.25$  mg L<sup>-1</sup> al día 9. Los resultados indican que existe un aumento considerable en la producción de AGPs al día 6.

Bajo estas condiciones, el rendimiento de AGPs por biomasa ( $Y_{AGPs/X}$ ) fue de  $22.71$  mg de AGPs g<sup>-1</sup> de biomasa y productividad ( $Q_{AGPs}$ ) de  $3.78$  mg de AGPs L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

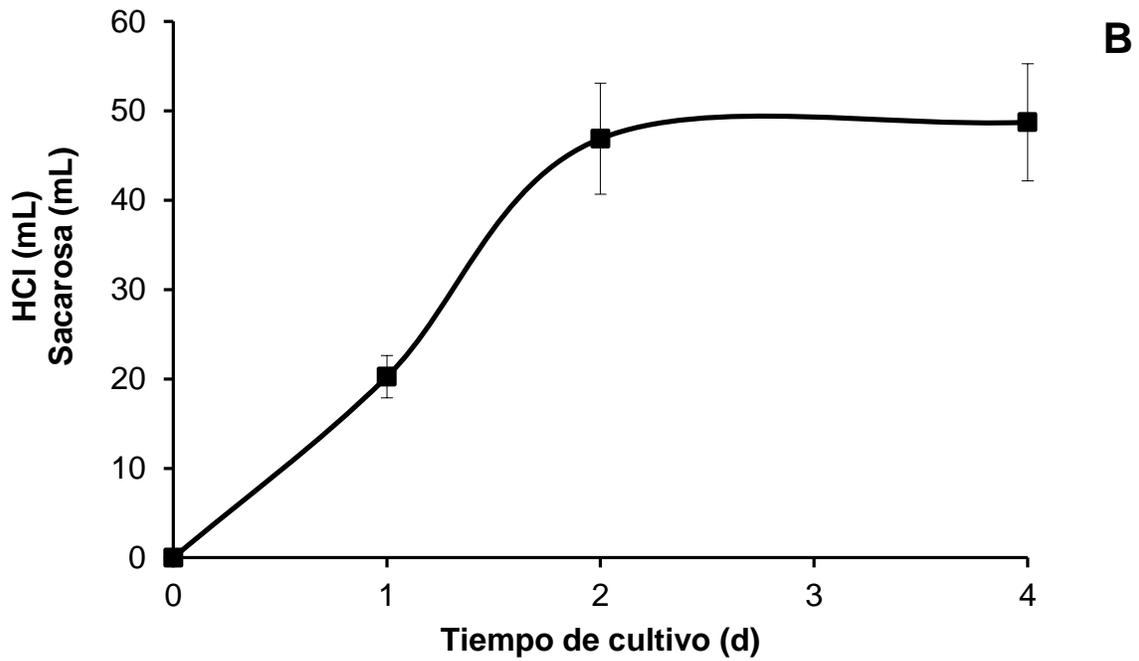
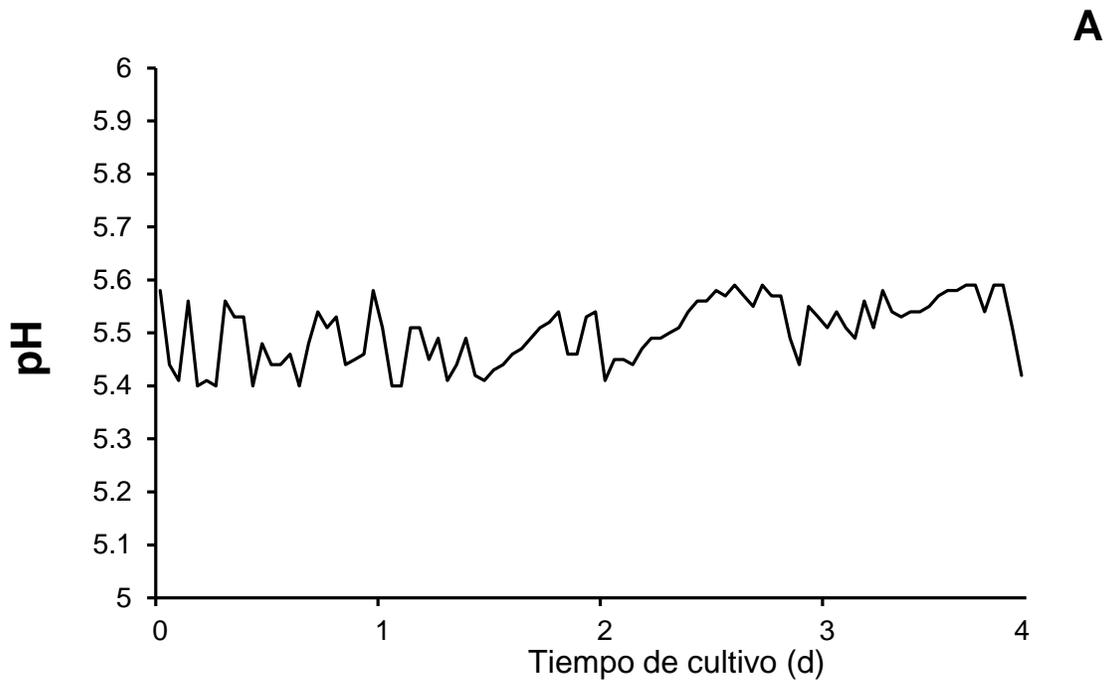


Figura 17. Control de pH (A) y perfil de consumo de HCl en el CLA de *B. vulgaris* (B).

La figura 19A muestra que el control de pH se logró satisfactoriamente en  $5.5 \pm 0.2$ . En cuanto al consumo de HCl y a la cantidad de sacarosa alimentada (Figura 19B) se observa que entre los días 4 y 6, hubo un aumento considerable de que va desde los 43.8 mL a  $162.25 \pm 31.2$  mL; esto corresponde a una cantidad de sacarosa alimentada de 48.67 g. Como se observa en la figura 18, existe una acumulación de sacarosa en el medio que pasa de 28 a  $56 \text{ g L}^{-1}$ . Los resultados anteriores muestran que después del día 4 de operación del CLA de *B. vulgaris*, las células detienen su crecimiento y se presenta una posible lisis celular, bajo esta condición el cultivo demanda de HCL para mantener el control de pH, generando la alimentación de sacarosa que se acumula en el caldo. En lo que respecta a las AGPs, se observa un aumento de 2.5 que pudiera deberse al fenómeno de lisis celular y al posible efecto osmótico de acumulación de sacarosa que favorecería la liberación de las AGPs al medio.

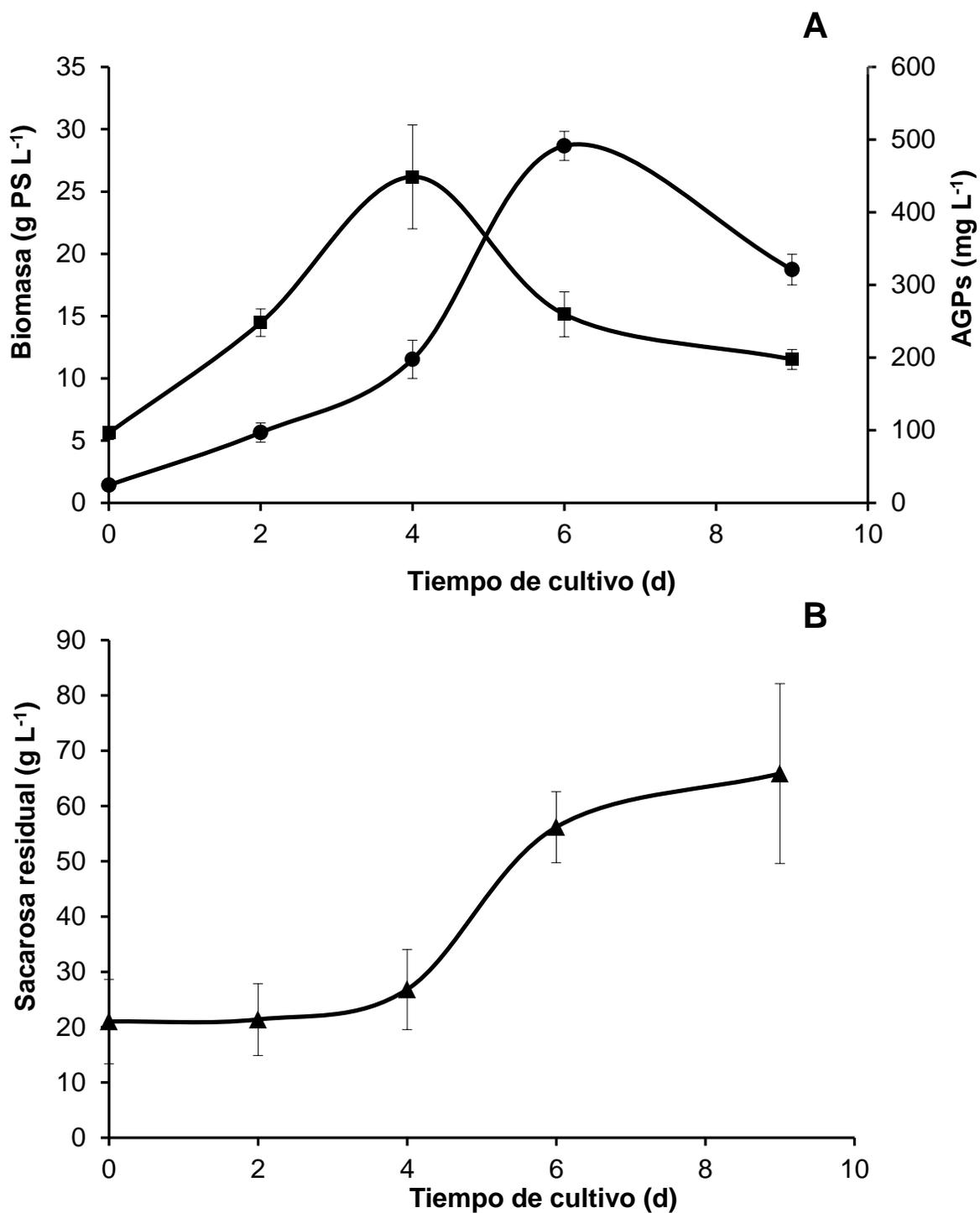


Figura 18. Cinética de crecimiento del CLA de *B. vulgaris* y consumo de sustrato en biorreactor. A) Crecimiento (■) y producción de AGPs (●) y B) sacarosa residual (▲).

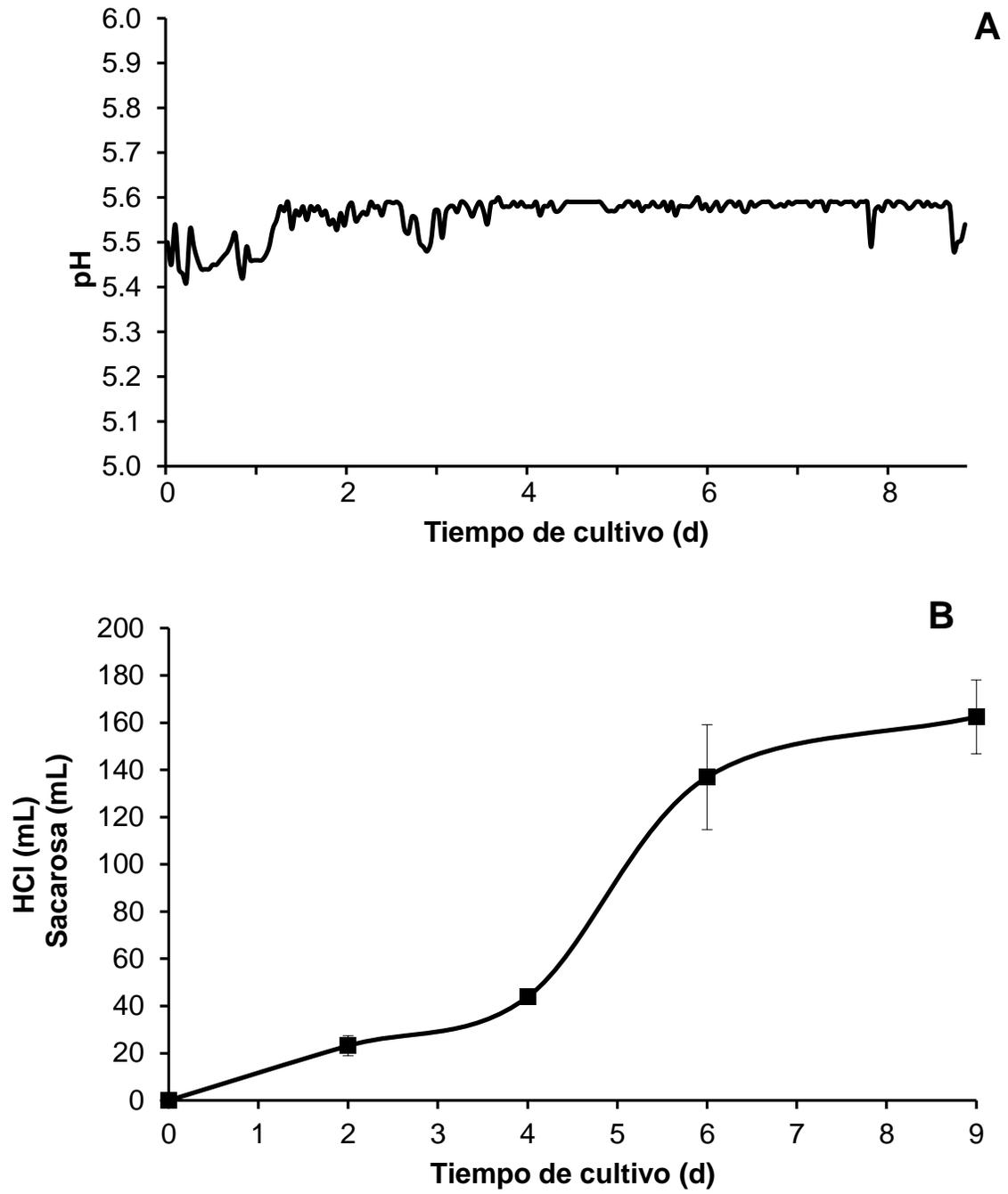


Figura 19. A) Control de pH y B) el perfil de consumo de HCl en el CLA de *B. vulgaris*.

## 7.6. Parámetros cinéticos del cultivo por lote, del modelo y del lote alimentado.

El cuadro 3, compara los resultados del trabajo. Los parámetros obtenidos en el CLA<sub>A</sub> al día 4 son cercanos a los obtenidos con el modelo del CLA en cuanto a la producción de biomasa (19.9 vs 20.65 g L<sup>-1</sup>), velocidad de crecimiento (0.63 vs 0.55 d<sup>-1</sup>) y productividad volumétrica de AGPs al día 4 (2.17 vs 2.0 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>); no así para la producción específica de AGPs y rendimiento celular por sacarosa consumida, en donde los resultados experimentales son superiores a los del modelo. La producción específica (mg de AGPs g<sup>-1</sup> biomasa) es superior 0.28 veces y en el rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ) fue 1.69 veces mayor.

El modelo propuesto está basado en las ecuaciones de Monod y el control por medio del *pH-stat*. El modelo predijo un consumo de 72.13 ml de HCl al día 8 de la cinética, que al mismo tiempo estaría asociado a la adición de la sacarosa. Sin embargo, experimentalmente el cultivo solo consumió 46.7 mL en el día 4. Debe recordarse que uno de los supuestos del modelo fue asociar el consumo de HCl a la cantidad de sacarosa residual y que el valor del coeficiente de correlación entre dichas variables fue de 0.89. Lo cual podría explicar parcialmente parte de las diferencias observadas entre el modelo y el CLA<sub>A</sub>.

Por otro lado, resulta interesante el CLA<sub>B</sub> en el cual se dejó que el cultivo continuara al día 9, en donde la biomasa alcanzada al día 4 ya no presentó crecimiento, pero la acumulación de AGPs aumentó considerablemente a un valor de 491.46 ± 19.95 mg de AGPs L<sup>-1</sup> al día 6, que corresponden a una producción específica de 22.71 mg AGPs g<sup>-1</sup> PS y representan incrementos considerables a los obtenidos en el CL (6.32 y 1.83 veces de incremento, respectivamente). Para el CLA<sub>B</sub> el sistema presentó un consumo de ácido y sacarosa de 162 mL al día 9, lo cual ocasionó una acumulación de la sacarosa residual y probablemente generó una condición de estrés osmótico sobre las células.

Cuadro 3. Parámetros cinéticos y valores máximos del cultivo por lote (CL), del modelo y del cultivo por lote alimentado con tiempo de cultivo de 4 días (CL<sub>A</sub>) y el cultivo por lote alimentado con 9 días de cultivo (CL<sub>B</sub>): velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación (td), rendimiento biomasa sustrato ( $Y_{x/s}$ ), rendimiento AGPs biomasa ( $Y_{AGPs/x}$ ), productividad de AGPs ( $Q_{AGPs}$ ).

Parámetro	CL	Modelo	CL <sub>A</sub>	CL <sub>B</sub>
Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	12.15±0.2 (7 d)	19.96	20.65±1.1 (4 d)	26.18±4.1 (6 d)
$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	0.21	0.63	0.55	0.38
td (d)	3.24	1.1	1.2	1.8
Producción de AGPs (mg L <sup>-1</sup> )	67.42±0.8 (8 d)	112.21	143.84±5.4 (4 d)	491.46±19.9 (6 d)
$Y_{x/s}$ (g g <sup>-1</sup> )	0.33	0.33	0.89	1.44
$Y_{AGPs/x}$ (mg g <sup>-1</sup> )	4.92	6.25	8.01	22.71
$Q_{AGPs}$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0.985	2.17	2.0	3.78
Consumo de HCl (mL)	72.13±2.3 (8 d)	72.1	46.9±4.4 (4 d)	162.45±31.2 (9 d)

Para los valores de la muestra se calculó el error estándar teniendo con un número de muestras para cada cultivo: CL n=2, CL<sub>A</sub> n=3 y CL<sub>B</sub> n=2.

## 8. Discusión

En el presente trabajo, se estableció un cultivo por lote alimentado de *Beta vulgaris* L. mediante la técnica de alimentación con sacarosa en base al pH-*stat* para la producción de arabinogalactano-proteínas.

El cultivo de células en suspensión de *Beta vulgaris* secreta AGPs al medio de cultivo (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999). Por la importancia biológica que tienen las AGPs, los estudios se encaminaron a implementar estrategias para optimizar su producción usando cultivos de *B. vulgaris*. Una de las estrategias que se estudia con éste propósito es el desarrollo del cultivo por lote en matraz y en biorreactor (Hernández-Sánchez, 2007). En éste trabajo, en el cultivo por lote de células *B. vulgaris* en birreactor se obtuvo una biomasa máxima de 12.15 g L<sup>-1</sup>. Estos resultados son mayores a los reportados por Santiago-Martínez (2009) y Rodríguez-Monroy y Galindo (1999), quienes reportan una biomasa de 10.53 y 10.1 g PS L<sup>-1</sup> respectivamente. Sin embargo, los valores de biomasa máxima también son menores a lo evaluado por Hernández- Sánchez (2007) quien reportó una biomasa de 17.2 g PS L<sup>-1</sup>.

Por otra parte, el cultivo por lote creció con una  $\mu$  de 0.238 d<sup>-1</sup> y con un td de 3.24 días. Estos valores de velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación son diferentes a los reportados anteriormente. Para el caso de Santiago-Martínez (2009), el cultivo de *B. vulgaris* en el biorreactor creció a una  $\mu$  de 0.077 d<sup>-1</sup> y un td de 0.081 y en el caso de Hernández-Sánchez (2009) se reporta una  $\mu$  de 0.12 d<sup>-1</sup> con un td de 5.8 días. Rodríguez-Monroy y Galindo (1999) reporta que los cultivos presentaron una  $\mu$  de 0.02 d<sup>-1</sup>. Estos autores sugieren que las diferencias del crecimiento de los cultivos de células de *B. vulgaris* son debidas a la edad de la línea celular y la posible adaptación de las células a las condiciones de cultivo como consecuencia de su resiembra periódica.

El cultivo por lote de *B. vulgaris* en birreactor mostró una producción de AGPs de 67.42 mg L<sup>-1</sup>. Este contenido es menor a lo reportado por Santiago-Martínez (2009) quien reportó una acumulación de 73 mg L<sup>-1</sup>. Sin embargo, fue mayor comparado

con lo obtenido por Hernández-Sánchez (2007). No obstante a éstas diferencias, el perfil de acumulación de la AGP en todos los casos presenta una tendencia similar al perfil del crecimiento celular, especialmente en la fase exponencial de la cinética de crecimiento. Estos perfiles de crecimiento celular ligados a la producción de AGPs también son encontrados en cultivos por lote a nivel de matraz (Capataz-Tafur *et al.* 2010).

Este comportamiento de acumulación de AGPs también es reportado por Darjania *et al.* (2002) quienes señalan que la acumulación de las AGPs secretadas por cultivos de *A. thaliana* aumenta conforme el cultivo crece. De igual manera, en cultivos de *Rosa sp.* la acumulación de las AGPs se presenta durante el crecimiento de los cultivos (Komalavilas *et al.*, 1991). Trejo-Espino *et al.* (2010) también encuentran que existe una relación entre el crecimiento de las células de *P. laevigata* crecidas en biorreactor y la producción de AGPs. Cabe señalar que el hecho de que la producción de AGPs esté ligada al crecimiento celular es una característica importante que se consideró en éste trabajo para proponer el desarrollo de cultivos por lote alimentado; ya que la promoción del crecimiento de los cultivos a través de la alimentación de nutrientes sería una estrategia de aumentar la producción de las AGPs. Al respecto, Capataz-Tafúr *et al.* (2010) muestran que los cambios en la concentración inicial de la fuente de carbono (sacarosa) es un factor que cambia los perfiles de crecimiento y de la producción de AGPs. Estos antecedentes llevaron en éste trabajo a evaluar el cultivo por lote alimentado por sacarosa.

Por otra parte, Hernández-Sánchez (2007) reportó que para el crecimiento óptimo de las células de *B. vulgaris* en biorreactor, es necesario que el pH se controle a 5.5 con la adición de HCl. El trabajo reportado por Santiago-Martínez (2009), en un biorreactor con la Turbina Rhouston muestra que al inicio del crecimiento de los cultivos hay un aumento del pH hasta llegar a 5.5. Sin embargo, en comparación en el presente trabajo se observó que durante la fase exponencial de crecimiento, existen diversas fluctuaciones de pH lo que indica que el cultivo secreta sustancias que pudieran estar basificando el medio de cultivo durante su crecimiento; pero

cuando el crecimiento se detiene, el cultivo sigue variando su pH y demanda control, lo que se sugiere que es un efecto de la lisis celular.

Capataz-Tafur *et al.* (2010) en cultivos en matraces, reporta que las células en suspensión de *B. vulgaris*, consumen la sacarosa en su totalidad. Sin embargo, el presente trabajo del cultivo por lote en biorreactor muestra que las células no consumen la sacarosa en su totalidad, ya que en el último día de la cinética, queda un remanente de 6 g de sacarosa L<sup>-1</sup>. Lo anterior, indica que el consumo y el crecimiento de las células son afectados por el sistema en el que son cultivadas las células. En comparación con otras especies, Trejo-Espino *et al.* (2010) reporta para *Prosopis laevigata* que el comportamiento de la sacarosa residual disminuye conforme el cultivo crece y se consume el total de la sacarosa que existía en el medio.

El CLA se estableció en base a los rendimientos puntuales del cultivo por lote, esto por medio de un modelo que permitió obtener la concentración de sacarosa en la corriente de alimentación basándose en el pH-*stat*. Los resultados obtenidos en la producción de biomasa, de CLA de *B. vulgaris* con una concentración de 300 g de sacarosa L<sup>-1</sup> en la corriente de alimentación, fue de 20.65 g PS L<sup>-1</sup> con un  $\mu$  de 0.55 d<sup>-1</sup> y un td de 1.2 días. Estos resultados en cuanto a biomasa son similares a los predichos por el modelo (19.96 g PS L<sup>-1</sup>), al día 3 con un  $\mu$  de 0.63 d<sup>-1</sup> con un tiempo de duplicación de 1.1 d. Esto indica que el modelo estuvo acorde a las consideraciones tomadas para el desarrollo del mismo, como lo son los rendimientos puntuales y la relación entre el consumo de HCl con la sacarosa residual ( $R^2 = 0.8925$ ). Sin embargo, con respecto al CL el aumento en la producción de biomasa fue de 1.6 veces. En cuanto a la producción de AGPs fue de 143.84 mg L<sup>-1</sup> que difiere con el modelo que predijo 112.21 mg L<sup>-1</sup> y con el cultivo por lote el incremento de AGPs fue de 2.12 veces.

En este trabajo se muestra que la máxima acumulación de sacarosa residual es de 29.9 g de sacarosa L<sup>-1</sup>, que quizás generaría un estrés osmótico (Capataz-Tafur *et al.*, 2010). Sin embargo, esta sacarosa residual no afectó la producción de AGPs. No solo para los cultivos de *B. vulgaris* en suspensión, la fuente de carbono, es el

nutriente que limita el crecimiento y la proliferación celular. Otros sistemas donde han usado el CLA, se incrementa la biomasa y la producción de metabolitos de interés, además que en algunos casos se utilizan modelos para predecir el CLA. Los modelos se utilizan para determinar la velocidad de alimentación del nutriente, es decir utilizar una velocidad de alimentación lineal. Sin embargo, en este trabajo solo se determinó la concentración de sacarosa en la corriente de alimentación para ser controlada por medio del pH-*stat*. En éste caso, el modelo muestra un acercamiento en cuanto a la producción de biomasa. Al respecto, en otros trabajos se indica que es difícil que un modelo prediga el crecimiento de las células (Wesgate *et al.*, 1990). Aunque en cultivos de células de *A. indica*, los autores reportan similitudes entre lo que predice el modelo con lo obtenido experimentalmente (Prakash y Srivastava, 2006).

La producción de AGPs está ligada al crecimiento celular. Sin embargo, en éste trabajo se presenta que al término del crecimiento celular, la producción de AGPs continuo como es reportado en los trabajos de Hernández-Sánchez (2007) y Santiago-Martínez (2009). Así como, para otras especies como lo es *Prosopis laevigata* (Trejo-Espino *et al.*, 2010). Por lo cual, el CLA se prolongó a 9 días los resultados muestran que el cultivo ya creció, pero si hubo un aumento en la acumulación de AGPs. En esta condición, no hubo aumento de la biomasa, pero si en la producción de AGPS que alcanzó una acumulación 7.31 veces más alta a la obtenida en el cultivo por lote. Bajo estas condiciones, se observa que los resultados experimentales se alejan del resultado predicho por el modelo Una posible explicación es que esta producción se debió a la acumulación de sacarosa, ya que del día 4 al 6, se presenta un incremento de sacarosa mayor a los 45 g de sacarosa L<sup>-1</sup>, lo que podría ejercer una presión osmótica (Capataz-Tafur *et al.*, 2010).

Los resultados de este trabajo muestran que el CLA de *B. vulgaris* es una estrategia acertada para lograr un aumento de 6.32 veces de la producción volumétrica de las AGPs, comparadas con el CL.

Este trabajo es pionero en el uso de dicha estrategia para la especie vegetal y para la producción de las AGPs. Los datos obtenidos son consistentes con los reportados

para la producción del metabolito en otras especies vegetales a través del CLA. Dalton (1983) reporta un aumento en la producción de clorofilas de 9 veces para *Ocimum basilicum*. Por otra parte para *Thalictrum rugosum*, se muestra que el incremento de la producción del metabolito es de 4.4 veces (Choi *et al.*, 1999). Wang *et al.* (1999) reportaron que en un CLA usando un pulso de sacarosa hay la producción de 274.4 mg de taxanos L<sup>-1</sup> de las AGPs.

## 9. Conclusiones

El cultivo de células de *Beta vulgaris* L. por lote alimentado para la producción de AGPs se estableció bajo el principio de pH-*stat* y usando sacarosa en la corriente de alimentación. A través del modelaje del cultivo por lote alimentado, se estableció que la alimentación de 300 g de sacarosa L<sup>-1</sup>, era propicia para mejorar el crecimiento y la producción de AGPs. Los resultados experimentales de producción de biomasa (26.18 g PS L<sup>-1</sup>) y de AGPs (491.46 mg L<sup>-1</sup>) representaron incrementos de 2.13 y 7.31 con respecto al cultivo por lote. Contrastando los datos experimentales con los predichos por el modelo, se observó que se llegó a predecir el crecimiento celular, pero no la producción de AGPs.

## 10. Bibliografía

- Bustos V. D., Rodríguez-Talou J., Giulietti A. M., Merchuk J. C. 2008. Effect of shear stress on anthraquinones production by *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Biotechnology Progress*. 24:175-181
- Capataz-Tafur J., Hernández-Sánchez A.M., Rodríguez-Monroy M., Trejo-Tapia G., Sepúlveda-Jiménez G. 2010. Sucrose induces arabinogalactan protein secretion by *Beta vulgaris* L. cell suspension cultures. *Acta Physiology Plantarum*. 32(4):757-764
- Capataz-Tafur J., Trejo-Tapia G. Rodríguez-Monroy M., Sepúlveda-Jiménez G. 2011. A role of arabinogalactan proteins in cell aggregation of *Beta vulgaris* L. suspensions cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 106(1):169-177
- Chen S.Y., Huang S.Y. 2000. Shear stress effects on cell growth and L-DOPA production by suspension culture of *Stizolobium hassjoo* cells in an agitated bioreactor. *Bioprocess Engineering* 22: 5-12
- Cheng J.S., Lei C., Wu J.C., Yuan Y.J. 2008. Expression of arabinogalactan proteins involved in taxol production by immobilized *Taxus cuspidata* cells. *Journal of Biotechnology* 133: 96-102
- Choi J.W., Kim Y.K., Lee W.H., Pedersen H., Chin C.K. 1999. Bioreactor operating strategy in *Thalictrum rugosum* plant cell culture for the production of berberine. *Biotechnology Bioprocess Engineering*. 4:138-146
- Choi H.K., Kim S.I., Son J.S., Hong S.S., Lee H.S., Chung I.S., Lee H.J. 2000. Intermittent maltose feeding enhances paclitaxel production in suspension culture of *Taxus chinensis* cells. *Biotechnology Letters*.22: 1793-1796
- Chung Y.C., Chien I.L., Chang D.M. 2006. Multiple-model control strategy for a fed-batch high cell-density culture processing. *Journal of Process Control* 16: 9-26
- Dalton C.C. 1980. Photoautotrophy of spinach cells in continuous culture: photosynthetic development and sustained photoautotrophic growth. *Journal of Experimental Botany* 31: 791-804
- Dalton C.C. 1983. Chlorophyll production in fed-batch cultures of *ocimum basilicum* (*Sweet basil*). *Plant Science Letters*.32: 263-270

- Dong H.D., Zhong J.J. 2001. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. *Biochemical Engineering Journal*. 8:145–150
- Doran P. 1999. *Bioprocess engineering principles*. Academic press INS (ED). San Diego, USA. Pag. 359-261
- Dörnenburg H., Knorr D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microbiology Technology*. 17:674-684
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3):350-356.
- Ferri M., Dipalo S.C.F., Bagni N., Tassani A. 2001. Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. *Food Chemistry* 124:1473-1479
- Edahiro J.I., Nakamura M., Seki M., Furusaki S. 2005. Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured Strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into the medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(1):43-47
- Gamborg O., Miller R., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158
- Gao M., Showalter A.M. 1999. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan proteins involvement. *Plant Journal*. 19: 321–331
- García-Arazola R., Cha S.S., Chang G., Buchanan I., Doyle B., Titchener-Hooker N., Baganz F. 2005. Evaluation of a pH-stat feeding strategy on the production and recovery of Fab' fragments from *E. Coli*. *Biochemical Engineering Journal* 23:221-230
- Gaspar Y. M., Nam J., Schultz C. J., Lee Lan-Ying, Gilson P. R., Gelvin S. B., and Bacic A. 2001. Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of agrobacterium transformation. *Plant Physiology* 135: 2162-2171

- Georgiev M.I., Weber J., Maciuk A. 2009. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology Biotechnology*. 83:809-823
- Hernández-Sánchez A.M. 2007. Acumulación y características bioquímicas de las AGPs secretadas por cultivos de células de *Beta vulgaris* L. en suspensión. Tesis de maestría. CEPROBI-IPN. Yautepec, Morelos.
- Hernández-Sánchez A.M., Capataz-Tafur J., Rodríguez-Monroy M., Sepúlveda-Jímenez G. 2009. Las proteínas arabinogalactanos en cultivos de células vegetales. *Interciencia* 34 (3): 170-176
- Hu W.W., Zhong J.J. 2001. Effect of bottom clearance on performance of airlift bioreactor in high-density culture of *Panax notoginseng* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92(4):389-392
- Hu W.W., Yao H., Zhong J.J. 2001. Improvement of *Panax notoginseng* cell culture for production of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation in pneumatically agitated bioreactors. *Biotechnology Progress* 17:838-846
- Immerzeel P. 2005. Characterization of carrot arabinogalactan proteins. Ph.D. Thesis Wageningen University, Netherlands. 90-8504-150-3
- Immerzeel P., Scholsb H. A., Alphons G. J. Voragenb., de Vriesa-Sacco C. 2004. Different arabinogalactan proteins are present in carrot (*Daucus carota*) cell culture medium and in seeds. *Physiologia Plantarum* 122: 181–189
- Komalavilas P., Zhu J.K., Nothnagel E. A. 1991. Arabinogalactan proteins from the suspension culture medium and plasma membrane of *Rose* cells. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (24):15956-15965
- Kreuger M, and van Holst G.J. 1996. Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Molecular Biology* 30: 1077-1086
- Kreuger M. van Holst G.J., 1993. Arabinogalactan-proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 189:243-248
- Lamport D. T. A., Kieliszewski M. J., Showalter A. M. 2005. Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyze AGP function. *New Phytologist* 169 : 479-492

- Liu S., Bugos R.C., Dharmasiri N., Su W.W. 2001. Green fluorescent protein as a secretory reporter and a tool for process optimization in transgenic plant cell cultures. *Journal of Biotechnology* 87:1-16
- Luo J., Mei X.G., Hu D.W. 2002. Improved paclitaxel production by fed-batch suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors. *Biotechnology Letters* 24:561-565
- Majewska-Sawka A., Nothnagel E. A. 2000. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology* 122: 3-9
- Minihane B. J., Brown D. E. 1986. Fed-batch culture technology. *Biotechnology Advances*. 4: 207-218.
- Nguyen T.T., Murthy H. N., Yu K.W., Jeong C.S., Hahn E.J., Paek K.Y. 2006. Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. *Journal of Plant Physiology* 163: 1337-1341
- Nielsen J., Viladsen J., Lidén G. 2002. *Bioreaction engineering principles*. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York USA. Pag: 367-371
- Ontiveros J. 1994. Aislamiento de líneas celulares de *Beta vulgaris* productoras de betalainas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Pal S., Das S., Dey S. 2003. Peroxidase and arabinogalactan protein as by-products during somatic embryo cultivation in *air-lift* bioreactor. *Process Biochemistry* 38: 1471-1477
- Park C.I., Lee S.J., Kang S.H., Jung H.S., Kim D.I., Lim S.M. 2010. Fed-batch cultivation of transgenic rice cells for the production of hCTLA4Ig using concentrated amino acids. *Process Biochemistry* 45(1):67-74
- Prakash G., Srivastava A.K. 2006. Modelling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. *Biochemical Engineering Journal* 29:62-68
- Prakash G., Srivastava A.K. 2007. Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspension culture. *Process Biochemistry* 42: 93-97
- Qian Z.G., Zhao Z.J., Xu Y., Qian X., Zhong J.J. 2005. Highly efficient strategy for enhancing taxoid production by repeated elicitation with a newly synthesized

- jasmonate in fed-batch cultivation of *Taxus chinensis* cells. *Biotechnology and Bioengineering* 90 (4):516-521
- Rodríguez-Monroy M. 1991. Cultivo por lote alimentado para la producción de bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de maestría CINVESTAV-IPN México D.F.
- Rodríguez-Monroy M., Galindo E. 1999. Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme and Microbial Technology* 24:687- 693.
- Rokem, J.S. y Goldberg, I. 1985. Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: Methods for yield improvement. *Advances in Biotechnological Processes* 4. 241-274.
- Roja G., Bhangale A.S., Juvekar A.R., Eapen S., D'Souza S.F. 2005. Enhanced production of the polysaccharide arabinogalactan using immobilized cultures of *Tinospora cordifolia* by elicitation and *in situ* adsorption. *Biotechnology Progress* 21:1688-1691
- Santiago-Martínez S. (2009). Comparación de dos impulsores en un biorreactor para el cultivo de células de *Beta vulgaris* L. y su producción de betalaínas y proteínas arabinogalactanos. Tesis de maestría. CEPROBI-IPN. Yautepec, Morelos
- Schultz C., Gilson P., Oxley D., Youl J., Bacic A. 1998. GPI-anchors on arabinogalactanproteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science* 3 (11):1360-1385
- Serpe M., Nothnagel E.A. 1993. Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: Evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193: 542-550
- Shinde A.N., Malpathak N., Fulzele D.P. 2009. Studied enhancement strategies for phytoestrogens production in shake flasks by suspension culture of *Psoralea coryfolia*. *Bioresource Technology* 100:1833-1839
- Showalter A. M. 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Molecular Life Science*. 58: 1399–1417

- Shuler M.L., Kargi F. 2002. Bioprocess engineering. Basic Concepts. 2<sup>a</sup> Edition  
Pearson Education International. Enited States of American. Pag. 155-261
- Sim J.S., Chang H.N. 1999. Fed-batch hairy root cultures with in situ separation.  
Biotechnology Bioprocess Engineering 4:106-111
- Srinivasan V., Ryu D.D.Y. 1993. Improvement of shikonin productivity in  
*Lithospermum erythrorhizon* cell culture by alternatiing carbon and nitrogen  
feeding strategy. Biotechnology and Bioengineering 42:793-799
- Suthar S., Ramawat K.G. 2010. Growth retardants stimulate guggulsterone  
production in the presence of fungal elicitor in fed-batch cultures of  
*Commiphora wightii*. Plant Biotechnology. Rep.4:9-13
- Trejo-Espino J.L., Rodríguez-Monroy M, Vernon-Carter E.J, Cruz-Sosa F. 2011.  
Establishment and characterization of *Prosopis laevigata* (Humb. & amp;  
Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst. cell suspension culture: A biotechnology  
approach for mesquite gum production. Acta Physiologia e Plantarum.  
33(5):1687-1695
- Trejo-Espino J.L., Rodríguez-Monroy M, Vernon-Carter E.J, Cruz-Sosa F. 2010.  
Emulsifying properties of the gum produced by *Prosopis laevigata* (Humb. &  
Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst (Mesquite) cells suspension culture in bioreactor.  
Revista Mexicana de Ingeniería Química. 9 (3): 251-260
- Uozumi N., Kohketsu K., Kondo O., Honda H., Kobayashi T. 1991. Fed-batch culture  
of hairy root using fructose as a carbon source. Journal of Fermentation and  
Bioengineering 72(6):457-460
- Uozumi N., Makino S., Kobayashi T. 1995. 20-Hydroxyecdysone production in *Ajuga*  
hairy root controlling intracellular phosphate content based on kinetic model.  
Journal of Fermentation and Bioengineering 80(4):362-368
- Van Hengel A.J., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., Van Kammen A., de Vries  
S.C. 2001. N-Acetylgucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan  
proteins control somatic embryogenesis. Plant Physiology. 125: 1880–1890
- Van Holst G.J., Clarke A. 1985. Quantification of arabinogalactan-protein in plant  
extracts by single radial diffusion gel. Analytical Biochemistry. 148:446-450.

- Verbeken D., Dierckx S., Dewettinck K. 2003. Exudate gums: occurrence, production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:10-21
- Versyck K.J., Van Impe J.F. 1999. Feed rate optimization for fed-batch bioreactors: From optimal process performance to optimal parameter estimation. *Chemical Engineering Communications* 172:107-124
- Wang H.Q., Yu J.T., Zhong J.J. 1999. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by sucrose feeding strategy. *Process Biochemistry* 35:479-483
- Westgate P.J., Curtis W.R., Emery A.H., Hasegawa P.M. Heinstejn P.F. 1991. Approximation of continuous growth of *Cephalotaxus harringtonia* plant cell cultures using fed-batch operation. *Biotechnology and Bioengineering* 38:241-246
- Weuster-Botz D., Altenbach-Rehm J., Arnold M. 2001. Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochemical Engineering Journal* 7:163-170
- Wisniewska E., Majewska-Sawka A. 2007. Arabinogalactan-proteins stimulate the organogenesis of guard cell protoplasts-derived callus in sugar beet. *Plant Cell Reports* 26:1457-1467
- Wu J.Y., Wong K., Ho K.P., Zhou L.G. 2005. Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. *Enzyme and Microbial Technology* 36:133-138
- Xu J, Shpak E, Gu T., Moo-Young M, Kieliszewski M. 2004. Production of recombinant plant gum with tobacco cell culture in bioreactor and gum characterization. *Biotechnology and Bioengineering* 90(5)
- Xu J., Ge X., Dolan M.C. 2011. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances* 29(3):278-299
- Yariv, J., Rapport, M.M. and Graf, L. 1962. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycoside. *Biochem. J.* 85, 383-388

- Zagorchev L., Petrova S., Odjakova M. 2008. Arabinogalactan proteins in salt-adapted suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. *General and Applied Plant* 4(3 -4):159-168
- Zha X.Q., Luo J.P., Jiang S.T., Wang J.H. 2007. Enhancement of polysaccharides production in suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense* by optimization of medium compositions and feeding of sucrose. *Process Biochemistry* 42:344-351
- Zhang Y.H., Zhong J.J. 1997. Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Enzyme and Microbial Technology* 21:59-63
- Zhang Y.H., Zhong J.J., Yu J.T. 1996. Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. *Journal of Biotechnology* 51:49-56
- Zhang Y.H., Zhong J.J., Yu J.T. 1996. Effect of nitrogen source on cell growth and ginseng saponin and polysaccharide production by suspended cultures of *Panax notoginseng*. *Biotechnology Progress* 12:567-571
- Zheng G.Z., Yang C.R. 1994. *Sanchi (Panax notoginseng): Biology and application* (in chinese). Science Press: Beijing.
- Zhong J.J. y Yoshida T. 1995. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme and Microbial Technology* 17:1073-1079
- Zhu Jian-Kang, Bressan R. A., Hasegawa P. M. 1993. Loss of arabinogalactan-proteins from the plasma membrane of NaCl-adapted tobacco cells. *Planta* 190:221-226