

Vol. 48, Nos. 3-4
Julio - Septiembre. 2006
Octubre - Diciembre. 2006
pp. 269 - 280

El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados

Mauricio A. Trujillo-Roldán,* Norma A. Valdez-Cruz**

RESUMEN. Los cultivos sumergidos siempre están sometidos a las fuerzas asociadas a la dinámica del fluido que lo contiene. En esta revisión se presentan las bases del estrés hidrodinámico en sistemas agitados de cultivo sumergido, partiendo de la definición de *eddy* de microescala, esfuerzo de corte y velocidad de deformación. Este trabajo a su vez, reporta algunas de las principales propuestas de respuesta celular ante los efectos del estrés hidrodinámico, y a otras perturbaciones que le permiten a la célula responder ante la agitación. Además, se presentan los reportes más relevantes en cada uno de los modelos celulares que pueden ser afectados por la agitación mecánica, tales como: bacterias, hongos filamentosos, células vegetales y animales.

Palabras clave: Estrés de corte, velocidad de deformación, cultivos sumergidos.

INTRODUCCIÓN

La referencia típica a estrés hidrodinámico está frecuentemente asociada a muerte celular en bioprocessos agi-

Nomenclatura

Símbolo	Definición	Unidades
N	Velocidad de agitación	rev / s
Re	Número de Reynolds $Re = \frac{\rho_c \cdot N \cdot D^2}{\mu}$	-
Ne	Número de potencia del impulsor $Np = \frac{P}{N^3 D^5 \rho}$	-
P	Potencia de agitación	W
V	Volumen	m ³
D	Diámetro del impulsor	m
ε_t	Energía local de disipación	W/m ³
γ	Velocidad o gradiente de deformación	s ⁻¹
μ	Viscosidad dinámica del líquido	cps
ρ	Densidad	kg/m ³
τ	Esfuerzo de corte, estrés de corte, <i>shear stress</i>	N/m ²
ν	Viscosidad cinemática del líquido	m ² /s

* PROBIOMED S.A. de C.V. Departamento de Investigación y Desarrollo.

** Departamento de Medicina Molecular y Bioprocessos. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

First version received: September 15, 2006; first version revised: September 23, 2006; second version received: October 12, 2006; second version revised: October 23, 2006; third version received: December 11, 2006; third version revised: December 19, 2006; fourth version received: January 22, 2007; accepted: January 31st, 2007.

ABSTRACT. All submerged cultures are under forces associated to fluid dynamics. In this review, the bases of hydrodynamic stress in agitated systems of submerged cultures will be presented, starting from the definitions of *eddy* of microscale, shear stress and shear rate. This work reports as well some of the most important proposals of cellular response of cells affected by shear injuries, and how other stress response mechanisms allow the cell to respond to the hydrodynamic effects. In addition, some of the most remarkable reports in each one of the cellular culture models will be presented that can be affected by the mechanical agitation, such as: bacteria, filamentous fungi, vegetal and animal cells.

Key words: Shear stress, shear rate, submerged cultures.

tados y aireados (Thomas, 1990). Es más, esta referencia es usada aun cuando los experimentos no están diseñados para demostrar este efecto y algunos resultados, son difícilmente explicados por las variables manipuladas en los experimentos. Son muchos los reportes en la literatura que hablan sobre el efecto de la agitación, aireación y oxígeno disuelto en cultivos celulares. Sin embargo, la mayoría no separan los efectos hidrodinámicos, de aquéllos causados por fenómenos de transferencia de masa (principalmente de oxígeno) o calor.

Los efectos del estrés hidrodinámico sobre las células pueden ser clasificados en daños letales y sub-letales (Prokop y Bajpai 1992; Joshi et al. 1996; Henzler 2000). Los efectos sub-letales pueden ser considerados como parte de un mecanismo hipotético basado en la respuesta de las células al estrés por cizalla (rozamiento) o a otros tipos de estrés, como por ejemplo aquéllos causados por cambios de temperatura o estrés oxidativo (Sahoo et al. 2003; Sahoo et al. 2004; Sahoo et al. 2006). La mayoría de los trabajos en esta línea han sido encaminados a explicar los efectos letales (lisísis o apoptosis) en los cultivos celulares. Sin embargo, los efectos subletrales pueden llegar a tener mayor relevancia que aquéllos letales (Kieran et al. 2000).

EQUIPOS DE MEDICIÓN DE ESTRÉS HIDRODINÁMICO

Existen dos formas definidas de entender los efectos del estrés hidrodinámico en cultivos celulares, estos son el uso de sistemas de cultivos convencionales (matraces y

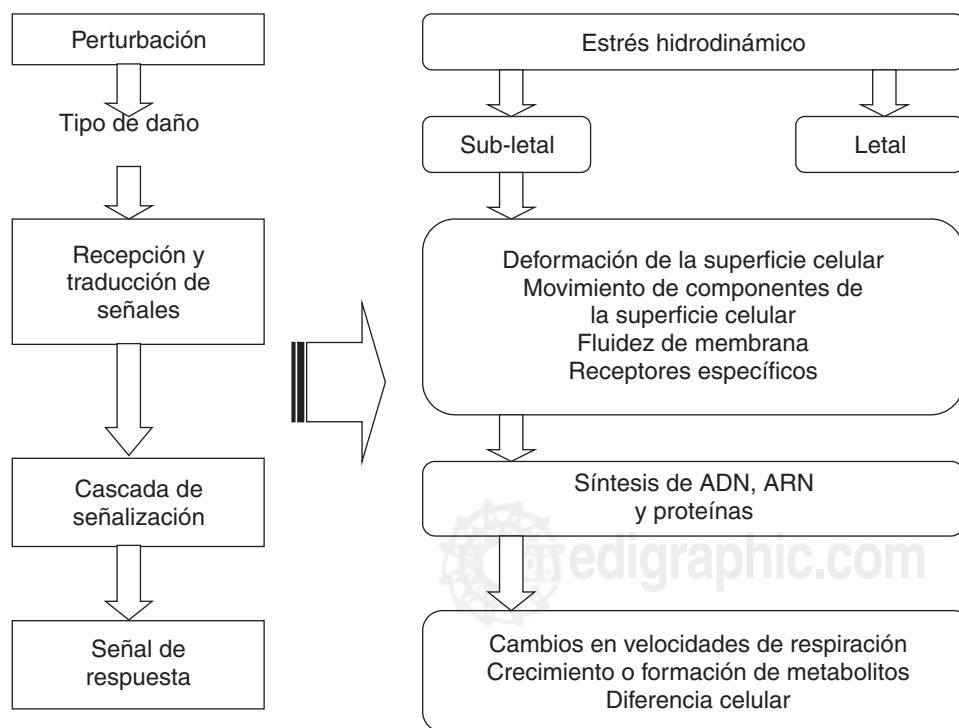
biorreactores) y sistemas modelo (viscosímetros y micromanipuladores). La aproximación del uso de sistemas convencionales presenta la ventaja de que se evalúa la respuesta biológica del cultivo a largo plazo, como la velocidad específica de crecimiento, la velocidad de producción de metabolitos, los rendimientos y los cambios en las características morfológicas, (Joshi et al. 1996). Sin embargo, la principal desventaja de estos sistemas (principalmente los de escala industrial), es que la velocidad de deformación, que determina el estrés hidrodinámico y que actúa sobre las partículas biológicas, no es constante en todo el tanque, debido a las variaciones irregulares en el flujo en todas las coordenadas y en el tiempo (Oldshue, 1983; Boysan et al. 1988; Bakker et al. 2000; Bakker, 2003). Además, estos estudios tienden a ser altamente específicos, por la configuración particular del biorreactor empleado y por las características propias de cada especie estudiada (Rodríguez-Monroy y Galindo, 2003).

La segunda estrategia usada en la medición de los efectos del estrés hidrodinámico, es aquélla donde se expone a la partícula biológica a un ambiente con un flujo bien definido y controlado (sistemas modelo). Este tipo de flujo puede ser generado en varios tipos de viscosímetros, normalmente usados para determinar las propiedades reológicas de los fluidos (Prokop y Bajpai, 1992; Sahoo et al. 2003, Sahoo et al. 2004, Sahoo et al. 2006), como también el uso de sistemas de micromanipulación (Thomas y

Zhang, 1998; Thomas, 1990). Sin embargo, estos equipos normalmente miden los efectos de las células en corto plazo y en un número muy limitado de células (Prokop y Bajpai, 1992; Kieran et al. 2000). A través de la micromanipulación es posible capturar, prensar o estirar células individuales y registrar con micro-sensores la cantidad de energía suministrada (Thomas 1990). Se han reportado trabajos de micromanipulación en levaduras (Zhang et al. 1999; Smith et al. 2000; Nguyen et al. 2004), células vegetales (Blewett et al. 2000; Wang et al. 2004) y células animales (Zhang et al. 1991; Thomas et al. 1994).

DAÑO CELULAR Y SU CUANTIFICACIÓN

Un cultivo celular puede presentar dos tipos de daño: a) un daño letal que provoca la muerte por necrosis (lisísis celular) o apoptosis (proceso de muerte programada) en las células, o b) daños subletales que se manifiestan en alteraciones metabólicas en los cultivos (Prokop y Bajpai, 1992). En aquellos casos donde existen sólo efectos subletales, se presentan mecanismos de respuesta al estrés (Fig. 1). En este orden, el primer paso tendrá que ser la recepción y traducción de señales, en las que se incluyen deformaciones de las moléculas de la superficie celular (por ejemplo, los canales iónicos), detección por receptores específicos, movimientos de los componentes celulares y cambios en la fluidez de la membrana (Brakemerier



Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006

Figura 1. Mecanismo propuesto de respuesta al estrés hidrodinámico en cultivos sumergidos.

et al. 2002). Estos efectos sobre la membrana resultarán en una serie de reacciones en cascada que afectan la síntesis de proteínas y ARN (Prokop y Bajpai 1992; Joshi et al. 1996). Estas variaciones intracelulares finalizan en respuestas biológicas, que normalmente son definidas como parámetros de cuantificación de daño celular, tales como: velocidades de respiración y crecimiento o producción de diversos metabolitos, diferenciación, necrosis y apoptosis (Fig. 1). El mecanismo de respuesta de las células está basado en su anatomía, como son la membrana celular, el citoesqueleto y el citoplasma, receptores específicos y el tamaño celular (Prokop y Bajpai 1992; Joshi et al. 1996). La presencia de receptores específicos en la pared o en la membrana celular parecen evidenciar que las células tienen preparadas respuestas a nivel molecular a un estímulo mecánico, como podría ser el causado por la agitación en biorreactores. Evidencias de este tipo de receptores han sido encontradas en bacterias, levaduras, células vegetales y células animales (Prokop y Bajpai 1992; Joshi et al. 1996; Chisti 2001; Sahoo et al. 2003). Poco ha sido reportado sobre la funcionalidad de estos receptores, pero ha sido revisado en más detalle en células animales que son sometidas a fuerzas hemodinámicas (Chen et al. 1999; Hong et al. 2006). Los receptores al estrés pueden ser canales iónicos que permiten el paso de iones específicos cuando son estimulados mecánicamente. El flujo de los iones al interior de las células es seguramente uno de los eventos iniciales en la cascada de señales de respuesta propuesta por Prokop y Bajpai (1992).

Recientemente se ha observado que, como respuesta al estrés hidrodinámico, al interior de la célula se establece una respuesta asociada a los mecanismos de defensa ya conocidos hacia el estrés oxidativo. Esta correlación entre las respuestas ante ambas condiciones de estrés ha sido reportado tanto para bacterias (Sahoo et al. 2003; Sahoo et al. 2004) como para células vegetales (Kieran et al. 2000; Shi et al. 2003; Han y Yuan 2004; Wu y Ge 2004).

Los parámetros usados como medida del daño celular dependen de cada cultivo. Así, las variables más usadas involucran velocidades de crecimiento, producción y de consumo de nutrientes y rendimientos celulares y de productos (Märk et al. 1991; Prokop y Bajpai, 1992; Peter et al. 2006). Además, se utilizan otras técnicas relacionadas con la viabilidad celular, así como algunas basadas en las características morfológicas de las partículas biológicas (García-Briones y Chalmers, 1994; Rodríguez-Monroy y Galindo, 2003). Dentro de estas últimas, la más usada es la determinación de la integridad de la membrana celular por medio de técnicas de exclusión de colorantes, que pueden ser de dos tipos: no fluorescentes, como el azul de trípano, el azul de metileno y el azul de Evans; y fluorescentes como el

diacetato de fluoresceína (Lloyd y Hayes, 1995; Hewitt et al. 1998; Meneses-Acosta et al. 2001; Rodríguez-Monroy y Galindo, 2003). Otras técnicas miden la permeabilidad dieléctrica de la membrana o la unión de anticuerpos específicos a proteínas de la membrana. Una forma de determinar lisis celular es a través de la detección de compuestos intracelulares en el sobrenadante. Para ello se han usado moléculas como carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (Prokop y Bajpai, 1992; Thomas y Zhang, 1998). También, se ha usado la determinación de la actividad de enzimas, como la lactato-deshidrogenasa (Prokop y Bajpai, 1992; Thomas y Zhang, 1998). Finalmente, la capacidad de asimilación de nutrientes es una característica que se ha usado en algunos estudios como una herramienta para determinar la viabilidad de las células (Dunlop y Namdev, 1993; Prokop y Bajpai, 1992).

ESFUERZO DE CORTE, VISCOSIDAD Y VELOCIDAD DE DEFORMACIÓN

El término “esfuerzo” ha sido uno de los más abusados en la literatura, ya que ha sido utilizado para referirse a una cantidad de factores, que lo han hecho poco comparable cuando se requiere analizar resultados de diferentes fuentes. Es decir, ha sido usado para mencionar cualquier efecto hidrodinámico en un material biológico (Thomas, 1990). Sin embargo, el hecho de que algún elemento biológico sufra un cambio con el incremento de la velocidad de agitación, no significa necesariamente que el material esté siendo deformado (Thomas y Zhang, 1998).

La fuerza por unidad de área aplicada en forma paralela a la superficie de cada partícula biológica (cizallamiento), puede definirse como esfuerzo de corte, estrés de corte o “shear stress” (τ). Este τ es proporcional a la diferencia de las velocidades (dv) entre las líneas de flujo del medio de cultivo superior e inferior (Fig. 2 a), dividido por una distancia muy pequeña entre estas líneas de flujo (dy). La constante de proporcionalidad es la viscosidad (μ) y tendríamos así la definición de la ley de Newton:

$$\tau = \mu \frac{dv}{dy} = \mu\gamma \quad (1)$$

donde, dv/dy está definida como la velocidad o gradiente de deformación (γ) (Bennet y Myers, 1962) y puede entenderse como los cambios de velocidades que generarían una deformación a una partícula cualquiera. Esta ecuación se cumple siempre y cuando la viscosidad sea constante, no importando la velocidad de deformación a la que es sometido el fluido, y cuando esto se

cumple es conocido como fluido Newtoniano (Fig. 2 b). Por otra parte, cuando se tienen cultivos celulares de alta densidad celular, producción de polisacáridos, crecimiento de hongos filamentosos, o cualquier otro cultivo sumergido donde la viscosidad cambie con el tiempo de cultivo y con la velocidad de agitación, la relación entre esfuerzo de corte (τ) y velocidad de deformación (γ) no es lineal. La “Ley de la potencia” es una manera de describir el comportamiento de estos fluidos (Fig. 1) (Bennet y Myers 1962):

$$\tau = K \left(\frac{dv}{dy} \right)^n = K \gamma^n = K \left(\frac{dv}{dy} \right)^{n-1} \left(\frac{dv}{dy} \right) = \mu_{ap} \gamma \quad (2)$$

La cantidad n es conocida como el “índice de flujo” y K es el “índice de consistencia”, las cuales son características de cada fluido y el término $K(dv/dy)^{n-1}$ se denomina viscosidad aparente (μ_{ap}). La mayor parte de los fluidos no Newtonianos tienen viscosidades aparentes que son relativamente altas comparadas con la viscosidad del agua (Bennet y Myers 1962; Oldshue 1983). En función de su reograma, que es la gráfica de τ vs γ (Fig. 2 b), los fluidos no newtonianos pueden dividirse en: pseudo-plásticos, dilatantes y fluidos de Bingham entre otros (Oldshue 1983; Trujillo-Roldán y Galindo 2003).

Es claro que los patrones típicos de agitación en un biorreactor provoca que las velocidades de deformación no sean constantes, y es por eso que para facilitar los cálculos y diseños se han determinado parámetros globales, como por ejemplo, la velocidad de deformación máxima (γ_{max}) y la velocidad de deformación promedio (γ_{prom}). La velocidad de deformación máxima se presenta por la presencia de fuerzas hidrodinámicas muy fuertes con una duración del orden de milisegundos, ubicados en las cercanías de los impulsores, y generando remolinos muy pequeños, conocidos como *eddies* de microescala. Las fuerzas que se generan en estos cortos períodos de tiempo, pueden ser hasta de un orden de magnitud mayor que los calculados con los valores promedio (Meijer et al. 1993 y 1994; Nienow 1998). Trabajos como los de Meijer et al. (1993, 1994) y Bowen (1986) presentan correlaciones empíricas para calcular estos valores promedios y máximos. Existen otras herramientas adicionales que permiten modelar las diferencias de las velocidades de deformación que pueden encontrarse en tanques agitados. Una de estas herramientas, es la dinámica de fluidos computacional. Ejemplos de la aplicación de dinámica de fluidos computacional en sistemas biológicos puede ser encontrada en Alexopoulos et al. (2002), Davidson et al. (2003), Bakker et al. (1994), Bakker et al. (2000) y Bakker (2003) y Zhang et al. (2005).

LA CASCADA DE ENERGÍA POR AGITACIÓN, LA TEORÍA DE KOLMOGOROV ASOCIADA AL DAÑO CELULAR Y LA ENERGÍA DE DISIPACIÓN

La energía cinética suministrada por algún elemento mecánico, aparece en el movimiento turbulento en mayores escalas (grandes remolinos) y esta energía es transmitida a escalas cada vez menores (pequeños remolinos), hasta que en las escalas más pequeñas es disipada por la acción de la viscosidad en forma de calor (Richardson 1922). Este autor consideró que la turbulencia puede estar compuesta de remolinos (*eddies*) de diferentes tamaños y cada uno de estos *eddies* está caracterizado por su tamaño, la velocidad de su movimiento y del tiempo de duración del mismo. Los remolinos producidos tendrán un número adimensional característico del nivel de turbulencia (número de Reynolds, determinado como un número adimensional que relaciona las fuerzas inerciales sobre las fuerzas visco-sas). Si este número adimensional es elevado el *eddy* será inestable y se romperá transfiriendo energía a *eddies* más pequeños. Este proceso de cascada de energía de unos *eddies* a otros continuará hasta que el número de Reynolds del *eddy* más pequeño sea lo suficientemente bajo para que el remolino sea estable y la energía cinética se disipe en forma de calor. En sistemas agitados, la teoría de Kolmogorov (Kolmogorov 1941; Kolmogorov 1962) identifica al remolino más pequeño, o *eddy* de Kolmogorov existente, en función de la energía de disipación y de la viscosidad cinemática del fluido. Thomas (1990) sugirió que las especies biológicas no serían afectadas por el estrés dinámico de los fluidos, si éstas tuvieran tamaños menores a aquellos tamaños de los remolinos más pequeños (micro-escala de turbulencia o de Kolmogorov) que se pueden formar en un sistema agitado (por ejemplo, cuando se tienen energías promedio de disipación (energía que se entrega en agitación y aireación) cercanas a las utilizadas en biorreactores industriales en fermentaciones bacterianas (1.0 W kg^{-1}), se llegan a tener valores del *eddy* de Kolmogorov de $30 \mu\text{m}$, usando la viscosidad cinemática del agua (Hewitt et al. 1998). Se considera que el mayor daño a la partícula biológica es ocasionado por *eddies* de un tamaño comparable a aquél de las partículas (Thomas 1990). Los *eddies* más grandes llevan a las partículas biológicas en un movimiento convectivo, mientras que *eddies* significativamente más pequeños que las partículas biológicas, tienen suficiente energía y pueden actuar sobre las células sometiéndolas a estrés (Thomas, 1990; Prokop y Bajpai, 1992). En sistemas agitados, los *eddies* más pequeños que se pueden encontrar están en el intervalo de 10 a $100 \mu\text{m}$, que cae en el rango de tamaño de los hongos filamentosos, células animales y células vegetales. Sin em-

bargo, encontrar *eddies* de tamaños menores de 10 μm , los cuales podrían afectar a las bacterias, requiere energías de disipación en extremo altas, valores difíciles de encontrar en los sistemas de cultivo agitados hasta ahora diseñados (Peter et al. 2006).

La energía de disipación volumétrica promedio en biorreactores puede calcularse con base en la definición de número de potencia de un agitador (N_e), que está directamente relacionado con el diseño del impulsor y la velocidad de agitación (Oldshue, 1983), mientras que en matraces agitados, la energía de disipación depende de la velocidad de agitación de la incubadora, el diámetro mayor del matraz y la viscosidad del medio de cultivo (Büchs et al. 2000a; Büchs et al. 2000b). Debido a la poca homogeneidad de los biorreactores industriales, en las zonas de mayor agitación (zonas cercanas a los impulsores), se encuentran los mayores valores locales de energía de disipación y los menores tamaños de los *eddies* de micro-escala (Büchs y Zoels, 2001; Maier y Büchs, 2001; Peter et al. 2006). La literatura propone que los valores máximos de energía de disipación pueden llegar a ser 30 veces mayores a los valores promedio (Nienow 1998).

Han sido pocos los trabajos donde se propone una relación del daño biológico con la energía de disipación, Dunlop y Namdev (1993) proponen que es posible relacionar cualquier actividad biológica, como por ejemplo, la velocidad de crecimiento, la producción de un metabolito específico y el consumo de la fuente de carbono, entre otros, con la energía total de disipación, por medio de correlaciones empíricas. Estas correlaciones tienen en cuenta parámetros operacionales como son el tiempo al que es sometido la partícula al esfuerzo de corte, la densidad del medio, el volumen celular que es sometido al daño y la energía promedio local de disipación, entre otros.

ESTRÉS HIDRODINÁMICO EN DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS

Bacterias

Cuando se hacen estudios en biorreactores, no es fácil encontrar una relación entre muerte celular y estrés hidrodinámico, principalmente por las diferencias entre los tamaños de los diferentes *eddies* de micro-escala y el tamaño del elemento biológico. No existen en la literatura reportes que presenten muerte celular como un efecto directo de las fuerzas hidrodinámicas, al menos en bacterias. Sin embargo, sí existe en la literatura un número importante de artículos que presentan efectos sub-letales en las bacterias por efectos hidrodinámicos (Jolliffe et al. 1981; Wecker y Onken, 1991; Märkl et al. 1991; Joshi et al.

1996; Hewitt et al. 1998; Peña et al. 2000; Peña y Galindo, 2002; Sahoo et al. 2003; Sahoo et al. 2004; Sahoo et al. 2006). Así por ejemplo, en cultivos de *Escherichia coli* a altos valores de energía de disipación (1.0 KW/kg, valor típico en un biorreactor industrial), *E. coli* no refleja cambios morfológicos ni metabólicos (Hewitt et al. 1998). Además, en cultivos con valores de energía de disipación de 30 KW/kg (que se alcanza a aproximadamente 1,200 rpm en un fermentador de laboratorio, usando turbinas tipo Rushton), los resultados fueron similares a aquellos cultivos llevados a cabo a 1.0 KW/kg. Estos valores de energía de disipación corresponden a tamaños del *eddy* de micro-escala de 30 y 13.5 μm , respectivamente (suponiendo medios de cultivo con viscosidades cinemáticas cercanas a la del agua).

El único sistema diseñado, hasta ahora para mantener constante la velocidad de deformación mientras se cultivan bacterias, fue reportado por Sahoo et al. (2003), quienes describen un dispositivo de cultivo al interior de un viscosímetro tipo Couette (Ogstons y Stainer 1953). En este biorreactor, se creció *Bacillus subtilis* a diferentes velocidades de deformación. Al comparar los cultivos crecidos en matraces agitados (con velocidades de deformación de 0,028 s^{-1} a 190 rpm), con aquellos cultivos crecidos con velocidades de deformación mucho mayores y constantes (1428 s^{-1}) el tamaño celular decrece aproximadamente a la mitad de aquellas células crecidas en matraces (Sahoo et al. 2003), además, se reporta un aumento en la velocidad específica de crecimiento de casi 2.5 veces y un aumento de la concentración celular en casi 2 veces (Sahoo et al. 2003). Un fenómeno similar fue reportado por Peña et al. (2000) quienes en cultivos agitados a alta velocidad de agitación (700 rpm, controlando de manera estricta la concentración de oxígeno disuelto), se encontraron mayores velocidades de crecimiento que aquéllos a baja velocidad de agitación (300 rpm), pero con diferencias en tamaño celular siendo más grandes aquellas células crecidas a baja velocidad de agitación. Por otra parte, la viabilidad de *Bacillus subtilis* se vio afectada después de varias horas de cultivo a las mayores velocidades de deformación probadas (Sahoo et al. 2004; Sahoo et al. 2006). A diferencia de la creencia generalizada, el estrés hidrodinámico afecta en forma negativa la esporulación de *Bacillus subtilis* (Sahoo et al. 2004). Además, evidencias bioquímicas y moleculares, reportadas por los mismos autores demuestran que *Bacillus subtilis* presenta un comportamiento de muerte celular muy similar a la apoptosis (muerte celular programada) ampliamente reportada en células eucariotas (Sahoo et al. 2006). Procesos de muerte programada han sido sugeridos en algunas bacterias como *E. coli* (Heidrich et al. 2001), *Bacillus subtilis* (Jolliffe et al. 1981), *Staphylococcus aureus* (Brunskill y Bayles 1996),

y *Xanthomonas campestris* (Gautam y Sharma 2002) y revisado en algunos artículos (Bayles 2003; Hochman 1997).

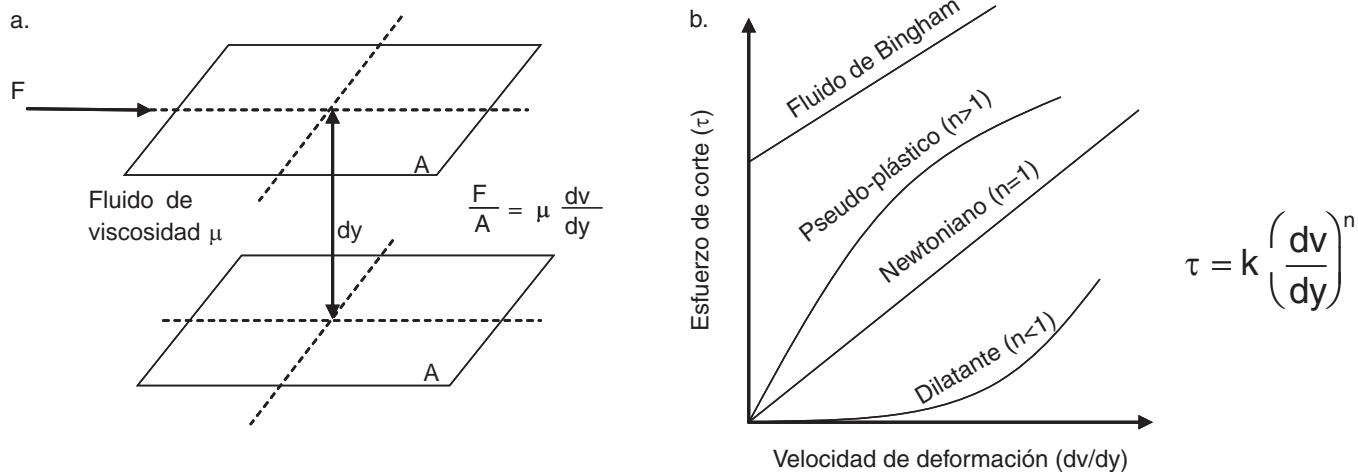
En cultivos productores de exopolisacáridos se presentan altas diferencias entre las energías locales de disipación (ε_T) en las zonas muy alejadas al agitador, de las zonas de influencia del impulsor ($\varepsilon_{T\text{máx}}$). Esto es porque estos cultivos tienen la capacidad de alterar las propiedades reológicas de las soluciones acuosas normalmente, aumentando la viscosidad o alterando las características reológicas del medio de cultivo. Por ejemplo, la producción de curdlano en lotes de *Alcaligenes faecalis* y *Agrobacterium radiobacter* es afectada por la hidrodinámica del cultivo (Lawford y Rousseau 1991). En cultivos de *Aureobasidium pullulans*, en la producción de pululano, Wecker y Onken (1991), reportaron que un incremento de la velocidad de deformación de 30 a 100 s⁻¹, genera una disminución del 50% en el rendimiento celular, además se demostró que una velocidad de deformación promedio de 55 s⁻¹ en una columna de burbujeo, puede obtener resultados similares a los obtenidos en tanques agitados a 30 s⁻¹. Peña et al. (2000) en la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*, demostraron que diferencias en cultivos en la velocidad de agitación, manteniendo constante la tensión de oxígeno disuelto, aumentan la velocidad específica de crecimiento de la bacteria, pero no su concentración celular final. Además, reportan que altas velocidades de agitación (700 rpm), disminuyen el peso molecular promedio del polímero hasta en un orden de magnitud, al compararse con bajas velocidades de agitación de 300 rpm. Las diferencias en el peso molecular promedio del polímero obtenido en los diferentes cultivos, influyó en la viscosidad del medio de cultivo y en la formación de agregados celulares (Peña et al. 2000; Peña y Galindo 2002).

Cultivos de hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son organismos eucariotes inferiores, compuestos por filamentos ramificados (hifas) de pared celular rígida y gruesa, producto de los polisacáridos fibrosos y glicoproteínas que lo conforman (Joshi et al. 1996). Estos organismos han sido ampliamente utilizados en diversos procesos de las industrias farmacéutica, alimentaria y de producción de enzimas (Justen et al. 1996; Cui et al. 1997; Gibbs 2000). Uno de los aspectos más relevantes a tener en cuenta durante el cultivo sumergido con estos microorganismos, aun a nivel de laboratorio, es la diversa morfología que son capaces de desarrollar (White et al. 2002; Lucatero et al. 2003; Rocha-Valadez et al. 2005). A nivel macroscópico, existen dos tipos de morfología extremas: filamentosa (micelio disperso), o agregados de hifas compactos semiesféri-

cos (*pellets*). Intermedias a éstas, se presentan toda una serie de formas más o menos agregadas de micelio en suspensión. La morfología micelial más conveniente, desde el punto de vista operacional, es la de *pellet*, pues en los cultivos en que éstos predominan, se observan caldos con características Newtonianas, de baja viscosidad. Sin embargo, a medida que el tamaño de los *pellets* se incrementa, se generan limitaciones difusionales de los nutrientes hacia el centro del pellet, ocasionando un decremento en la productividad del hongo (Wittler et al. 1986; Riley et al. 2000; Rocha-Valadez et al. 2005). Por otro lado, la forma filamentosa frecuentemente genera redes tridimensionales, lo que provoca la formación de caldos altamente viscosos y no-Newtonianos, donde la transferencia de masa y la homogenización del medio de cultivo se ven drásticamente limitadas. En este caso, el uso de altas velocidades de agitación para disminuir tales limitaciones es deseable; sin embargo, el esfuerzo mecánico aplicado puede provocar daño celular en la larga y delgada estructura de las hifas, presentando diferenciación celular (Riley et al. 2000; Rocha-Valadez et al. 2005).

En uno de los trabajos pioneros, en el que se relaciona el estrés mecánico con la morfología del micelio de *Penicillium chrysogenum*, se demuestra que la eficiencia de mezclado, al modificar la transferencia de masa y de calor, rigen el crecimiento, la productividad y la morfología de los cultivos (Makagiansar et al. 1993). En este mismo trabajo, los autores proponen que la velocidad en la punta del impulsor no es un buen parámetro de cálculo para escalar biorreactores de laboratorio o de planta piloto a tanques industriales, y que es mejor tener en cuenta parámetros tales como la energía total y la energía máxima de disipación. Sin embargo, no sólo la energía de disipación es importante en este tipo de cultivos, y se han generado propuestas en términos de tener en cuenta la cantidad de veces que las formas miceliares pasan através de las zonas de máxima energía de disipación (Smith et al. 1990; Jüsten et al. 1996). Jüsten et al. (1996) demostraron que la morfología micelial de *P. chrysogenum* no sólo depende de la velocidad de agitación a la cual es sometido el cultivo, sino también del tipo de impulsor utilizado y de la frecuencia de circulación por las zonas de altas velocidades de deformación (zonas cercanas a los impulsores). En cultivos de *Fusarium moniliforme* la productividad depende, en gran medida, de la morfología desarrollada y del ambiente hidrodinámico presente en el fermentador (Priede et al. 1995). En algunos casos, al utilizar biorreactores con impulsores de alto número de potencia se logran mayores títulos productivos con hifas largas y delgadas, al ser comparados con sistemas de bajo número de potencia, manteniendo la misma energía específica suministrada (Justen et al. 1996; Priede et al. 1995). Esto puede explicarse porque



Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006

Figura 2 a. Fuerzas viscosas en un fluido, y b. Tipos de fluidos como función de su velocidad de deformación.

a mayores números de potencia, la velocidad de agitación es necesariamente menor, que aquéllos de bajos números de potencia. A su vez, menor velocidad de agitación, implica menores velocidades de deformación en el cultivo, como también *eddies* de mayor tamaño. Algunos autores proponen que en un flujo turbulento, la longitud promedio de las hifas, así como el diámetro promedio de los *pellets*, están relacionados con la energía promedio específica de disipación (ε_T) elevada a un exponente (Van Suijdam y Metz 1981; Ayazi Shamlou et al. 1994; Cui et al. 1997). Se ha reportado que el tamaño hifal está directamente relacionado con el tamaño de los *eddies* de micro-escala presente en cada cultivo (Cui et al. 1997), y que se presenta un mecanismo de “rasuramiento” de las puntas de las hifas, cuando éstas son similares a los tamaños de la micro-escala (Cui et al. 1997).

Es posible concluir que el estudio del efecto del estrés hidrodinámico sobre los cultivos de hongos filamentosos todavía tiene muchas interrogantes. Si bien se ha determinado que el tipo de impulsor y su velocidad de operación tienen una gran influencia en la morfología micelial, no menos importantes son la escala del fermentador, el tipo de cepa y los tiempos característicos de los biorreactores. Por lo pronto, la medición de la potencia suministrada y el cálculo de la energía específica disipada por el impulsor, parecen ser los parámetros clave a reportar, así como la longitud promedio de la hifa principal y/o el área de los agregados. Dada la morfología compleja de los hongos, es cada vez más evidente que se requiere el seguimiento micro y macroscópico del cultivo si se pretende controlar adecuadamente el proceso.

Células vegetales

El cultivo de células y tejidos vegetales, es una alternativa biotecnológica para obtener sustancias químicas de interés industrial (Rodríguez-Monroy y Galindo 2003). Bajo condiciones *in vitro*, las células vegetales son capaces de producir metabolitos utilizados por el hombre como fármacos, saborizantes y edulcorantes (Scragg, 1992; Zhong et al. 1995). Uno de los aspectos que requiere especial atención en estos cultivos, radica en determinar el efecto que tienen los ambientes hidrodinámicos sobre el crecimiento y el metabolismo celular (Topete et al. 1991; Alferman y Paterson 1995). Las células vegetales presentan características diferentes a las de las bacterias. Sobresalen su gran tamaño celular (que oscila entre 40-100 μm) y su tendencia a crecer en forma de agregados. Ambas dan como consecuencia problemas de sedimentación y la formación de micro-ambientes (Taticek et al. 1991; Rodríguez-Monroy y Galindo 2003). Estos tamaños son similares a los *eddies* de micro-escala que se presentan en la mayoría de los tanques agitados, haciendo necesario establecer la fragilidad de las células para definir las intensidades de agitación que mantengan un nivel adecuado de homogeneidad, sin afectar el crecimiento y la producción del metabolito de interés (Thomas 1990). Además, los cultivos de células vegetales son altamente heterogéneos en cuanto a su tamaño, forma y agregación celular (Trejo-Tapia et al. 2001). Para el caso de muchos metabolitos secundarios, se ha visto que su producción en la planta, se da en células especializadas de órganos o tejidos, y lo cual depende de cierta diferenciación morfológica. Se ha postula-

do que una de las implicaciones que pueden tener las condiciones de estrés hidrodinámico en los biorreactores, es el que las células no alcanzan la diferenciación celular que les permite producir los metabolitos de interés (Scragg, 1992). No obstante, no se ha reportado algún estudio que describa cómo las características morfológicas de los cultivos se relacionen con su fragilidad (Rodríguez-Monroy y Galindo 2003).

Aunque las células vegetales presentan una pared celular lignocelulósica, que puede proporcionarles cierta resistencia, en la literatura se ha generalizado la idea de que son sistemas frágiles a la agitación. Tal afirmación se fundamenta en la incapacidad de los cultivos para crecer en cultivo a velocidades de agitación similares a las usadas para crecer bacterias u hongos (Rodríguez-Monroy y Galindo 1999). Sin embargo, existen varias evidencias que sugieren que las células vegetales no son tan sensibles al estrés hidrodinámico de un biorreactor. Un ejemplo típico de la incertidumbre existente sobre la fragilidad de las células vegetales para crecer en tanques agitados es *Catharanthus roseus*, que es una especie vegetal que produce fármacos usados para tratamientos cardiovasculares, por lo tanto, es una de las especies que ha recibido amplio interés para crecer en fermentadores, y a la cual se ha reportado tanto como una especie resistente (Leckie et al. 1991; Meijer et al. 1993; Meijer et al. 1994), como muy sensible (Wagner y Vogelmann 1977). Diferentes autores han propuesto que bajo condiciones de cultivo *in vitro*, se favorece la selección de líneas celulares tolerantes a las condiciones de estrés hidrodinámico (Meijer et al. 1993; Meijer et al. 1994). Debe destacarse que existe una clara tendencia a reportar cada vez más especies que pueden crecer en biorreactores agitados. Ejemplos de ellos son los cultivos de *Nicotiana tabacum* (Ho et al. 1995), *Catharanthus roseus* (Leckie et al. 1991), *Morinda citrifolia* (Kieran et al. 1997), *Carthamus tinctorius* (Takeda et al. 1994), *Beta vulgaris* (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999) y *Solanum chrysotrichum* (Trejo-Tapia et al. 2001).

Células animales

El estudio de los daños ocasionados por el estrés hidrodinámico en células animales puede ser más complejo, ya que se reconocen dos mecanismos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis. La necrosis es el proceso de muerte celular que ocurre en forma inmediata ante un ambiente adverso para su crecimiento, mientras que la apoptosis podría definirse como un mecanismo programado de "suicidio" de las células ante condiciones desfavorables para su crecimiento, dándose en forma secuencial (Hu y Aunins 1997, Butler 2005). Así, el estrés hidrodinámico es causante de muerte, lisis celular y

apoptosis en cultivos sumergidos (Shiragami 1997; Al-Rubeai y Singh 1998; Chisti 2001; Nienow 2006). Sin embargo, se ha visto que este tipo de células toleran bien los esfuerzos cortantes por agitación (Smith et al. 1987; Petersen et al. 1988; Shiragami 1997; Nienow 2006). Al contrario del efecto por agitación, las células animales no presentan esa misma resistencia ante el fenómeno de estallido de una burbuja de aire en la superficie del medio de cultivo. En cultivos en los que las demandas de oxígeno han sido satisfechas, utilizando sistemas de cultivo libres de burbujas, se ha demostrado que las células animales son cultivadas con altos índices de viabilidad (Nienow 2006). Por ejemplo, células de hibridomas mantenidas en biorreactores de 2.0 L (sin interfase aire/líquido), y agitados con una turbina Rushton (alto número de potencia) a 1,500 rpm (equivalente a una energía de disipación de 4 W/kg) mantuvieron niveles de viabilidad mayores al 70% (Zhang y Thomas 1993). En contraste, en cultivos donde hay altos niveles de aireación por burbujeo, la energía disipada es sumamente alta, llevando a una muerte inmediata a las células que están cercanas a la zona de estallido (Garcia-Briones y Chalmers 1994). El daño causado por la explosión de las burbujas puede ser relacionado con la presión de Laplace (δP , N/m²), y descrita por la ecuación:

$$\delta P = \frac{4\sigma}{d_p} \quad (3)$$

Donde, σ es la tensión superficial del medio de cultivo (N/m) y d_p es el tamaño de la burbuja (m). Así, fácilmente se puede explicar porqué burbujas pequeñas pueden hacer más daño que burbujas grandes (Chalmers 1994; Chisti, 2001; Nienow et al. 2006). Se ha demostrado que sólo el evento de la ruptura de las burbujas puede llegar a ser el responsable de todo el daño celular en un cultivo (Trinh et al. 1994; Chalmers 1994; Chisti 2001). Cuando una burbuja explota en la superficie del medio de cultivo, se encuentra un 90% de muerte de un cultivo que tenía un 90% de viabilidad (Trinh et al. 1994; Chalmers 1994). Trinh et al. (1994) reportaron estos porcentajes de muerte inyectando de 200 a 600 burbujas con un intervalo de diámetro de 3.3 a 3.7 mm, y las cuales se rompían (una por una) en la superficie de pequeños volúmenes de medio de cultivo. Las células adheridas a la burbuja representan el 10.4% del total de células muertas, lo que propone que existe un "volumen hipotético de muerte" de aproximadamente 0.2% del volumen total de la burbuja (Trinh et al. 1994).

La mayoría de los trabajos en todos los modelos biológicos han sido principalmente encaminados en cono-

cer y entender los factores hidrodinámicos que determinan el daño celular, pero muy pocos trabajos han tratado de entender los mecanismos por los cuales se da la muerte del ente biológico. Al-Rubeai y Singh. (1998), usando hibridomas demostró que las células responden al estrés hidrodinámico bajo dos mecanismos diferentes. El primero es el de ruptura completa por fragmentación debido a altas fuerzas, y la segunda cuando hay daños sub-letales, la célula responde con mecanismos de reparación, que al no resistir y no poder repararla completamente se presenta una respuesta apoptótica (Al-Rubeai y Singh 1998). Además demostraron que dentro del ciclo celular, el intervalo G1 los hibridomas son más resistente al estrés que en los estadios G2 y S, esto debido al pequeño tamaño que tienen las células en el estado G1. Los autores reportaron que aunque a alto estrés la concentración celular decrece apreciablemente, la viabilidad permanece constante, lo que puede indicar que la velocidad de destrucción es igual a la velocidad a la que las células se convierten en no viables (Al-Rubeai y Singh. 1998).

En la literatura han aparecido diseños de biorreactores para tratar de evitar los efectos de los daños asociados al esfuerzo de corte y la aireación por burbujeo. Guderman et al (1994) plantean un diseño de un biorreactor de enjambre de burbujas para células mamarias, y donde la estrategia es inyectar burbujas de oxígeno puro en un reactor, de tal forma que el tiempo de residencia de las burbujas de oxígeno permita que el coeficiente de transporte del gas evite la formación de espuma, es decir, que ninguna burbuja toque la superficie del líquido y desaparezcan en el seno del medio. Otros intentos más actuales han sido en biorreactores en condiciones de microgravedad (Goodwin et al. 1993; Jessup et al. 1993; Lewis et al. 1993; Freed et al. 1999; Konstantinov et al. 2004) y finalmente, los de olas en bolsas desechables o “wave bioreactors cellbag” (Kretzmer 2002; Singh 2006), así como también los denominados “wavy-walled” (Bilgen et al. 2005).

COROLARIO

Hasta ahora hemos planteado que, en gran medida, el daño causado por el estrés hidrodinámico es debido a la interacción *eddie*-célula, pero también existen otros dos mecanismos de daño celular que son los choques partícula-partícula y partícula-biorreactor (impulsores, mamparas, electrodos y paredes), que en algunos sistemas son de gran impacto. Por ejemplo, en el cultivo de células animales en microacarreadores, el choque partícula-partícula es de suma importancia (Cherry y Papoutsakis, 1988; Gregorides et al. 2000).

Finalmente, el modelo propuesto por Thomas (1990) y Prokov y Bajpai (1992), usando la teoría de turbulencia de Kolmogorov (1941, 1962), explica en su mayoría los efectos letales en los sistemas biológicos aquí descritos en cultivos sumergidos en biorreactores agitados. Sin embargo, en el caso de explicar los efectos sub-letales, se debe recurrir a los sistemas de respuesta celular de otros tipos de estrés, como por ejemplo los reportes de *Bacillus subtilis* donde la cascada de respuesta a estrés oxidativo puede cumplir un papel determinante como respuesta a estrés hidrodinámico (Sahoo et al. 2003; Sahoo et al. 2004; Sahoo et al. 2006).

REFERENCIAS

- Alexopoulos AH, Maggioris D, Kiparissides C. 2002. CFD analysis of turbulence non-homogeneity in mixing vessels. A two-compartment model. *Chem Eng Sci.* 5: 1735-1752.
- Alferman A, Paterson M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 43: 199-205.
- Al-Rubeai M, Singh RP. 1998. Apoptosis in cell culture. *Curr Opin Biotechnol.* 9(2): 152-156.
- Ayazi Shamlou P, Makagiansar HY, Ison AP, Lilly MD. 1994. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem Eng Sci.* 49: 2621-2631.
- Bakker A, Fasano J, Leng D. 1994. Pinpoint mixing problems with lasers and simulation software. *Chem Eng* 101(1): 94-100.
- Bakker A, Oshinowo LM, Marshall EM. 2000. The Use of Large Eddy Simulation to Study Stirred Vessel Hydrodynamics. Proceedings of the 10th European Conference on Mixing, Delft, The Netherlands, July 2-5, 2000, page 247-254.
- Bakker A. 2003. The Colorful Fluid Mixing Gallery, <http://www.bakker.org/cfm>.
- Bayles KW. 2003. Are the molecular strategies that control apoptosis conserved in bacteria?. *Trends Microbiol.* 11: 306-311.
- Bennet CO, Myers JE. 1962. Momentum, heat and mass transfer. McGraw Hill, Inc. pg 15-23.
- Bilgen B, Chang-Mateu IM, Barabino GA. 2005. Characterization of mixing in a novel wavy-walled bioreactor for tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.* 92(7): 907-919.
- Blewett J, Burrows K, Thomas C. 2000. A micromanipulation method to measure the mechanical properties of single tomato suspension cells. *Biotechnol Lett.* 22: 1877-1883.
- Bowen R. 1986. Unraveling the mysteries of shear-sensitive mixing systems. *Chem. Eng.* June 9, 55-63.
- Boysan F, Cliffe KR, Leckie F, Scragg AS. 1988. The growth of *Catharanthus roseus* in stirred tank bioreactors. Proc. 2nd. Int. Conf. on Bioreactors Fluid Dynamics. Elsevier Applied Science Publishers. London and New York, p. 245-258.
- Brakemeier S, Eichler I, Hopp H, Kohler R, Hoyer J. 2002. Up-regulation of endothelial stretch-activated cation channels by fluid shear stress. *Cardiovasc Res.* 53(1): 209-218.
- Brunskill EW, Bayles KW. 1996. Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 178(3): 611-618.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng.* 68(6): 589-593.

17. Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000b. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng.* 68(6): 594-601.
18. Büchs J, Zoels B. 2001. Evaluation of the ratio of the maximum to specific power consumption in shaking bioreactors. *Proceedings of the Third International Symposium on Mixing in Industrial Processes, J Chem Eng Jpn.* 34 (5): 647-653.
19. Butler M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68(3): 283-291.
20. Chalmers JJ. 1994. Cells and bubbles in sparged bioreactors. *Cytotechnol.* 15(1-3): 311-320.
21. Chen KD, Li YS, Kim M, Li S, Yuan S, Chien S, Shyy JY. 1999. Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem.* 274(26): 18393-18400.
22. Cherry RS, Papoutsakis ET. 1988. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 32: 1001-1014.
23. Chisti Y. 2001. Hydrodynamic damage to animal cells. *Crit Rev Biotechnol.* 21(2): 67-110.
24. Cui YQ, van der Lans EGJM, Luyben KCAM. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 55(5): 715-726.
25. Davidson KM, Sushil S, Eggleton CD, Marten MR. 2003. Using computational fluid dynamics software to estimate circulation time distributions in bioreactors. *Biotechnol Prog.* 19(5): 1480-1486.
26. Dunlop E, Namdev P. 1993. Effect of fluid forces on plant cell suspension. *Proc. 3rd Int. Conf. on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics, Nienow, A. (Ed.) Mechanical Eng. Pub. Ltd. London, pg. 447-455.*
27. Freed LE, Pellis N, Searby N, de Luis J, Preda C, Bordonaro J, Vunjak-Novakovic G. 1999. Microgravity cultivation of cells and tissues. *Gravit Space Biol Bull.* 12(2): 57-66.
28. García-Briones M, Chalmers JJ. 1994. Flow parameters associated with hydrodynamic cell injury. *Biotechnol Bioeng.* 44: 1089-1098.
29. Gautam S, Sharma A. 2002. Involvement of caspase-3-like protein in rapid cell death of *Xanthomonas*. *Mol Microbiol.* 44: 393-401.
30. Gibbs PA, Seviour RJ, Schmid F. 2000. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Crit Rev Biotechnol.* 20 (1): 17-48.
31. Goodwin TJ, Prewett TC, Wolf DA, Spaulding GF. 1993. Reduced shear stress: a major component in the ability of mammalian tissues to form three dimensional assemblies in simulated microgravity. *J Cell Biochem.* 51: 301-311.
32. Gregorades N, Clay J, Ma N, Koelling K, Chalmers JJ. 2000. Cell damage of microcarrier cultures as a function of local energy dissipation created by a rapid extensional flow. *Biotechnol Bioeng.* 69: 171-182.
33. Gudermann F, Lütkemeyer D, Lehmann J. 1994. Design of a bubble-swarm bioreactor for animal cell culture. *Cytotechnol.* 15: 301-309.
34. Han RB, Yuan YJ. 2004. Oxidative burst in suspension culture of *Taxus cuspidata* induced by a laminar shear stress in short-term. *Biotechnol Prog.* 20(2): 507-513.
35. Heidrich C, Templin MF, Ursinus A, Merdanovic M, Berger J, Schwarz H, dePedro MA, Holtje JV. 2001. Involvement of N-acetyl muramyl-l-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 41: 167-178.
36. Henzler HJ. 2000. Particle stress in bioreactors. In: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* T. Scheper (Ed.) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, p. 35-82.
37. Hewitt CJ, Boon LA, McFarlane CM, Nienow AW. 1998. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 59: 612-620.
38. Ho C, Henderson K, Rorrer G. 1995. Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnol Prog.* 11: 140-145.
39. Hochman A. 1997. Programmed cell death in prokaryotes. *Crit Rev Microbiol.* 23: 207-214.
40. Hong D, Jaron D, Buerk DG, Barbee KA. 2006. Heterogeneous response of microvascular endothelial cells to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(6): 2498-2508.
41. Hu WS, Aunins JG. 1997. Large-scale mammalian cell culture. *Curr Opin Biotechnol.* 8(2): 148-153.
42. Jessup JM, Goodwin TJ, Spaulding GF. 1993. Prospects for use of microgravity-based bioreactors to study three-dimensional host tumor interactions in human neoplasia. *J Cell Biochem.* 51: 290-300.
43. Jolliffe LK, Doyle RJ, Streips UN. 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* 25:753-763.
44. Joshi J, Elias C, Patole M. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Biochem Eng J.* 62: 121-141.
45. Jüsten P, Paul CG, Nienow AW, Thomas CR. 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng.* 52(6): 672-684.
46. Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM. 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J Biotechnol.* 59(1-2): 39-52.
47. Kieran PM, Malone DM, MacLoughlin PF. 2000. Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 67: 139-177.
48. Kolmogorov AN. 1941. The local structure of turbulence in incompressible viscous fluid for very large Reynolds numbers. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 30. Translated by V. Levin. Reprinted in *Proc. R. Soc. Lond A* 434, 9-13. 1991.
49. Kolmogorov AN. 1962. A refinement of previous hypotheses concerning the local structure of turbulence in viscous incompressible fluid at high Reynolds number. *J. Fluid Mech.* 13: 82.
50. Konstantinov SM, Mindova MM, Gospodinov PT, Genova PI. 2004. Three-dimensional bioreactor cultures: a useful dynamic model for the study of cellular interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1030: 103-115.
51. Kretzmer G. 2002. Industrial processes with animal cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59 (2-3): 135-142.
52. Lawford H, Rousseau J. 1991. Bioreactor design considerations in the production of high-quality microbial exopolysaccharide. *App Biochem Biotechnol.* 28/29: 667-684.
53. Leckie F, Scraggs H, Cliffe K. 1991. Effect of impeller design and speed on the large-scale cultivation of suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Enzyme Microb Technol.* 13: 801-810.
54. Lewis M, Moriarit DM, Campbell PS. 1993. Use of microgravity bioreactors for development of an *in vitro* rat salivary gland cell culture model. *J Cell Biochem.* 61: 265-273.
55. Lloyd D, Hayes AJ. 1995. Vigor, vitality and viability of microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 133: 1-7.
56. Lucatero S, Larralde-Corona CP, Corkidi G, Galindo E. 2003. Oil and air dispersion in a simulated fermentation broth as a function of mycelial morphology. *Biotechnol Prog.* 19 (2): 285-292.
57. Maier U, Büchs J. 2001. Characterization of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem Eng J.* 7(2): 99-106.

58. Makagiansar HY, Ayazi Shamlou P, Thomas CR, Lilly MD. 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. Bioproc Eng. 9: 83-90.
59. Märkl H, Bronnenmeier R, Wittek B. 1991. The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. Int Chem Eng. 31(2): 185-196.
60. Meijer JJ, Ten Hoopen HJG, Luyben KCAM, Libbenga KR. 1993. Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: A literature survey. Enzyme Microb Technol. 15: 234-238.
61. Meijer JJ, ten Hoopen HJG, van Gameren YM, Lyuben KCAM, Libbenga KR. 1994. Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. Enzyme Microb Technol. 16: 467-477.
62. Meneses-Acosta A, Mendoça RZ, Merchant H, Covarrubias L, Ramírez OT. 2001. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. Biotechnol Bioeng. 72: 441-457.
63. Nguyen B, Upadhyaya A, van Oudenaarden A, Brenner MP. 2004. Elastic instability in growing yeast colonies. Biophys J. 86(5): 2740-2747.
64. Nienow AW. 1998. Hydrodynamics of stirred bioreactors. In: Pohorecki R (ed) Fluid mechanics problems in biotechnology. App Mech Rev. 51:3-32.
65. Nienow AW. 2006. Reactor engineering in large scale animal cell culture. Cytotechnol. DOI 10.1007/s10616-006-9005-8.
66. Ogston AG, Stanier JE. 1953. A Couette viscosimeter. Biochem J. 503: 4-10.
67. Oldshue JY. 1983. Fluid Mixing Technology, Chemical Engineering, MacGraw-Hill Pub. Co. New York, N.Y. p. 574.
68. Peña C, Galindo E. 2002. Las condiciones de cultivo determinan las características moleculares de los polisacáridos microbianos. Biotecnología. 7 (3): 22-38.
69. Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E. 2000 Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. Enzyme Microb Technol. 27: 390-398.
70. Peter CP, Suzuki Y, Büchs J. 2006. Hydromechanical stress in shake flasks: Correlation for the maximum local energy dissipation rate. Biotechnol Bioeng. 93(6): 1164-1176.
71. Petersen JF, McIntire LV, Papoutsakis ET. 1988. Shear sensitivity of cultured hybridoma cells (CRL-8018) depends on mode of growth, culture age and metabolite concentration. J Biotechnol. 7: 229-246.
72. Priede MA, Vanags JJ, Viesturs UE, Tucker KG, Bujalski W, Thomas CR. 1995. Hydrodynamic, physiological, and morphological characteristics of *Fusarium moniliforme* in geometrically dissimilar stirred bioreactors. Biotech Bioeng. 48: 266-277.
73. Prokop A, Bajpai R. 1992. The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. Advances Appl Microbiol. 37: 165-232.
74. Richardson LF. 1922. Weather prediction by numerical process. Cambridge University Press, Cambridge.
75. Riley GL, Tucker KG, Paul GC, Thomas CR. 2000. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. Biotechnol Bioeng. 68(2): 160-172.
76. Rocha-Valadez JA, Hassan M, Corkidi G, Flores C, Galindo E, Serrano-Carreón L. 2005. 6-pentyl-alpha-pyrone production by *Trichoderma harzianum*: the influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. Biotechnol Bioeng. 91(1): 54-61.
77. 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 Microb. Technol. 24: 687-693.
78. Rodríguez-Monroy M, Galindo E. 2003. Las células vegetales. ¿Frágiles para crecer en biorreactores?. Biotecnología. 8 (2): 6-17.
79. Sahoo S, Rao KK, Suraishkumar GK. 2006. Reactive oxygen species induced by shear stress mediate cell death in *Bacillus subtilis*. Biotechnol Bioeng. 94(1): 118-127.
80. Sahoo S, Rao KK, Suresh AK, Suraishkumar GK. 2004. Intracellular reactive oxygen species mediate suppression of sporulation in *Bacillus subtilis* under shear stress. Biotechnol Bioeng. 87(1): 81-89.
81. Sahoo S, Verma RK, Suresh AK, Rao KK, Bellare J, Suraishkumar GK. 2003. Macro-level and genetic-level responses of *Bacillus subtilis* to shear stress. Biotechnol Prog. 19 (6): 1689-1696.
82. Scragg A. 1992. Large-scale plant cell culture: methods, applications and products. Current Opinion Biotechnol 3: 105-109.
83. Shi ZD, Yuan YJ, Wu JC, Shang GM. 2003. Biological responses of suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* to shear stresses in the short term. Appl Biochem Biotechnol. 110 (2): 61-74.
84. Shiragami N. 1997. Effect of shear rate on hybridoma cell metabolism. Bioprocess Eng. 16: 345-347.
85. Singh V. 2006. Wave Biotech LCC. <http://www.wavebiotech.com/>.
86. Smith AE, Zhang Z, Thomas CR, Moxham KE, Middelberg AP. 2000. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 97(18): 9871-9874.
87. Smith CG, Greenfield PF, Randerson DH. 1987. A technique for determining the shear sensitivity of mammalian cells in suspension culture. Biotechnol Tech. 1: 39-44.
88. Smith JJ, Lilly MD, Fox RI. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. Biotechnol Bioeng. 35: 1011-1023.
89. Takeda T, Seki M, Furusaki S. 1994. Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. J Chem Eng Jpn. 27(4): 466-471.
90. Taticek R, Moo Young M, Legge L. 1991. The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. Plant Cell Tissue Culture 24: 139-158.
91. Thomas C. 1990. Problems of shear in biotechnology. In: Chem. Eng. Problems Biotechnol. Winkler M. (Ed.), Elsevier Sci. Pub., England, p. 25-93.
92. Thomas CR, al-Rubeai M, Zhang Z. 1994. Prediction of mechanical damage to animal cells in turbulence. Cytotechnol. 15(1-3): 329-335.
93. Thomas CR, Zhang Z. 1998. The effects of hydrodynamics on biological materials. In: Adv. Bioprocess Eng. II. Galindo E. and Ramírez OT. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, p 137-170.
94. Topete M, Torres L, Ramírez M, Herrera M, Galindo E. 1991. Avances en los sistemas de cultivo masivo de células vegetales. Ciencia y Desarrollo 17(99): 73-85.
95. Trejo-Tapia G, Jiménez-Aparicio A, Villarreal M, Rodriguez-Monroy M. 2001. Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. Biotechnol Lett. (23): 1943-1946.
96. Trinh K, García-Briones M, Hink F, Chalmers JJ. 1994. Quantification of damage to suspended insect cells as a result of bubble rupture. Biotechnol Bioeng. 43: 37-45.
97. Trujillo-Roldán MA, Galindo E. 2003. El estrés hidrodinámico en cultivos celulares. Biotecnología. 8: 7-22.
98. Van Suijdam JC, Metz B. 1981. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. Biotechnol Bioeng. 23: 111-148.
99. Wagner F, Vogelmann H. 1977. in plant tissue and its biotechnological applications. Barz W, Reinhard E, Zenk MH. (eds), 245.

100. Wang CX, Wang L, Thomas CR. 2004. Modelling the mechanical properties of single suspension-cultured tomato cells. *Ann Bot (Lond)*. 93(4): 443-453.
101. Wecker A, Onken U. 1991. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett*. 13: 155-160.
102. White S, McIntyre M, Berry DR, McNeil B. 2002. The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol*. 22(1): 1-14.
103. Wittler R, Baumgartl H, Lübbbers DW, Schügerl K. 1986. Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *Biotechnol Bioeng*. 28: 1024-1036.
104. Wu J, Ge X. 2004. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. *Biotechnol Bioeng*. 85(7): 714-721.
105. Zhang Z, Blewett JM, Thomas CR. 1999. Modelling the effect of osmolality on the bursting strength of yeast cells. *J Biotechnol*. 71(1-3): 17-24.
106. Zhang Z, Ferenczi MA, Lush AC, Thomas CR. 1991. A novel micromanipulation technique for measuring the bursting strength of single mammalian cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 36(2): 208-210.
107. Zhang Z, Thomas CR. 1993. Modelling of animal cell damage in turbulent flows. In: Nienow AW (ed) Proc 3rd int conf on bioreactor and bioprocess fluid dynamics. Mechanical Engineering Publications Ltd., London, pp 475-482. ISBN 0 85298 873 7.
108. Zhang H, Williams-Dalson W, Keshavarz-Moore E, Shamlou PA. 2005. Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biotechnol Appl Biochem*. 41(Pt 1):1-8.
109. Zhong J, Yu J, Yoshida T. 1995. Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. *World J Microbiol. Biotechnol*. 11: 461-467.

Correspondencia:

Mauricio A. Trujillo-Roldán
PROBIOMED S.A. de C.V.
Av. Ejército Nacional Núm. 499,
Col. Granada, Deleg. Miguel Hidalgo,
11520, México D.F., México
Tels. 2581-1900, Fax: 5255-2474
E-mail: maurotru@gmail.com,
mauricio.trujillo@probiomed.com.mx