



EFFECTO DE LA OFERTA DE OXÍGENO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE TERPENOIDES CON CÉLULAS DE *Azadirachta indica* EN UN BIORREACTOR.

Fernando Orozco Sánchez, 2009

RESUMEN

El presente trabajo analiza el efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) sobre el crecimiento, la producción de terpenoides y la velocidad específica de consumo de oxígeno (OUR), en células en suspensión de *Azadirachta indica* A. Juss. Esta especie produce alrededor de doscientos terpenoides, algunos con aplicaciones insecticidas y terapéuticas. En un cultivo de células de *A. indica* en un biorreactor de tanque agitado se identificaron triterpenos y terpenoides entre ellos el estigmasterol, el sitosterol y el limonoide, azadiractina. Con los análisis de cromatografía líquida – espectrometría de masas de algunas fracciones, se puede sugerir que también se produjeron otros limonoides, algunos de ellos intermediarios en la vía de biosíntesis de la azadiractina o con estructuras complejas y altamente oxidadas, como los compuestos de los grupos de limonoides con anillo hemiacetal, vilasinina, salanina, azadiractol, azadiractinina y azadiractina. En matraces Erlenmeyer se observó que el tipo de tapón tuvo un efecto sobre la viabilidad celular, el pH del medio y el tamaño de los aglomerados, los cuales disminuyeron significativamente usando papel aluminio. Esta disminución no se observó en matraces con tapones de algodón y espuma de silicona. El análisis de la OTR máxima (OTR_{max}) indicó que el oxígeno suministrado con papel aluminio (0.07 kg O₂ m⁻³ día⁻¹), fue insuficiente para satisfacer la OUR de las células de *A. indica* (0.100 kg O₂ kg CS⁻¹ día⁻¹). Sin embargo, esta situación no se presenta en cultivos de otras especies como *Beta vulgaris* L. y *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C., las cuales pueden crecer por un largo periodo de tiempo en matraces con aluminio, pues consumen 0.25 veces el oxígeno correspondiente a *A. indica*. Se realizaron pruebas de crecimiento de los cultivos de *A. indica* en un biorreactor de tanque agitado, probando diferentes valores de OTR_{max} (0.92, 1.70 y 6.21 kg O₂ m⁻³ día⁻¹) por medio del tipo de difusor de aire y la concentración de oxígeno del gas 2 de entrada. El análisis de los resultados obtenidos en biorreactor tipo tanque agitado y matraz Erlenmeyer, muestra que se presentó un máximo para la producción de biomasa viable en 0.92 kg O₂ m⁻³ día⁻¹, mientras que se halló una relación lineal entre la producción de compuestos relacionados con la azadiractina y la OTR_{max}. Entre valores de 0.92 y 6.21 kg O₂ m⁻³ día⁻¹ se observó un aumento en el consumo de oxígeno de casi tres veces por parte de las células. Mediante los números adimensionales, Damköhler (Da) y factor de efectividad de consumo de oxígeno (n), se identificaron condiciones de operación en las cuales el bioproceso se limitó por la transferencia



EFFECTO DE LA OFERTA DE OXÍGENO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE TERPENOIDES CON CÉLULAS DE *Azadirachta indica* EN UN BIORREACTOR.

Fernando Orozco Sánchez, 2009

de masa (OTR_{max} 0.07 kg O₂ m⁻³ día⁻¹), otras condiciones donde la velocidad de transferencia de masa (OTR_{max} 0.92 kg O₂ m⁻³ día⁻¹) fue comparable con la velocidad de las reacciones bioquímicas de consumo de oxígeno y se obtuvo un buen crecimiento celular, y otras condiciones en las que el bioproceso no se limitó por la transferencia de masa (OTR_{max} > 1.70 kg O₂ m⁻³ día⁻¹) que favorecen la producción de azadiractinas pero disminuye la producción de biomasa viable. El análisis presentado en este trabajo para *A. indica* y basado en números adimensionales, puede ser una herramienta para comprender los fenómenos de transferencia de masa, de consumo de oxígeno y sus relaciones. Este análisis podría aplicarse en otras líneas celulares (de la misma u otra especie vegetal) en un proceso de escalado y definir las correspondientes condiciones de Da y n adecuadas para la producción de biomasa y de metabolitos secundarios.

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze effects of oxygen transfer rate (OTR) on cell growth, terpenoids production and oxygen uptake rate, in *Azadirachta indica* A. Juss cell culture. This species produces almost two hundred terpenoids, some of them with insecticide and therapeutic activities. *A. indica* cell culture growing in a bioreactor produced triterpens and terpenoids such as: stigmasterol, sitosterol and azadirachtin. The HPLC-MS results suggest that possibly other limonoids were also produced, some of them intermediates of azadirachtin biosynthesis pathway or compounds with complex or highly oxygenated structures. These compounds could belong to the following limonoids groups: hemiacetal ring limonoids, vilasinin, salanin, azadirachtol, azadirachtinin and azadirachtin. It was observed that the plug type in shake flasks affected the cell viability, médium pH and agglomerates size and those parameters strongly decreased using aluminum foil. This decrease was not observed in flasks covered with cotton and silicone foam. The analysis of maximum oxygen transfer rate (OTR_{max}) indicated that oxygen supplied with aluminum paper (0.07 kg O₂ m⁻³ day⁻¹), was insufficient to satisfy the oxygen uptake rate (OUR) of the cells (0.100 kg O₂ kg DW⁻¹ day⁻¹). This situation was not observed with other species as *Beta vulgaris* L. and *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C., which can grow for a long time under these conditions because they consume 0.25 times the oxygen corresponding to *A.*



EFFECTO DE LA OFERTA DE OXÍGENO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE TERPENOIDES CON CÉLULAS DE *Azadirachta indica* EN UN BIORREACTOR.

Fernando Orozco Sánchez, 2009

indica. Evaluations of *A. indica* cell growth in one stirred tank bioreactor was done, using different levels of OTR_{max} (0.92, 1.70 and 6.21 kg O₂ m⁻³ day⁻¹) varying the operation conditions by means of sparger kind and oxygen concentration in gas flow. The analysis of obtained results in stirred tank bioreactor and shaking flask shows that a maximum for viable biomass production in 0.92 kg O₂ m⁻³ day⁻¹ was presented, while a linear relationship between compounds related with azadiractin and OTR_{max} was 4 found. OUR was increased between 0.92 and 6.21 kg O₂ m⁻³ day⁻¹ almost three times. Damköhler (Da) and effectiveness factor of oxygen consumption (n) adimensional numbers were used to identify operational conditions in which the bioprocess should be limited by mass transfer (OTR_{max} 0.07 kg O₂ m⁻³ day⁻¹); conditions where the mass transfer rate was comparable to the rate of biochemical reactions of oxygen consumption (OTR_{max} 0.92 kg O₂ m⁻³ day⁻¹) obtaining a satisfactory cell growth; and conditions (OTR_{max} > 1.70 kg O₂ m⁻³ day⁻¹) where the bioprocess was not limited by mass transfer and production of viable biomass was inefficient, although azadirachtins production was increased. The analysis presented in this work with *A. indica* based in the use of adimensional numbers, may be a tool to understand the phenomena of mass transfer, oxygen consumption and their relationships. That analysis could be applied for other cell lines belonging to *A. indica* or other species in a scale up process, to define appropriate values of Da and n, for biomass and secondary metabolites production.