

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

**CULTIVO DE CÉLULAS DE *Jacaratia mexicana* EN  
UN BIORREACTOR AIRLIFT: EFECTO DE UN  
INDUCTOR Y UN ELICITOR EN LA PRODUCCIÓN  
DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOPROCESOS**

**PRESENTA:**

**IBT ILIANA DEL CARMEN BARRERA MARTÍNEZ**

**DIRECTORA: DRA. MA. DEL CARMEN OLIVER SALVADOR**

**México D.F., enero de 2007**

*A Max, Tona, Viris, Enrique  
mis padres y mis abuelos.*



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

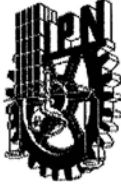
**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 2 del mes de Febrero del año 2007, el (la) que suscribe Barrera Martínez Iliana del Carmen alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprosos con número de registro B040712, adscrito a Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Oliver Salvador y cede los derechos del trabajo intitulado “Cultivo de células de *Jacaratia Mexicana* en un biorreactor airlift: efecto de un inductor y un elicitor en la producción de enzimas proteolíticas”, 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 [ilianabarrera@hotmail.com](mailto:ilianabarrera@hotmail.com), [oliveripn@yahoo.com.mx](mailto:oliveripn@yahoo.com.mx) . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Iliana del Carmen Barrera Martínez

Nombre y firma



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de México siendo las 13:30 horas del día 10 del mes de enero del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis de grado titulada:

"Cultivo de células de Jacarattia mexicana en un biorreactor airlift: efecto de un inductor y un elicitor en la producción de enzimas proteolíticas"

presentada por la alumna:

Barrera  
Apellido paterno

Martínez  
materno

Iliana del Carmen  
nombre

Con registro: 

B	0	4	0	7	1	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de: Maestro en Ciencias en Bioprocesos

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

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

Dra. María del Carmen Oliver Salvador

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia

Dr. Enrique Durán Páramo

M. en C. Gerónimo Peña Climaco

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

EL PRESIDENTE DEL

Dr. Edgar Salgado Manríquez

**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**UNIDAD PROFESIONAL**  
**INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**  
**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACION**

## **Agradecimientos**

Dra. María del Carmen Oliver Salvador

Dra. Thelma Villegas Garrido, por autorizar el uso del prototipo del biorreactor airlift. Tesis de Maestría de Luís Guillermo Presuel Moreno (2000)

A mi comité tutorial: Dr. Juan S. Aranda Barradas y M. en C. Gerónimo Peña Climaco

**El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Biotecnología del Departamento de Bioprocesos de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.**

**Este trabajo se realizó con el apoyo del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI), proyectos registro CGPI 2004175, CGPI 20050149 y SIP 20060388.**

# CONTENIDO

RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	3
1 INTRODUCCIÓN .....	4
1.1 Antecedentes del cultivo in vitro de plantas .....	4
1.2 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV) .....	6
1.2.1 Auxinas .....	7
1.2.2 Citocininas .....	9
1.3 Importancia del cultivo de células vegetales .....	10
1.4 Antecedentes de cultivos in vitro de plantas para producción de enzimas .....	11
1.5 Inductores .....	12
1.6 Elicitores .....	13
1.7 Importancia comercial de las enzimas proteolíticas .....	14
1.8 Enzimas proteolíticas de origen vegetal .....	15
1.9 Clasificación de las enzimas proteolíticas .....	16
1.10 Proteasas de plantas mexicanas .....	17
1.11 <i>Jacaratia mexicana</i> .....	17
1.12 La mexicanaína .....	18
1.13 Antecedentes del cultivo in vitro de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	19
1.14 Desarrollo de procesos basados en cultivos de células vegetales .....	20
1.15 Importancia del estudio del desempeño del biorreactor airlift .....	23
2 JUSTIFICACIÓN .....	24
2.1 Hipótesis .....	25
3 OBJETIVOS .....	26
3.1 Objetivo general .....	26
3.2 Objetivos particulares .....	26
4 MATERIALES .....	27
4.1 Material biológico .....	27
4.2 Materiales .....	27
4.3 Equipos .....	27

4.4	Reactivos .....	28
5	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	30
6	METODOLOGÍA .....	32
6.1	Desinfección de semillas de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	32
6.2	Germinación de las semillas .....	32
6.3	Obtención de callos.....	32
6.4	Determinación de la actividad proteolítica en el medio semisólido .....	33
6.5	Determinación de la tasa de crecimiento de los callos en medio semisólido.....	34
6.6	Determinación de actividad proteolítica en los cultivos de células en suspensión.....	34
6.7	Determinación de biomasa en los cultivos de células en suspensión .....	35
6.8	Determinación de la viabilidad de las células de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	35
6.9	Determinación de proteína en medios en suspensión .....	36
6.10	Determinación de consumo de la fuente de carbono en los cultivos celulares de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	36
6.11	Estudio del efecto de inductores en la producción de enzimas proteolíticas de <i>Jacaratia mexicana</i> a nivel matraz .....	36
6.12	Estudio del efecto de un elicitador en la producción de enzimas proteolíticas en cultivos celulares de <i>Jacaratia mexicana</i> a nivel matraz.....	37
6.12.1	Preparación del elicitador. ....	37
6.12.2	Determinación de la concentración de elicitador .....	38
6.12.3	Preparación del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en suspensión .....	38
6.13	Cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en biorreactor con el inductor .....	39
6.13.1	Preparación del inóculo con inductor para cultivo en biorreactor.....	39
6.13.2	Condiciones de cultivo en el biorreactor con el inductor.....	39
6.14	Cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en biorreactor, efecto de un elicitador .....	40
6.14.1	Preparación del inóculo con elicitador para cultivo en biorreactor .....	40
6.14.2	Condiciones de cultivo en el biorreactor con el elicitador .....	40



6.15	Caracterización preliminar de la(s) proteasa(s) obtenidas en cultivos in vitro .....	41
6.15.1	Purificación por cromatografía de intercambio catiónico.....	41
6.15.2	Determinación del peso molecular de las proteasas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	42
6.16	Evaluación del desempeño del biorreactor airlift.....	43
6.16.1	Determinación del tiempo de mezclado por método de adición de pulsos.....	43
6.16.2	Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $k_La$ por el método dinámico .....	43
6.17	Estimado de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de los cultivos celulares de <i>Jacaratia mexicana</i> en el biorreactor airlift .....	44
7	RESULTADOS.....	45
7.1	Elección del medio de cultivo para la inducción de callos de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	45
7.2	Estudio del efecto de un inductor a nivel matraz.....	47
7.3	Preparación del inóculo con inductor para cultivo en biorreactor .....	50
7.4	Cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en un biorreactor con el inductor. ....	53
7.5	Estudio del efecto de un elicitor de <i>A. niger</i> a nivel matraz.....	55
7.6	Inóculo con elicitor para el cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en biorreactor.....	58
7.7	Cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en un biorreactor con el elicitor ...	61
7.8	Estimación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de los cultivos celulares de <i>Jacaratia mexicana</i> en el biorreactor airlift .....	64
7.9	Evaluación del desempeño del biorreactor .....	65
7.9.1	Tiempo de mezclado.....	65
7.9.2	Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	65
7.10	Caracterización de la(s) proteasa(s) obtenidas en cultivos in vitro .....	67
7.10.1	Determinación de peso molecular de las proteasas de los medios de cultivo donde crecieron las células de <i>Jacaratia mexicana</i> por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	67

7.10.2	Purificación por cromatografía de intercambio catiónico.....	68
8	DISCUSIÓN .....	70
9	CONCLUSIONES .....	75
10	PERSPECTIVAS .....	77
11	REFERENCIAS .....	78
12	ANEXO .....	84

## Indice de Figuras

Figura 1. Planta de <i>Jacaratia mexicana</i> con frutos.....	18
Figura 2. Frutos de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	19
Figura 3. Diagrama de bloques del desarrollo experimental .....	31
Figura 4. Efecto del 2,4-D en la tasa de crecimiento de callos crecidos en las diferentes formulaciones del medio MS: MS1, MS5 y MS9. ....	46
Figura 5. Efecto de la concentración del 2,4-D en la actividad proteolítica en cultivo de callos de <i>Jacaratia mexicana</i> con diferentes formulaciones del medio MS: MS1, MS5 y MS9.....	47
Figura 6. Efecto del hidrolizado de caseína (inductor) en la actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo donde crecieron las célula de <i>Jacaratia mexicana</i> ; (■) 0.05%, (▲) 0.1% y (◆) control, nivel matraz. ....	48
Figura 7. Efecto del hidrolizado de caseína (inductor) en el desarrollo del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en suspensión; (■) 0.05%, (▲) 0.1% y (◆) sin inductor, nivel matraz. ....	49
Figura 8. Efecto del hidrolizado de caseína (inductor) en el desarrollo del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en suspensión presentado en escala logarítmica; (■) 0.05%, (▲) 0.1% y (◆) sin inductor, nivel matraz.....	50
Figura 9. Actividad proteolítica del medio de cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor).....	51
Figura 10. Desarrollo de la biomasa del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> (inóculo) con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor). ....	51
Figura 11. Consumo de sacarosa del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> (inóculo) con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor). ....	52
Figura 12. Determinación de proteína del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor). ....	53
Figura 13. Actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de <i>Jacaratia mexicana</i> en un biorreactor airlift con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor). ....	54

Figura 14. Crecimiento celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en un biorreactor airlift con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor). .....	54
Figura 15. Efecto del extracto de <i>A. niger</i> (elicitador) en la actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo donde crecieron células de <i>Jacaratia mexicana</i> ; (♦) 0 mg/L, (■) 25 mg/L, (▲) 50 mg/L, (×) 75 mg/L. ....	56
Figura 16. Efecto del extracto de <i>A. niger</i> (elicitador) en el desarrollo del cultivo celular en suspensión de <i>Jacaratia mexicana</i> ; (♦) 0 mg/L, (■) 25 mg/L, (▲) 50 mg/L, (×) 75 mg/L.....	57
Figura 17. Efecto del extracto de <i>A. niger</i> (elicitador) en la síntesis de proteína del cultivo en suspensión de <i>Jacaratia mexicana</i> determinada en el medio de cultivo; (♦) 0 mg/L, (■) 25 mg/L, (▲) 50 mg/L, (×) 75 mg/L.....	58
Figura 18. Actividad proteolítica del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> con 25 mg/mL de extracto de <i>A. niger</i> (elicitador) determinada en el medio de cultivo. ....	59
Figura 19. Determinación de proteína en el medio de cultivo donde crecieron las células de <i>Jacaratia mexicana</i> con 25 mg/L de extracto de <i>A. niger</i> (elicitador). ....	60
Figura 20. Desarrollo de la biomasa del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> (inóculo) adicionado con 25 mg/L del extracto de <i>A. niger</i> (elicitador). ....	60
Figura 21. Consumo de sacarosa del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> (inóculo) con 25 mg/L del extracto de <i>A. niger</i> (elicitador). ....	61
Figura 22. Actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de <i>Jacaratia mexicana</i> en un biorreactor airlift con 25 mg/L de extracto de <i>A.niger</i> (elicitador).....	62
Figura 23. Crecimiento celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en un biorreactor airlift con 25 mg/L de extracto de <i>A.niger</i> (elicitador).....	63
Figura 24. Actividad proteolítica/crecimiento celular determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de <i>Jacaratia mexicana</i> en un biorreactor airlift con: (■) 25 mg/L de extracto de <i>A.niger</i> (elicitador) y (♦) 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor).....	64
Figura 25. Tiempo de mezclado del biorreactor airlift determinado para un volumen de 800 mL de agua destilada. ....	65
Figura 26. Coeficiente de transferencia de oxígeno del biorreactor airlift determinado para un volumen de 800 mL de agua destilada.....	66

Figura 27. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS.....	68
Figura 28. Cromatograma de las proteasas del látex de <i>Jacaratia mexicana</i> en una columna Resource S de un mL. ....	69
Figura 29. Cromatograma de las proteasas purificadas del medio de cultivo donde crecieron las células de <i>Jacaratia mexicana</i> en el biorreactor airlift en una columna Resource S de un mL.....	69
Figura 30. Curva tipo de proteína por el método de Bradford. ....	88
Figura 31. Curva tipo de tirosina. ....	89
Figura 32. Curva tipo de sacarosa por el método de la antrona.....	90
Figura 33. Curva tipo de glucosa por el método de orcinol-ácido sulfúrico .....	91

## Indice de Cuadros

Cuadro 1. Reseña histórica del cultivo de células vegetales.....	5
Cuadro 2. Concentraciones de Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV) utilizadas para elegir la formulación del medio MS para obtener el mayor desarrollo de callos de <i>Jacaratia mexicana</i> . ....	33
Cuadro 3. Consumo de sacarosa en los cultivos de <i>Jacaratia mexicana</i> en suspensión con el extracto de <i>A. niger</i> (elicitor).....	57
Cuadro 4. Elaboración de la curva tipo de proteína por el método de Bradford. ....	88
Cuadro 5. Elaboración de la curva tipo de sacarosa por el método de la antrona. ....	89
Cuadro 6. Elaboración de la curva tipo de glucosa por el método de orcinol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	90

## RESUMEN

La *Jacaratia mexicana* es una planta de la familia de las caricáceas que produce enzimas proteolíticas capaces de competir en usos industriales con la papaína. Sin embargo se encuentra a merced de eventos climáticos y cambios en su hábitat natural por urbanización. Por otro lado el cultivo de células vegetales se ha convertido en una herramienta útil para la preservación de especies, producción a gran escala de plantas de interés comercial y de metabolitos.

En este trabajo se estudió el efecto de un hidrolizado de caseína y un extracto de *Aspergillus niger* en la producción de enzimas proteolíticas y crecimiento celular de *Jacaratia mexicana* en cultivos a nivel matraz y en un biorreactor airlift de 2 litros. Además se estudió el efecto del ácido 2,4 diclofenoxiacético (2,4-D) y concentración de sales en la inducción de callos y producción de proteasas. El biorreactor utilizado fue caracterizado determinando el tiempo de mezclado ( $t_m$ ) por el método de pulsos y el coeficiente global de transferencia de oxígeno ( $k_{La}$ ) por el método dinámico.

Los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* con hidrolizado de caseína 0.05% muestran que la producción de enzimas proteolíticas se incrementó 2.3 veces con respecto al control y con 25 mg/L del extracto de *A. niger* que actuó como elicitor, se logró un aumento en la actividad proteolítica de 1.3 veces con respecto al control.

La formulación de medio utilizada para realizar los estudios de esta tesis fue el Murashige y Skoog (MS) completo en sales con 0.5 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de bencilaminopurina (BAP) que resulto ser la más adecuada para el crecimiento celular y la producción de enzimas proteolíticas de *Jacaratia mexicana*. Para la inducción de callos el medio de cultivo contenía 2% de sacarosa y para los cultivos en suspensión 4%, a nivel matraz y biorreactor.

Se logró el cultivo celular de *Jacaratia mexicana* durante cinco semanas y producir enzimas proteolíticas en el biorreactor airlift con 0.5 vvm, 25° C, volumen de trabajo de 800 mL, tm de 40 s y una velocidad de transferencia de O<sub>2</sub> de 0.93 mMol/Lh.



## SUMMARY

*Jacaratia mexicana* is a wild plant from the family of Caricaceas. It produces proteolytic enzymes capable to compete in industrial uses with papain. Nevertheless this plant is against climatic events and changes in its habitat. In the other hand the plant cell culture is becoming a useful biotechnology tool to preserve species, produce plants and metabolites of commercial interest.

In this work, we studied the effect of a casein hidolyzed and one extract of *Aspergillus niger* in the production of proteolytic enzymes and cellular growth of *Jacaratia mexicana* in flask and airlift bioreactor. Moreover we studied the effect of 2,4 diclofenoxiacetic acid (2,4-D) and the concentration of salts in callus induction and proteases production. The bioreactor was characterized by determination of mixed time ( $t_m$ ) and the volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ).

The cell cultures of *Jacaratia mexicana* with casein hidolyzed 0.05% showed increase of 2.3 times in the production of proteolytic enzymes with regard to control and 25 mg/L of *A. niger* extract (elicitor) the production of protease increased 1.3 times with regard to control.

The media formulation to realize the studies of this thesis was Murashige y Skoog (MS) salts complete, 0.5 mg/L of 2,4-D and 0.5 mg/L of bencilaminopurine (BAP). It was the most suitable to cell growth and proteases production of *Jacaratia mexicana*. To induce callus the media had 2% of sucrose and 4% sucrose to cell suspension cultures.

It was possible to maintain cell cultures of *Jacaratia mexicana* for five weeks and produce proteolytic enzymes in the airlift bioreactor with 0.5 vvm, 25° C, working volume 800 mL,  $t_m$  40 s and oxygen transport rate 0.93 mMol/Lh.

# 1 INTRODUCCIÓN

## ***1.1 Antecedentes del cultivo in vitro de plantas***

Durante cientos de años las plantas han sido fuente importante del suministro de alimentos y de compuestos medicinales e industriales para el bienestar humano. A pesar de los avances en la síntesis química de compuestos orgánicos, las plantas son todavía las mejores fábricas de estos compuestos en el mundo, porque producen una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios. Algunos metabolitos secundarios son de gran valor comercial, tales como alcaloides, resinas, taninos, esteroides, saponinas, aceites vegetales, medicamentos, pesticidas y saborizantes (Kieran, et al., 1997).

El cultivo *in vitro* en plantas se inicia en 1898 cuando Harberlan concibió la posibilidad del cultivo de las células, órganos o tejidos vegetales; sin embargo, los avances más importantes en esta área se han llevado a cabo en las últimas décadas.

En los años cuarenta y cincuenta se llevaron a cabo investigaciones sobre el cultivo de células animales y vegetales de diferentes especies, y en los sesentas se dio la primera aplicación comercial del cultivo de células vegetales con la producción de la enzima de restricción 3,5 fosfodiesterasa, proveniente de las células de tabaco (Topete, et al., 1991). El Cuadro 1 muestra una breve reseña histórica del cultivo de células vegetales.

Las primeras formulaciones de los medios empleados para el cultivo de plantas estuvieron inevitablemente basadas en la experiencia que ya se tenía con los microorganismos. Los medio de cultivo más comúnmente utilizados están sustentados en las formulaciones originales de Heller propuesta en 1953, Murashige y Skoog publicada en 1962, White dada a conocer en el año de 1963,

Linsmaier y Skoog (medio conocido como LS y formulado en 1965, medio B5 propuesto por Gamborg en 1968 (Dixon y González, 1996).

Cuadro 1. Reseña histórica del cultivo de células vegetales (Tomado de Smith y Wood, 1998).

FECHA	HECHO
1838	Se propone la teoría celular.
1900-1910	Postulado de la teoría de la totipotencialidad, capacidad de las células de regenerar la planta completa, y se intentan los cultivos de tejidos vegetales.
1930-1940	Aislamiento del ácido indolacético (hormona vegetal) y establecimiento de subcultivos de células viables y órganos.
1950-1960	Primeras investigaciones sobre la biosíntesis del caucho en callos de guayule. Se conoce que la relación auxina/citocinina es necesaria en la organogénesis.
1960-1970	Primeros trabajos para hacer cultivo de células en suspensión. Se investigan componentes inorgánicos para el medio de cultivo de tejidos y células.
1970-1980	Establecimiento del cultivo continuo de células en suspensión. Desarrollo de los cultivos de órganos de diferentes especies vegetales. Se establece la importancia de la selección de células de alto rendimiento para producir sustancias de interés industrial.
1980-1990	Fueron desarrollados los sistemas para la producción de células inmovilizadas. Se estudian factores, llamados elicitores, que influyen en la expresión de determinados metabolitos secundarios en células cultivadas.
1990-2002	Producción de ácidos grasos polinsaturados en suspensión. Estudio de otros reguladores de crecimiento como los jasmonatos, las poliaminas, los brasinoesteroides, etc. Producción de diversos tipos de alcaloides por cultivo en suspensión o en medio semisólido. Desarrollo de sistemas para escalar la producción de metabolitos secundarios a nivel industrial.

Los compuestos con actividad biológica que son acumulados por las plantas han sido usados como fuente de principios activos en compuestos farmacéuticos. Los métodos para incrementar la formación de compuestos naturales en plantas dependen del entendimiento y control de la genética, de los mecanismos fisiológicos y morfológicos de la biosíntesis y acumulación de dichos compuestos (Ferreira y Duke, 1997). Otro factor que puede afectar la acumulación de

metabolitos secundarios en plantas es la interacción por compuestos químicos planta-planta y planta-microorganismo (Pereira, et al., 2000). Los principios activos de los fármacos tradicionalmente han sido extraídos del reino vegetal. La base comercial para la producción de estos metabolitos ha sido el cultivo de plantas en grandes extensiones de terreno, sin embargo algunas plantas que se cultivan fuera de sus ecosistemas pueden tener problemas de adaptación, por esto, en la actualidad los científicos y los biotecnólogos han considerado el cultivo de células, de órganos y tejidos como una alternativa para la producción de metabolitos secundarios cuyo precio en el mercado se encuentra entre 100 y 500 USD/Kg (Bourgau, 2001).

Con el mejoramiento de las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos y órganos vegetales el cultivo de células vegetales se ha convertido en una herramienta poderosa para realizar innumerables estudios de fisiología vegetal, producción de metabolitos primarios, secundarios, etc. Mientras que al inicio de esta técnica solo era posible cultivar células de plantas, órganos establecidos (raíces) o masas celulares no diferenciadas (callos), ahora son posibles cultivos *in vitro* de células vegetales en las siguientes modalidades, cultivo individual (células individuales en sistemas de microcultivo), cultivo colectivo (como callos o cultivos en suspensión) o el cultivo de unidades organizadas como raíces, tallos, óvulos, flores, frutos, etc. (Pérez, 1999).

## **1.2 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)**

Entre los factores de mayor influencia para el establecimiento y desarrollo de un cultivo de células vegetales se encuentran los RCV. Los RCV son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales. Se clasifican en 5 grupos básicos dependiendo de su estructura química y su efecto

fisiológico: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Pérez, 1999).

Los RCV tienen importancia en campos como la agricultura, donde tienen un gran número de aplicaciones prácticas. En el cultivo de tejidos vegetales también tienen aplicación e importancia ya que mediante el manejo de los diversos RCV así como de concentraciones y combinaciones de estos en el medio de cultivo se pueden manipular hasta cierto grado los patrones de desarrollo de tejidos y obtener, por ejemplo tejido calloso, brotes, embriones somáticos y raíces. Por lo anterior, el correcto manejo de los RCV en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales suele ser determinante para el éxito o fracaso del sistema de producción de metabolitos (Pérez, 1999).

Los RCV más utilizados son los pertenecientes a las auxinas y a las citocininas, ya que son los que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo organizado en los cultivos de tejidos vegetales (Dixon y González, 1996).

### **1.2.1 Auxinas**

Las auxinas fueron las primeras hormonas descubiertas en las plantas cuya estructura química fue esclarecida. Sin embargo, ya en la antigüedad y en la edad media se habían hecho observaciones que indicaban la existencia de las sustancias estimuladoras de crecimiento, por ejemplo los esquejes se rodeaban por semillas germinadas para estimular la formación de las raíces. El conocimiento de la naturaleza química de estas sustancias es relativamente reciente y no tienen más de 100 años. Las auxinas se generan principalmente en las partes jóvenes de las plantas: ápices, frutos tiernos y hojas en desarrollo. Estimulan el crecimiento por alargamiento de tallos y participan en la formación de las curvaturas fototrópicas y gravitrópicas. Promueven la formación de raíces laterales y

adventicias. Participan en la inhibición de yemas axilares y brotes por el ápice del brote principal y por sus hojas juveniles (Jankiewicz, 2003).

Las auxinas son un grupo de compuestos derivados comúnmente del triptofano, sintetizados generalmente en los ápices, y que están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. Se sabe que participan en la regulación de algunos procesos que ocurren en los tejidos vegetales como el crecimiento celular, la acidificación de la pared celular, el inicio de la división celular, la formación de tejido no diferenciado (callos), la diferenciación vascular y la formación de órganos (raíces). Entre las auxinas más comunes encontramos a ácido indolacético, ácido indolbutírico, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalacético, ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (picloram). Los últimos 3 son compuestos artificiales que suelen ser más activos que los naturales, ya que las células vegetales carecen en muchos casos de sistemas enzimáticos para degradarlos (Jankiewicz, 2003).

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en altas concentraciones es muy tóxico para muchas especies de plantas y por esto es un herbicida popular. En el cultivo de tejidos se utiliza en concentraciones que van de 1 a 5 mg/mL (Jankiewicz, 2003).

Las auxinas sintéticas cuando son aplicadas a la planta, forma los conjugados semejantemente al ácido indolacético. Así 2,4-D forma glucósidos y además adjunta el grupo -OH en la posición 4. También forma conjugados con diferentes aminoácidos, por ejemplo con el ácido aspártico. Solo después de algún tiempo después de su aplicación, el 2,4-D es liberado en cantidades necesarias para el crecimiento de las células en cultivo de tejidos (Jankiewicz, 2003).

En general el 2,4-D y los derivados del ácido indolacético con una cadena de carbonos de número impar tienen más actividad que los derivados con un número de carbonos par. Esto sugiere que un proceso como el de beta oxidación puede

remover dos unidades de carbono de la cadena, dando como resultado una forma activa de acetatos si el sustrato comienza con una cadena impar de carbonos (Woodward y Bartel, 2005).

### **1.2.2 Citocininas**

En 1955 Miller y colaboradores aislaron de tejidos animales el compuesto que estimulaba fuertemente la división celular en las plantas. La estructura química se identificó y se le nombró cinetina. El descubrimiento en las plantas de compuestos con propiedades semejantes a las de la cinetina estuvo relacionado con el desarrollo de la técnica del cultivo de tejidos *in vitro*. En 1961 se aisló de semillas inmaduras de maíz un compuesto que estimulaba fuertemente las divisiones celulares en plantas, a este compuesto se le nombró zeatina. En los siguientes años se aislaron compuestos con propiedades semejantes a la cinetina y a la zeatina. Todo este grupo de compuestos se le nombró cininas. Sin embargo este nombre se cambió por el citocininas, para diferenciarlas de las proteínas de origen animal que llevan el mismo nombre.

La característica más importante de estos compuestos es que estimulan las divisiones celulares y retrasan el envejecimiento. Además influyen en múltiples procesos bioquímicos como son la estimulación de la síntesis de los ácidos nucleicos y de diferentes proteínas, entre otras enzimas, como las proteasas y ribonucleasas. Estimulan la germinación de semillas que necesitan luz y acortan el periodo de latencia de las yemas. Son un factor muy activo en la regulación de la morfogénesis. Por un lado estimulan la división celular y por otro rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar y junto con las auxinas regulan la división celular (Jankiewicz, 2003).

Son generalmente derivados de la adenina y son sintetizados en tejidos jóvenes y raíces (Pérez, 1999). La actividad biológica de la citocinina depende de la longitud de su cadena lateral, del grado de saturación de la cadena y de los grupos

adjuntos. Se acepta que actualmente existen dos grupos de citocininas las derivadas de la purina (citocininas púricas) y las derivadas de la urea (citocininas úricas) (Jankiewicz, 2003).

Las citocininas naturales más comunes son las zeatina, la isopentiladenina y el ribosido de zeatina. Dentro de las citocininas sintéticas encontramos a la benciladenina (BAP) y la cinetina. (Pérez, 1999). La benciladenina (BA o BAP) es un derivado de la adenina, en la cual, en la posición N6 está unido el grupo bencilo. La benciladenina es frecuentemente usada, entre otras cosas por su bajo precio y por que muestra una actividad alta en muchas especies de plantas. Tanto el BAP como la cinetina son sintetizadas en forma libre y en forma de ribósidos y ribótidos (Jankiewicz, 2003).

Debido lo anterior el balance entre auxinas y citocininas en un cultivo *in vitro* suele ser determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido (Pérez, 1999).

### **1.3 Importancia del cultivo de células vegetales**

Topete et al. (1991), estiman en más de 200 metabolitos secundarios los que se pueden obtener por cultivo de tejidos vegetales. Entre ellos, los fármacos forman un grupo muy importante y atractivo para obtenerlos por esta metodología, ya que se sintetizan en pequeña cantidades en las plantas y pueden ser obtenidos *in vitro* con mayores rendimientos que en las plantas completas.

También existe un interés similar en el cultivo de células vegetales para la obtención de aromatizantes, colorantes y saborizantes, con el objeto de satisfacer las necesidades de aditivos naturales y colorantes, sobre todo en países en donde las normas de regulación en materia de alimentos que así lo requieren (Topete, et al., 1991).



Algunas ventajas que hacen atractivo al cultivo de células vegetales, sobre los cultivos tradicionales de planta son:

- a. Independencia de los factores ambientales, tales como el clima, plagas, situación geográfica, situación política, etc.
- b. Sistemas de producción definido con mayores posibilidades de control.
- c. Producción más consistente en cuanto a calidad y rendimiento del producto.
- d. La posibilidad de obtener mayores rendimientos con respecto a los obtenidos por el cultivo de la planta completa.

#### **1.4 Antecedentes de cultivos in vitro de plantas para producción de enzimas**

El cultivo de callos o células en suspensión se ha escalado a nivel industrial, principalmente para la producción de metabolitos secundarios, habiéndose realizado pocos estudios para la producción de enzimas y de metabolitos primarios, como son las proteínas. A la fecha lo reportado en la literatura científica es lo siguiente:

- Producción de peroxidasas en cultivo células en suspensión de *Daucus carota* (Xu, et al., 1998)
- Producción de proteasas serínicas en cultivo de células en suspensión de soya (Guo, et al., 1998)
- Producción de proteasas por cultivos celulares de la familia *Compositae*: *Sylibum marianum* (Fevreiro, et al., 1986), *Cynara cardunculus* (Figuereido, et al., 1987) y *Onopordum turcicum* (Tamer, 1993)
- Producción de proteasas en cultivo de *Mirabilis jalapa* (Tamer, 1997)
- En particular la producción de proteasas cisteínicas de interés industrial en cultivos in vitro de en caricáceas: *Carica papaya* (Medora, 1973) y *Jacaratia mexicana* (Badillo, et al., 2002; Oliver, et al., 2005) y en bromeliáceas: *Ananas sativus* (Apte, et al., 1979) y *Bromelia hemisphaerica* (Barrera, 2004)

## 1.5 Inductores

Las enzimas proteolíticas son metabolitos inducibles, descubrimiento hecho por el Dr. Castañeda-Agulló que demostró por vez primera la inducción de proteinasas en *Serratia marcescens*. En su trabajo establece que las proteasas producidas por dicha bacteria son inducidas al crecerlas en un medio adicionado con gelatina. Las bacterias crecidas en el medio enriquecido mostraban una actividad proteolítica después de un periodo corto de tiempo, por lo que concluye que la presencia de gelatina en el medio es la responsable de la rápida aparición de proteasas y en consecuencia un incremento de la actividad proteolítica (Castañeda-Agulló, 1956).

El crecimiento de microorganismos en medios de cultivo ricos en proteínas como caseína, peptona, triptona, gelatina o leche descremada es excelente para elevar la síntesis de proteasas, dada su capacidad de actuar como inductores. Otros compuestos que son capaces de actuar como inductores son los aminoácidos como la leucina (Romero, et al., 2001). Esto es comprobado por Braun y Schmitz (1980) induciendo la síntesis de proteasas de origen bacteriano en *S. marcescens* con leucina, caseína y extracto de levadura-triptona en un medio de cultivo mínimo. Sin embargo la regulación de la síntesis de proteasas extracelulares no ha sido estudiada de manera extensa (Bromke y Hammel, 1978).

Algunas de las rutas metabólicas de los aminoácidos y las proteínas de plantas han sido dilucidadas, así como los genes que codifican para algunas enzimas. La mayoría de estos estudios encamina sus esfuerzos a entender cómo es que la planta almacena las proteínas y los aminoácidos, para entonces poder aumentar el valor nutrimental de las mismas (Galili y Höfgen, 2002).

Por otro lado, estudios en *S. marcescens* a nivel molecular, han reportado que existe la síntesis de un nuevo mRNA en presencia de gelatina (Bromke y Hammel, 1978). Dicha síntesis del mRNA se ve afectada por la adición de rifampicina, lo cual inhibe la síntesis de la proteasa, pero no el crecimiento de la misma.

Un inductor es una molécula que promueve la expresión de algunos genes. Entre los inductores encontramos algunos tipos de proteínas que pueden afectar el nivel de expresión promoviendo o evitando la transcripción. Un inductor funciona deshabilitando represores de proteínas (Tomado de [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)).

Un inductor, entonces, se puede definir como un compuesto que funciona como sustrato de enzimas inducibles, es decir la presencia de éste en cultivos celulares incrementa la síntesis de estas enzimas.

## **1.6 Elicitores**

Por otro lado los elicito pueden ser factores bióticos o abióticos, entre los bióticos se encuentran compuestos de origen principalmente microbiano, que en contacto con células de plantas superiores incrementan la producción de pigmentos, flavonoides, fitoalexinas y otros compuestos relacionados con su sistema de defensa (Savitha, et al., 2006).

El primer trabajo del uso de elicitores de origen fúngico fue reportado 1991 y después se ha informado del uso de otros compuestos, (p. e. los jasmonatos) para la producción del fármaco paclitaxel por cultivos en suspensión de *Taxus brevifolia* (Zhong, 2002).

En general los metabolitos secundarios que están involucrados con el sistema de defensa de la planta tienen un elevado grado de elicitación como respuesta a estímulos externos, químicos o biológicos. Sin embargo, el efecto de los elicitores no significa necesariamente que deben existir modificaciones en sus vías metabólicas. Una combinación inapropiada de medio y el elicitor, así como la concentración del mismo, puede resultar en un efecto nulo de elicitación (Savitha, et al., 2006).

También se ha observado que la adición de la fuente de carbono al cultivo, en forma intermitente puede actuar como un elicitor en la producción de metabolitos secundarios, como es el caso de la producción del anticancerígeno taxan (un diterpeno) en cultivo de células de *Taxus chinensis*. Otros compuestos que funcionan como elicitores son los derivados de los jasmonatos (Dong y Zhong, 2001).

Por otro lado Forsthoefel, et al., (1998) mencionan que en condiciones de salinidad elevadas la actividad de las proteasas cisteínicas aparentemente es requerida para la síntesis de nuevas enzimas asociadas a la adaptación de las condiciones de estrés a corto plazo, incluyendo compatibilidad de solutos para biosíntesis, o el secuestro de iones o la disponibilidad de agua, por lo tanto la actividad de dichas enzimas se incrementa. Además Galili y Höfgen (2001) mencionan otras causas de estrés provenientes del medio ambiente, como falta o exceso de luz y disponibilidad de minerales, así como estrés abiótico y biótico, que de igual manera provoca un incremento en la producción de enzimas proteolíticas.

Para la producción de metabolitos primarios los elicitores utilizados son de origen fúngico. Por ejemplo la producción de algunas enzimas como las peroxidasas se incrementó con el uso de elicitores provenientes principalmente de *Aspergillus niger*, aunque se mencionan otras especies tales como *Rhizopus delemar*, *Fusarium oxysporum*, *Ganoderma lucidum*, *Penicillium* sp. (Xu, et al., 1998).

### **1.7 Importancia comercial de las enzimas proteolíticas**

La producción mundial de enzimas principalmente de origen microbiano, presentó un importante crecimiento a finales de los sesenta, en donde las ventas se incrementaron de 10 hasta casi 150 millones de dólares anuales, cayendo años más tarde a casi 50 millones de dólares anuales, hacia finales de los setenta el mercado mundial de las enzimas vuelve a tomar importancia. Puede afirmarse que

la producción y consumo de enzimas crudas crece a un ritmo de 5 % anual, habiéndose producido 80,000 toneladas de preparaciones enzimáticas en 1985. El mercado mundial de las enzimas industriales tiene un valor estimado de 1,300 millones de dólares anuales. Aproximadamente el 62% de las enzimas producidas se usan en aplicaciones comerciales, 33% en detergentes y 5% en textiles y curtidos. De esta producción, un 80% son enzimas hidrolíticas y se utilizan para despolimerizar lípidos, proteínas, almidones. De éstas, se estima que el 60% son proteinasas, 30% amilasas, y 3% lipasas; el resto son enzimas para usos especiales. En la industria alimentaria la principal aplicación de las enzimas es para el procesamiento del almidón, seguida por la producción de quesos, el procesamiento de jugos obtenidos de frutas y vegetales, producción de jarabes fructosados, el horneado y en la cervecería. En particular, las proteasas constituyen uno de los grupos más importantes de las enzimas industriales y representan aproximadamente el 25% de las ventas totales de enzimas (Briones, 1996). De acuerdo a lo reportado por Haard (1998) las proteasas representaban el 60% del mercado mundial, que era aproximadamente de 1500 millones de dólares.

### ***1.8 Enzimas proteolíticas de origen vegetal***

La mayoría de las enzimas proteolíticas de origen vegetal son de tipo cisteínico, como la papaína, son utilizadas en numerosas industrias: en los procesos de fabricación de cerveza, la elaboración de ablandadores de carne, en la producción de hidrolizados de proteínas, en la formulación de productos farmacéuticos diversos, etc. En la modificación de proteínas, donde el control del tamaño de los péptidos es esencial para obtener cambios reproducibles en las propiedades funcionales de proteínas. Este control puede lograrse mediante el uso de proteasas específicas y selectivas. También, en la hidrólisis de las proteínas para la industria alimentaria, con respecto a la funcionalidad y calidad nutricional (Briones, 1996).

Además por ser de origen vegetal están libres de políticas de restricción ya que son consideradas por la Food and Drugs Administration (FDA) como sustancias Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS) (Lisowska y Wysokinska, 2000).

### **1.9 Clasificación de las enzimas proteolíticas**

Peptidasa, proteasa o enzimas proteolíticas, es el término recomendado por la Comisión de Enzimas (EC) de la International Union of Biochemistry (IUB) para cualquier enzima que cause la hidrólisis de uniones peptídicas. Esto se aplica a las endopeptidasas, que actúan en las uniones internas de las proteínas o de los polipéptidos, así como las oligopeptidasas o exopeptidasas, que actúan principalmente en los extremos amino terminales de cadenas polipéptidicas y en sustratos pequeños. El término peptidasa es sinónimo de hidrolasa peptídico o proteasa y corresponden a EC 3.4.

Existen tres criterios principales para la clasificación de las proteasas: 1) la reacción que catalizan (exopeptidasas y endopeptidasas), 2) la naturaleza química del sitio catalítico y 3) su estructura tridimensional y con base en ésta la relación evolutiva entre ellas.

En relación a la naturaleza del sitio catalítico las enzimas proteolíticas se clasifican en seis grupos (Barret, 1994):

- 1) Proteasas serínicas: tienen un residuo de serina en el sitio activo. EC 3.4.21.
- 2) Proteasas cisteínicas: tienen un residuo de cisteína en el sitio activo. EC 3.4.22.

- 3) Proteasas treonínicas: poseen un residuo de treonina en el sitio activo. EC 3.4.25
- 4) Proteasas aspárticas: tienen dos residuos de ácido aspártico en el sitio activo y presentan su máxima actividad catalítica a pH ácido. EC 3.4.23
- 5) Metaloproteasas: Poseen un residuo de ácido glutámico en el sitio activo y un catión divalente como el zinc, calcio o magnesio para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico. EC 3.4.24
- 6) Proteasas no clasificadas. EC. 3.4.99.

### **1.10 Proteasas de plantas mexicanas**

En el segundo grupo (proteasas cisteínicas) encontramos a la mayoría de las proteasas de origen vegetal (papaína, ficina, bromelaína, mexicaína, etc.). Estas enzimas son endopeptidasas (Cruz y Victoria, 1993; Whitaker, 1994). Las proteasas existen en muchas plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, pero en forma abundante sólo en escaso número de ellas. El desarrollo de los métodos de purificación ha permitido descubrir la presencia de varias proteasas en el látex o jugo de frutos. Entre las proteasas mexicanas más estudiadas se encuentran las de los frutos de caricáceas: la papaína y la mexicaína obtenida de los látex de *Carica papaya* y de *Pileus mexicanus* también conocida como *Jacaratia mexicana*, respectivamente y de las bromeliáceas hemisfericina de la *Bromelia hemisphaerica* (Garduño, 1974; Cruz, 1993).

### **1.11 *Jacaratia mexicana***

La familia de Caricáceas son plantas que producen grandes cantidades de proteasas, encontrándose entre ellas la *Jacaratia mexicana*, planta silvestre que crece en regiones subtropicales de la República Mexicana, con frutos semejantes a los de la papaya (*Carica papaya*). La *Jacaratia mexicana* es una planta mexicana, caducifolia mide hasta 15 metros de altura y tiene su hábitat natural en

las regiones subtropicales de México: en los estados de Morelos, Puebla, Guerrero, Campeche y Yucatán.



Figura 1. Planta de *Jacaratia mexicana* con frutos.

### **1.12 La mexicaína.**

La mexicaína es una proteasa monomórfica de tipo cisteínico que fue aislada del látex de los frutos de *Jacaratia mexicana* por Castañeda-Agulló, et al. (1942). Estudios comparativos bioquímicos y sobre aplicaciones industriales donde se usa la papaína (estabilización coloidal de la cerveza, ablandamiento de la carne, hidrólisis de proteínas de pescado y de origen vegetal, así como la modificación de las propiedades funcionales de proteínas) han mostrado que presentan una mayor actividad específica y estabilidad que la papaína y que las proteasas de *Jacaratia mexicana* pueden competir con ella (Briones et al., 1994; Briones, 1996).

Por mucho tiempo se pensó que la denominada mexicaína era la única proteasa presente en el látex de *Jacaratia mexicana* y además que esta era una sola enzima, sin embargo, en estudios bioquímicos recientes se ha demostrado la existencia de al menos cinco proteasas presentes en dicho látex. De acuerdo con el orden de elución de las proteasas del extracto del látex por cromatografía de intercambio iónico fuerte, se les nombró proteasas P-I, P-II, P-III, P-IV y P-V, esta



última presenta mayor actividad específica que la proteasa P-IV. A la proteasa P-IV por ser la más abundante se le denominó mexicana (Oliver, 1999) y fue purificada, caracterizada y cristalizada por Oliver, (1999) y Oliver, et al., (2004).



Figura 2. Frutos de *Jacaratia mexicana*

### **1.13 Antecedentes del cultivo in vitro de *Jacaratia mexicana***

Dado la importancia científica e industrial de las proteasas de *Jacaratia mexicana*, y por otra parte, debido a que es una planta silvestre, una fuente alterna de obtención de dichas enzimas es por medio del cultivo de células de *Jacaratia mexicana*. En estudios previos de nuestro grupo de trabajo, usando 12 formulaciones de medios Murashige-Skoog (MS) denominados MS1 al MS12. En nueve de las 12 formulaciones se logró la inducción y el cultivo de callos de dicha planta. También en estos medios se demostró la producción de enzimas proteolíticas en cultivo de callos y en células en suspensión de *Jacaratia mexicana*, que las proteasas son liberadas al medio de cultivo y que la producción de estas enzimas está asociada al crecimiento celular del cultivo. De las nueve formulaciones, tres presentaron la mayor inducción de callos y producción de enzimas proteolíticas (Badillo, et al., 2002; Barrera y Oliver, 2004; Oliver, et al., 2005). Las tres formulaciones corresponden a los medios denominados MS1 (2,4-D), MS5 (2,4-D + cinetina) y MS9 (2,4-D + BAP). Con estas formulaciones del medio de cultivo MS, se han llevado a cabo los estudios planteados en esta tesis.

### **1.14 Desarrollo de procesos basados en cultivos de células vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales es utilizado para la obtención de productos naturales valiosos como son principios activos para formulaciones farmacéuticas, sabores, fragancias, y sustancias químicas especiales, cerca de 20,000 compuestos químicos diferentes son sintetizados por las plantas, y cada año se suman otros 1,600. De acuerdo con Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), los fármacos derivados de las plantas y compuestos intermediarios usados como materias primas, representan un mercado anual de 9-11 billones de dólares solo en los Estados Unidos de América (Sajc, et al., 2000).

En 1956 se otorga la primera patente de cultivo de tejidos vegetales y se sugiere su potencial para la producción de metabolitos secundarios (Sajc, et al., 2000). Sin embargo, a pesar del enorme potencial del cultivo de células vegetales, los procesos a nivel industrial aun son escasos, entre ellos encontramos la producción de shikonina de *Lothospermun erithrorhizon*, barberina de *Coptis japonica* y ginsenósidos de *Panax ginseng*. Muchos otros cultivos celulares han sido estudiados y patentados para producir metabolitos, pero a la fecha pocos son económicamente viables (Kieran, et al., 1997). Por esta razón los avances en ciencia de materiales, en diseño de reactores y en procesos de separación son importantes para mejorar la producción a gran escala de metabolitos por cultivo de células vegetales (Sajc, et al., 2000).

Al diseñar un proceso de producción de metabolitos se debe considerar un sistema de producción con una alta productividad y rendimiento con respecto al sustrato y una alta concentración de producto, por lo que es importante la selección de líneas celulares, de medios de cultivo y de biorreactores (Sajc, et al., 2000).

El mezclado es importante para mantener homogéneamente distribuidas a las células, nutrientes y productos en el medio de cultivo. Éste es logrado por difusores, agitación mecánica o la combinación de ambos. Las células se ven afectadas por el mezclado de dos maneras: en su función y su morfología y en la transferencia de masa de nutrientes y de metabolitos. Sin embargo los efectos hidrodinámicos producidos por el mezclado en la estructura y la composición de las células vegetales no está bien definido hasta el momento (Sajc, et al., 2000).

En cuanto al tipo de biorreactor a utilizar para el cultivo de células vegetales, se han hecho numerosas modificaciones a los biorreactores tipo tanque agitado para ser utilizados para este propósito utilizando numerosos diseños de impulsores. Sin embargo su elevado consumo de energía y el gran esfuerzo de corte que representa para las células, hacen que este tipo de biorreactores sean poco atractivos para el cultivo de células vegetales (Sajc, et al., 2000).

Por otro lado, en los reactores de membrana y de lecho empacado se tiene una gran cantidad de células inmovilizadas por unidad de volumen, pero la limitada transferencia de masa y dificultades para proporcionar y remover componentes gaseosos son desventajas que limitan su uso (Sajc, et al., 2000).

Los biorreactores que normalmente son empleados para el cultivo microbiano (tipo tanque agitado) no pueden ser usados directamente para el cultivo de células vegetales, debido a las diferencias entre ambos sistemas. Dentro de estos cultivos encontramos agregación presente en el cultivo de células vegetales, ya que éstas tienen poca capacidad de separarse después de la división y además la secreción de polisacáridos (ocurrida durante el cultivo) puede contribuir a este fenómeno. Wagner y Vogelmann en 1977 observaron cambios en la morfología de las células en cultivo en suspensión de *C. roseus*, cuando este se pasó de un matraz agitado a un biorreactor airlift. Por otro lado, en 1993 Shuler muestra evidencias que sugieren que la productividad de los metabolitos puede estar influenciada por el

grado de asociación celular y que puede ser afectada por la variación de los patrones de agregación que tengan en el escalamiento (Kieran, et al., 1997).

Los biorreactores de columna de burbujeo y los de tipo airlift producen bajos esfuerzos de corte y han sido usados por numerosos investigadores que trabajan con células vegetales (Kieran, et al., 1997). En muchos casos el esfuerzo de corte ha sido reportado que tiene efectos negativos en la células, por ejemplo, supresión de la tasa de crecimiento, reducción de la producción de metabolitos o inhibición de la organogénesis (Nagamori, et al., 2001).

Los biorreactores tipo airlift presentan ventajas de diseño para el crecimiento de células vegetales, ya que combina una buena transferencia de masa con alto contenido de partículas sólidas, mezclado eficiente, esfuerzo de corte relativamente bajo, consumo menor de energía y diseño simple (Sajc, et al., 2000).

La primera aplicación de los biorreactores airlift, data de principios de los años cincuenta. La utilización de este tipo de biorreactores requiere de un diseño para procesos en particular, a diferencia de los biorreactores de tanque agitado que pueden ser adaptados para cada proceso y alterar las condiciones sin mucha dificultad, en cambio los biorreactores tipo airlift no ofrecen muchas posibilidades de variar las condiciones de trabajo.

Además, se ha observado que las células vegetales son muy sensibles al esfuerzo de corte y presentan dificultades al usar biorreactores de tanque agitado, principalmente en cultivos celulares a gran escala. Debido a la homogeneidad en las fuerzas de estrés que ofrecen los biorreactores airlift son preferidos para dichos cultivos (Onken, et al., 1983).

### **1.15 Importancia del estudio del desempeño del biorreactor airlift**

Los sistemas de células vegetales utilizados para la producción de metabolitos (primarios y secundarios), en muchos casos sufren una disminución de productividad cuando se escalan a nivel biorreactor. Esta caída se ha atribuido a problemas de mezclado y transferencia de masa, problemas característicos de cultivos agregados. Aun cuando el requerimiento de oxígeno de las células vegetales es relativamente bajo, este se vuelve crítico cuando las células se encuentran sintetizando metabolitos, y estudios recientes resaltan la importancia de la concentración de oxígeno disuelto para la producción de los mismos (Kieran, et al., 1997).

De igual manera el mezclado es otro factor importante a considerar, ya que un buen mezclado asegura una adecuada distribución de nutrientes, células y productos; además tiene efectos sobre la forma y funcionalidad de la célula e induce cambios en la transferencia de masa de nutrientes y metabolitos. La magnitud de las fuerzas hidrodinámicas asociadas al mezclado debe ser adecuada para no causar la muerte de las células y permitir que éstas produzcan el metabolito de interés. De aquí que el tiempo de mezclado y el coeficiente de transferencia de oxígeno son parámetros importantes para el diseño y operación de los biorreactores (Sajc, et al., 2000).

Con el propósito de conocer que durante el crecimiento de las células y la producción de la o las enzima(s) tuvieran el mezclado y aireación correcta para disponer oportunamente de todos los nutrientes necesarios, se realizó el estudio del desempeño del biorreactor airlift utilizado para llevar a cabo las cinéticas de *Jacaratia mexicana*.

## 2 JUSTIFICACIÓN

Las enzimas proteolíticas o proteasas, tienen múltiples aplicaciones entre ellas la industria cervecera y de los alimentos. En general estas industrias prefieren el uso de enzimas proteolíticas de origen vegetal, ya que son consideradas por la Food and Drug Administration (FDA) como Sustancias Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS) y esto se debe a que provienen de partes comestibles de plantas, por ejemplo la papaína. Las caricáceas son plantas que producen grandes cantidades de proteasas, y entre ellas *Jacaratia mexicana*, que crece silvestre en regiones subtropicales de México, con frutos semejantes a los de la papaya (*Carica papaya*) y de cuyo látex fue aislada la proteasa “mexicana”. Estudios comparativos sobre aplicaciones industriales donde se usa la papaína han mostrado que las proteasas de *Jacaratia mexicana* pueden competir con ella. Sin embargo, *Jacaratia mexicana* es una planta silvestre y da frutos sólo una temporada al año, por lo que para obtener estas enzimas una alternativa es el cultivo de células de *Jacaratia mexicana*. En estudios anteriores se demostró la producción de enzimas proteolíticas en cultivo de callos y en células en suspensión de *Jacaratia mexicana*, que son liberadas al medio de cultivo y que la producción de estas enzimas está asociada al crecimiento celular del cultivo. Por otra parte se conoce que las proteasas pueden ser inducida por proteínas o péptidos, y que su síntesis también puede ser incrementada por factores bióticos o abióticos llamados elicitores.

En este trabajo se evaluó el efecto de un inductor y un elicitor en la producción de enzimas proteolíticas en los cultivos de células en suspensión de *Jacaratia mexicana* a nivel matraz y con este conocimiento llevar a cabo dicho cultivo en un biorreactor airlift de dos litros, construido basado en el diseño de Presuel (2000).

## **2.1 Hipótesis**

H1: Si se utiliza un hidrolizado de caseína en una concentración específica en los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* será posible incrementar la producción de enzimas proteolíticas, ya que este hidrolizado actuará como un inductor.

H2: Si se utiliza un extracto de origen fúngico de *Aspergillus niger* a cierta concentración definida, en los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* será posible incrementar la producción de enzimas proteolíticas, por medio de elicitación.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general.**

Llevar a cabo cultivos de células en suspensión de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor airlift para la producción de enzimas proteolíticas utilizando separadamente un inductor y un elicitor.

#### **3.2 Objetivos particulares.**

1. Inducir y mantener el cultivo de callos de *Jacaratia mexicana*.
2. Obtener cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en suspensión a nivel matraz.
3. Estudiar el efecto de un inductor en la producción de enzimas proteolíticas en cultivo celular de *Jacaratia mexicana* a nivel matraz.
4. Estudiar el efecto de un elicitor en la producción de enzimas proteolíticas en cultivo celular de *Jacaratia mexicana* a nivel matraz.
5. Caracterizar la cinética del cultivo de células en suspensión en un biorreactor tipo airlift utilizando un inductor y un elicitor por separado.
6. Recuperación y caracterización parcial de la enzima o enzimas proteolíticas.



## 4 MATERIALES

### 4.1 *Material biológico*

Semillas *Jacaratia mexicana*, obtenidas de la reserva de esta planta en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN (CEPROBI), en Yautepec, Morelos.

### 4.2 *Materiales*

1. Frascos tipo gerber con tapas de plástico
2. Espátulas estériles
3. Frascos para almacenar soluciones
4. Pinzas de disección
5. Bisturí
6. Tubos eppendorf de 1.5 mL
7. Material de vidrio diverso (Probetas, matraces, vasos de precipitados de diferentes capacidades, tubos de ensaye)
8. Cámara de Neubauer Superior Marienfeld
9. Membrana de celulosa 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore
10. Membrana de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  Microsep
11. Papel filtro

### 4.3 *Equipos*

1. Balanza analítica Mettler Toledo AB204-S
2. Potenciómetro Orion Research
3. Horno de microondas Sanyo
4. Olla de presión Presto
5. Campana de flujo laminar Fisher Hamilton

6. Espectrofotómetro	Beckman DU 650
7. Centrifuga	Hermle 7300
8. Centrifuga	Centaur 2 MSE
9. Micropipetas	Eppendorf
10. Termomixer	Eppendorf
11. Microscopio	Motic
12. Baño de temperatura controlada	Labline Aquabath
13. Dosificador	Repipet II Barnstead/Labindustries
14. Biorreactor Airlift	
15. Estufa	Shel Lab
16. Concentrador	Amicon
17. Cámara de electroforesis	BioRad
18. Fuente de poder	BioRad
19. Cromatógrafo	Äkta Prime
20. Bomba de vacío	Vacubrand
21. Sensor de O <sub>2</sub>	
22. Medidor y controlador de pH	
23. Columna de cromatografía	Resource

#### **4.4 Reactivos**

1. Agar noble o agar-agar	DIFCO
2. Sales minerales: MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, KNO <sub>3</sub> ,	Sigma
3. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , KI, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O,)	
4. Agua desionizada	Obtenida en un equipo Milli-Q
5. Hipoclorito de sodio al 1 y 1.5 % de cloro libre	Cloralex 6% de cloro libre

6. Auxinas: 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) AIA (Ácido indol-3-acético).	Sigma
7. Citocininas: Cinetina (6-Furfurilaminopiridina) BAP (6-Bencilaminopurina)	Sigma
8. Vitaminas: Ácido nicotínico piridoxina.HCl tiamina.HCl glicina	Sigma
9. Sacarosa	Mallinckrodt
10. Macronutrientes y Micronutrientes	Sigma
11. Mioinositol	Sigma
12. Ácido tricloroacético	Baker
13. Caseína	Sigma
14. Cisteína.HCl	Sigma
15. Hidrolizado de caseína	Bacto triptona Difco
16. Antrona	Mallinckrodt
17. Orcinol	Sigma
18. Ácido sulfúrico	Baker
19. Ácido clorhídrico	Reasol
20. Hidróxido de sodio	Reasol
21. Ácido bórico	Droguería Mercurio
22. Cefotaxima (Claforan 500 mg)	Aventis
23. Azul de Comassie	Sigma
24. Azul de tripano	Sigma
25. Marcador de peso molecular de 10 a 220 KDa	Invitrogen
26. Acrilamida-Bisacrilamida (30:0.8)	Sigma
27. Tris-HCl	USB
28. Tris- Base	Sigma

29. Persulfato de amonio (k)	Merck
30. Etanol absoluto	Merck
31. Metanol absoluto	Merck
32. Glicina	Sigma

## 5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la figura 1 se presenta el diagrama de bloques del desarrollo experimental. Como primer paso, a partir de semillas desinfectadas de *Jacaratia mexicana* fueron obtenidas plántulas de aproximadamente 12 cm de altura. Una vez que alcanzaron esta altura se hicieron cortes de aproximadamente un cm y fueron colocados en frascos tipo gerber con medio MS para inducir callos. Los callos fueron resembrados en medio fresco tres veces, y después se utilizaron para obtener el cultivo en suspensión a nivel matraz, donde fue realizado el estudio con un inductor y un elicitor. Con las mejores condiciones de los estudios anteriores, se realizaron cultivos de células de *Jacaratia mexicana* a nivel biorreactor. Al terminar los cultivos en el biorreactor el medio agotado fue cosechado, la(s) enzimas proteolíticas se recuperaron e identificaron. Por otro lado se llevó a cabo el estudio del desempeño del biorreactor.

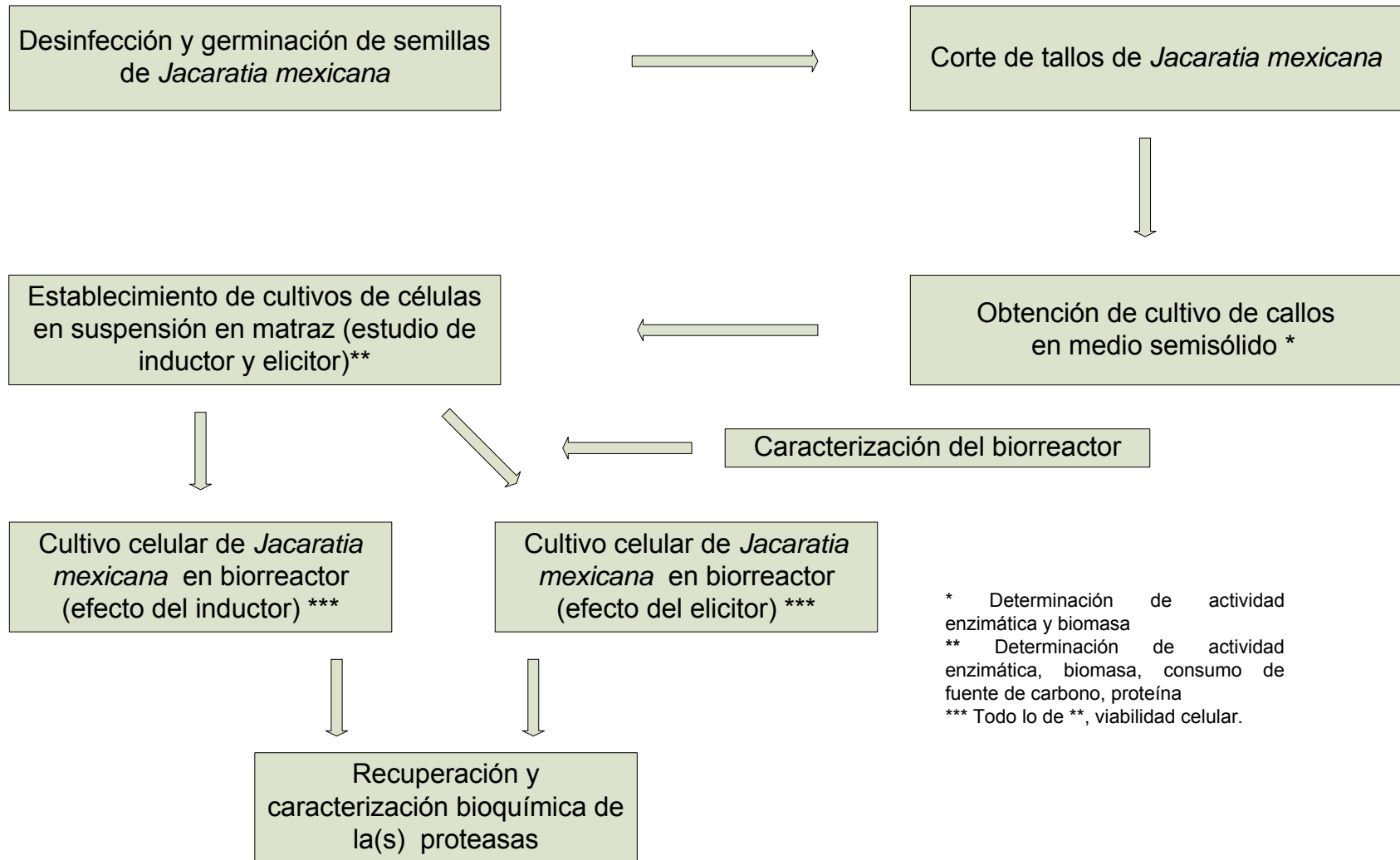


Figura 3. Diagrama de bloques del desarrollo experimental

## **6 METODOLOGÍA**

### **6.1 Desinfección de semillas de *Jacaratia mexicana***

Las semillas fueron lavadas con detergente extrán al 2% (v/v) manteniéndolas en agitación durante 40 minutos. Se enjuagaron con suficiente agua destilada estéril para eliminar el detergente, se dejaron en una mezcla de etanol-agua al 70% durante un minuto, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril. Fueron tratadas con hipoclorito de sodio con 1% de cloro libre por 10 minutos. Posteriormente en condiciones de asepsia, y en una campana de flujo laminar, se lavaron con agua destilada y estéril de 3-4 veces. Se dejaron en agua destilada y estéril por 24 horas para permitir la adecuada hidratación de las semillas y remoción del mucílago (Barrera, et al., 2004).

### **6.2 Germinación de las semillas**

A tubos de vidrio con tapón de algodón se adicionaron aproximadamente 10 mL de medio Knop (ver anexo) y agar al 5%. En condiciones de asepsia, en cada tubo fueron colocadas tres semillas tratadas como se describe en el punto 6.1. Las semillas fueron incubadas en un fotoperíodo con iluminación natural, a  $25 \pm 3^\circ \text{C}$  hasta el crecimiento aproximado de la plántula de 15 a 18 cm de altura (Badillo, et al., 2002).

### **6.3 Obtención de callos**

En una campana de flujo laminar, se realizaron cortes de aproximadamente un cm del tallo de las plántulas germinadas. Colocando tres cortes de tejido en un frasco

tipo gerber con 20 mL del medio Murashige y Skoog (MS) a 100% y a 25% de sales, adicionado con RCV (ver Cuadro 2), sacarosa y con agar al 0.8% (ver anexo). Los explantes se colocaron en una cámara de cultivo con fotoperíodo y una temperatura aproximada de  $26 \pm 3^\circ$  C. Una vez obtenido el tejido caloso fueron resembrados en medio semisólido fresco cada 15 días (Badillo, et al., 2002).

Cuadro 2. Concentraciones de Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV) utilizadas para elegir la formulación del medio MS para obtener el mayor desarrollo de callos de *Jacaratia mexicana*.

Medio Murashige y Skoog	Auxinas	Concentración de auxinas (mg/L)			Citocininas (mg/L)
MS1	2,4-D	<b>MS1a</b>	<b>MS1b</b>	1.0	-
		0.25	0.5		
MS5	2,4-D	<b>MS5a</b>	<b>MS5b</b>	1.0	0.25 Cinetina
		0.25	0.5		
MS7	AIA	0.25	0.5	1.0	0.25 Cinetina
MS9	2,4-D	<b>MS9a</b>	<b>MS9b</b>	1.0	0.5 BAP
		0.25	0.5		

#### **6.4 Determinación de la actividad proteolítica en el medio semisólido**

Sabiendo que las enzimas son excretadas en el látex *Jacaratia mexicana*, se determinó la actividad proteolítica en los medios semisólidos donde crecieron los callos utilizando el método de Kunitz modificado por Ortega y Castillo (1966) y Oliver (1999). En cada frasco tipo gerber en el medio disgregado donde crecieron los callos, se les agregó 9.5 mL de caseína 1% (en regulador de fosfatos 0.05M, pH 7.6) y un mL de cisteína (0.2 M, pH 7.6), la mezcla de reacción se incubó a  $37^\circ$  C, 15 minutos. Fueron tomadas alícuotas de 0.5 mL de la mezcla y adicionado

0.75 mL de ácido tricloroacético (ATC) al 5% a las tres horas de reacción. Se dejaron en reposo una hora, centrifugándose a 6500 rpm durante 25 minutos y determinando la absorbancia a 280 nm contra un blanco de reactivos (0.75 mL de ATC y 0.5 mL de regulador de fosfatos, 0.5 M, pH 7.6). (Oliver, 1999). Se expresó la actividad proteolítica en UT (unidad de tirosina y se define como los  $\mu\text{g}$  de tirosina liberados por hora) usando una curva tipo de tirosina (ver anexo).

### ***6.5 Determinación de la tasa de crecimiento de los callos en medio semisólido***

La tasa de crecimiento de callo primario es definida como las veces que incrementa su peso el explante en determinado tiempo. Se determina dividiendo el peso del callo entre el peso promedio del explante.

Tanto la actividad enzimática como la tasa de crecimiento en medio semisólido fueron determinadas cada 15 días, es decir cada que los callos eran resembrados en medio nuevo.

### ***6.6 Determinación de actividad proteolítica en los cultivos de células en suspensión***

Para la determinación proteolítica fueron tomados 2 mL de muestra de cultivo celular en condiciones de asepsia, se filtró usando una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se tomó 1.5 mL del filtrado y se adicionó 0.5 mL de cisteína 0.2 M en regulador de fosfatos 0.05M, pH 7.6. Para la determinación de la actividad fueron tomados 250  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo de la enzima activada y se adicionó 250  $\mu\text{L}$  de una solución de caseína al 1% en regulador de fosfatos 0.05M, pH 7.6. El tiempo de reacción fue de 3 horas a 37° C, después de este tiempo se adicionó 750  $\mu\text{L}$  de



ATC al 5% para detener la reacción. Los testigos recibieron el mismo tratamiento excepto que los 250  $\mu$ L de la solución de enzima se agregaran después de adicionar el ATC. Se deja en reposo una hora, centrifugándose a 6500 rpm durante 25 minutos y determinando la absorbancia a 280 nm contra un blanco de reactivos (0.75 mL de ATC, 0.5 mL de regulador de fosfatos, 0.5 M, pH 7.6) (Ortega y Del Castillo, 1966; Oliver, 1999).

### **6.7 Determinación de biomasa en los cultivos de células en suspensión**

Para la determinación de la biomasa se pesaron membranas de 0.45  $\mu$ m, filtrándose a través de ellas un mL de cultivo en suspensión, las membranas se colocaron en una estufa a 60° C, hasta que alcanzaron un peso constante y por diferencia de pesos se calculó el peso seco de las células presentes por mL de medio de cultivo en suspensión de acuerdo a Badillo, et al. (2002).

### **6.8 Determinación de la viabilidad de las células de *Jacaratia mexicana***

Para preparar el reactivo de azul de Tripano al 20 % en PBS (PBS, regulador de fosfatos: NaCl 8.75 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.25 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L y KCl 0.2 g/L a pH 7.2-7.3. Se adicionó azul de tripano 1:1, colocando una alícuota conocida en el hematocitómetro y observándose al microscopio, las células fueron contadas, las células vivas aparecen refringentes y las muertas se tiñen de azul. Las diluciones fueron tomadas en cuenta para el cálculo del número de células/mL.

## **6.9 Determinación de proteína en medios en suspensión**

La cantidad de proteína en los medios en suspensión se determinó por el método de Bradford, (1976). A 0.25 mL de medio de cultivo filtrado se le adicionó 0.75 mL de reactivo de Bradford. Realizando por triplicado leyendo la absorbancia a 595 nm. Se calculó el contenido de proteína mediante la ecuación de la recta obtenida de la curva tipo de Bradford (ver anexo).

## **6.10 Determinación de consumo de la fuente de carbono en los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana***

Se determinó el consumo de sacarosa en los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en suspensión por el método de la antrona (Van Handel, 1967). A 25  $\mu$ L del medio de cultivo filtrado se le adicionó 25  $\mu$ L de una solución de KOH al 30%. Las mezclas de reacción fueron colocadas en un baño de agua a ebullición por 10 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 0.75 mL del reactivo de antrona preparado en el momento, colocándose en un baño a 40° C por 10 minutos y se leyó la absorbancia a 620 nm. La concentración de sacarosa fue determinada usando una ecuación de la curva tipo de sacarosa (ver anexo).

## **6.11 Estudio del efecto de inductores en la producción de enzimas proteolíticas de *Jacaratia mexicana* a nivel matraz**

Al medio MS9 completo en sales con 0.5 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de BAP y 4% de sacarosa, se le adicionó hidrolizado de caseína (bacto-triptona) como inductor en concentración de 0.05 y 0.1% (p/v). Se usaron cuatro matraces con 25 mL de medio de cultivo de cada concentración de inductor, incluyendo al control (sin el

hidrolizado de caseína). Los matraces con el medio de cultivo fueron esterilizados 15 minutos a 121° C, una vez fríos se inocularon con 5% (pf/v) de biomasa. Se sometieron a agitación a 95 rpm y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, 25 ± 3° C. El estudio duró ocho semanas usando tres lotes diferentes. Cada semana se tomó una muestra de cultivo para determinar actividad proteolítica, biomasa, consumo de fuente de carbono y proteína. Se adicionó medio fresco cada semana.

## **6.12 Estudio del efecto de un elicitor en la producción de enzimas proteolíticas en cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* a nivel matraz**

### **6.12.1 Preparación del elicitor.**

El elicitor se obtuvo de un cultivo de *Aspergillus niger* en medio MS libre de fitohormonas con un pH de 6.0 ajustado antes de ser esterilizado. Se esterilizó 15 minutos a 121° C. Una vez frío fue inoculado con una asada de un tubo inclinado de *A. niger*. Una vez inoculado el medio se mantuvo en suspensión en una agitadora a 140 rpm, 25° C por 6 días. Posteriormente se filtró el cultivo con papel filtro, el filtrado fue sometido a sonicación en un equipo de ultrasonido (4 pulsos de 10 min) a temperatura ambiente. El sonificado fue filtrado con una membrana de 0.22 µm, y este filtrado se esterilizó a 121° C por 20 minutos para ser refiltrado con una membrana de 0.22 µm. El filtrado final se utilizó como elicitor adicionándose al cultivo después de 21 días de iniciado el cultivo. (Xu, et al., 1998). La concentración del elicitor fue determinada por medio del método del orcinol-ácido sulfúrico y las concentraciones utilizadas fueron 25, 50 y 75 mg/L expresadas como mg/L de glucosa.

### **6.12.2 Determinación de la concentración de elicitor**

Se determinó la concentración del elicitor por el método del orcinol-ácido sulfúrico (Francois, et al., 1961). 100 µL del último filtrado de las células sonicadas de *A. niger* fueron colocados en un tubo eppendorf y se le adicionó 850 µL de una solución de orcinol-ácido sulfúrico (7.5 volúmenes de ácido-agua y un volumen de orcinol). Estas mezclas fueron colocadas en un baño a 80° C durante 45 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 505 nm. La concentración de glucosa fue determinada usando la ecuación de la curva tipo de glucosa. El ácido sulfúrico se preparó en agua en una relación de 3:2 v/v.

### **6.12.3 Preparación del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en suspensión**

Se prepararon 16 matraces con 25 mL medio MS9 completo en sales en suspensión con 2,4-D y BAP 0.5 mg/L y 4% de sacarosa, fueron inoculados con 5% (p/v) peso fresco, y se sometieron a agitación a 95 rpm y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, 25 ± 3° C. A los 21 días del cultivo se adicionó el extracto de *A. niger* como elicitor a los cuatro matraces de cada concentración (25, 50 y 75 mg/L) incluyendo al cultivo control, al que no se le adicionó elicitor. Los matraces se mantuvieron en agitación en las mismas condiciones arriba mencionadas durante 35 días. Cada semana fue tomada una muestra de los cultivos para determinar actividad proteolítica, biomasa, consumo de fuente de carbono y proteína. Se adicionó medio fresco cada semana.

## **6.13 Cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en biorreactor con el inductor**

### **6.13.1 Preparación del inóculo con inductor para cultivo en biorreactor**

A 500 mL del medio MS9, completo en sales con 0.5 mg/L 2,4-D y 0.5 mg/L de BAP se le adicionó 0.05% (p/v) del inductor (hidrolizado de caseína) y sacarosa al 4%. Se esterilizó durante 15 minutos a 121° C. Después de que este alcanzó la temperatura del laboratorio fue inoculado con los callos obtenidos en la sección 6.3. El inóculo representaba el 4% (p/v) en peso fresco. El cultivo del inóculo se mantuvo durante 21 días, en agitación a 95 rpm, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y a  $25 \pm 3^\circ$  C, y cada semana fue tomada una muestra para determinar actividad enzimática, proteína, consumo de fuente de carbono y biomasa.

### **6.13.2 Condiciones de cultivo en el biorreactor con el inductor**

El medio MS9, completo en sales con 0.5 mg/L 2,4-D y 0.5 mg/L de BAP, adicionado con 0.05% del hidrolizado de caseína y 4% de sacarosa, se colocó en el biorreactor y esterilizó durante 25 minutos a 121° C. Después de que éste alcanzó la temperatura del laboratorio se adicionó el inóculo preparado como se indica en 6.15.1. El volumen final de trabajo fue de 800 mL y el inóculo de 8% (p/v) en peso fresco. La aireación fue de 0.5 vvm, el cultivo se mantuvo a  $25 \pm 3^\circ$  C. En este caso se adicionó ácido bórico al 0.05% como antimicótico y 100 mg de cefotaxima como antibiótico por cada litro de medio de cultivo. Cada semana se tomó muestra para determinar actividad enzimática, proteína, consumo de fuente de carbono, viabilidad y biomasa.

## **6.14 Cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en biorreactor, efecto de un elicitor**

### **6.14.1 Preparación del inóculo con elicitor para cultivo en biorreactor**

A 500 mL del medio MS9, completo en sales con 0.5 mg/L 2,4-D y 0.5 mg/L de BAP se le adicionó 25 mg/L del elicitor de *A. niger* y sacarosa al 4%. Se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C. Después de que esté alcanzó la temperatura del laboratorio fue inoculado con los callos obtenidos en la sección 6.3. El inóculo fue 4% (p/v) en peso fresco. El cultivo del inóculo se mantuvo durante 21 días, en agitación a 95 rpm, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y a  $25 \pm 3$  °C, y cada semana fue tomada una muestra para determinar actividad enzimática, proteína, consumo de fuente de carbono y biomasa.

### **6.14.2 Condiciones de cultivo en el biorreactor con el elicitor**

El medio MS9, completo en sales con 0.5 mg/L 2,4-D y 0.5 mg/L de BAP. Adicionado con 25 mg/L de elicitor y sacarosa al 4%. Fue colocado en el biorreactor y se esterilizo durante 25 minutos a 121° C. Después de que éste alcanzó la temperatura del laboratorio, fue adicionado el inóculo preparado como se indica en 6.16.1. Este inóculo representaba el 8% (p/v) en peso fresco del volumen total del biorreactor.

Las condiciones de trabajo fueron: aireación de 0.5 vvm,  $25 \pm 3$  °C y el volumen final de trabajo de 800 mL. En este caso se adicionó ácido bórico al 0.05% como antimicótico y 100 mg de cefotaxima por cada litro de medio de cultivo como antibiótico. Cada semana fue tomada una muestra para determinar actividad enzimática, proteína, consumo de fuente de carbono, viabilidad y biomasa. El

extracto de *A. niger* fue adicionado a los 14 y 28 días de haber iniciado el cultivo en el biorreactor.

### **6.15 Caracterización preliminar de la(s) proteasa(s) obtenidas en cultivos in vitro**

Al finalizar el cultivo celular en el biorreactor se recuperan las proteasas de los medios de cultivo de acuerdo al siguiente protocolo:

Se colocaron 70 mL del medio recuperado en matraces kitasato de 250 mL, se congeló y liofilizó para reducir el volumen. El liofilizado fue filtrado con papel, después con membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$ . Con el propósito de eliminar sales y metabolitos producidos por las células, y también para concentrar la(s) proteasa(s); se usó una celda de ultrafiltración con capacidad de 50 mL, con una presión de 2.812  $\text{Kg}_f/\text{cm}^2$  (40 psi) con agitación y un flujo de 10 mL/h, usando una membrana Millipore de celulosa de 3 kD.

#### **6.15.1 Purificación por cromatografía de intercambio catiónico**

Se purificó por cromatografía de intercambio iónico en un equipo Akta PRIME. La columna utilizada fue una Resource S de un mL. Como fase móvil se utilizó regulador de fosfatos de sodio 0.05 M (fase A) y para el gradiente regulador de fosfatos de sodio 0.05M con cloruro de sodio 1M (fase B), ambos con pH 6.3.

Antes de pasar la preparación por la columna de intercambio catiónico la muestra de proteasas del medio de cultivo donde crecieron la células de *Jacaratia mexicana* se filtró con membranas millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  y se equilibró la solución de proteínas con la solución utilizada como fase móvil (regulador de fosfatos 0.05M pH 6.3) a una relación de 1:1 (v/v). Se utilizó un bucle de inyección de 500  $\mu\text{L}$ . La columna se lavó con un programa específico, pasando primero etanol al

20%, después agua Milli Q y finalmente Fase A en el puerto Terminal A y Fase B en el puerto B. Después de realizar el lavado se equilibró primero pasando dos o tres volúmenes de columna de fase A y después cuatro o cinco volúmenes de columna de fase B, finalmente cinco volúmenes de columna con fase A. Se colectan fracciones de un mL, a las cuales se determinó la absorbancia a 280 nm y actividad proteolítica.

### **6.15.2 Determinación del peso molecular de las proteasas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Para caracterizar a las proteasas de los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* se les determinó el peso molecular por electroforesis de acuerdo al siguiente protocolo:

El gel separador de acrilamida al 12% para un volumen de cinco mL se preparó con 1.7 mL de agua, dos mL. de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 1.25 mL de tris 2 M pH 8.8, 25 µL PSA, 2.5 µL TEMED, 50 µL SDS al 10%. (Ver anexo). Se vació la acrilamida y se dejó polimerizar 20 minutos.

El gel concentrador de acrilamida al 4% para un volumen de dos mL se preparó con 25 mL de agua, 0.275 mL. de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 0.525 mL de tris 2 M pH 6.8, 10 µL PSA, 2 µL TEMED)

Se vació la acrilamida, se colocó el peine formador de pozos y dejó polimerizar 20 minutos. Se sacó el peine, se limpiaron los pozos y colocaron las muestras.

Las muestras se corrieron a 80 mV durante la etapa de concentración y a 120 mV durante la etapa de separación utilizando una solución amortiguadora de Tris.Glicina con SDS como amortiguador de corrida.



## **6.16 Evaluación del desempeño del biorreactor airlift**

### **6.16.1 Determinación del tiempo de mezclado por método de adición de pulsos (Nielsen y Villadsen, 1994)**

El biorreactor se llenó con 800 mL de agua de agua destilada. Se suministró aire, midiendo el gasto con un rotámetro. Para medir el pH fue colocado un electrodo dentro del biorreactor. El pH se ajustó a aproximadamente 9.5 con hidróxido de sodio 6 N. Para determinar el tiempo de mezclado se adicionaron 0.6 mL de ácido clorhídrico 6 N. El tiempo que tardó en bajar y estabilizarse el pH, fue considerado como el tiempo de mezclado.

### **6.16.2 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $k_{La}$ por el método dinámico (Nielsen y Villadsen, 1994)**

El biorreactor se lleno con 800 mL de agua destilada y un electrodo para medir oxígeno disuelto fue sumergido dentro del biorreactor. Se suministró aire hasta alcanzar el 100% de oxígeno disuelto (aproximadamente). El suministro de aire fue cambiado por nitrógeno hasta alcanzar 0% de oxígeno disuelto (aproximadamente). Nuevamente fue suministrado aire y se tomaron lecturas de oxígeno disuelto cada diez segundos. Los valores registrados representaban el porcentaje de oxígeno disuelto, a partir de ellos fue calculado el oxígeno disuelto en mg/L (C). Tomando un valor de concentración de oxígeno disuelto en condiciones de saturación ( $C^*$ ) de 6.7 mg/L (valor de oxígeno disuelto a 25° C y 1 atm de presión) se obtiene la diferencia entre  $C^*$  y C. Fue determinado el logaritmo natural de la diferencia. Se obtuvo la gráfica del  $\ln(C^*-C)$  contra tiempo y el valor absoluto de la pendiente obtenida fue el  $k_{La}$ .

Las siguientes ecuaciones sustentan el método utilizado:

$$dC_L / dt = k_L a (C^* - C)$$

$$dC_L / (C^* - C) = k_L a dt$$

$$\ln |C^* - C| = -k_L a t$$

### ***6.17 Estimado de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en el biorreactor airlift***

Para estimar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de las células vegetales se consideró que éstas siguen un crecimiento semejante al crecimiento microbiano. Así para estimar la  $\mu$  se uso la siguiente ecuación:

$$dX/dt = \mu X$$

donde,  $dX/dt$  es el cambio de la concentración celular (peso seco) en un tiempo determinado,  $X$  es la concentración celular (peso seco).

Integrando la ecuación, se obtiene:

$$\ln X_1 - \ln X = \mu \Delta t$$

$$\ln X_1 = \mu \Delta t + \ln X$$

Al trazar el  $\ln X$  contra  $t$ , obtenemos una línea recta cuya pendiente es el valor de  $\mu$  (Quintero, 1990).

## 7 RESULTADOS

### **7.1 Elección del medio de cultivo para la inducción de callos de *Jacaratia mexicana***

De las investigaciones de Badillo, et al., (2002), Barrera y Oliver, (2004) y Oliver et al., (2005) se observó que con tres formulaciones del medio MS (MS1, MS5, MS9) se lograron las mejores tasas de crecimiento y síntesis de proteasas en los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana*. Con el propósito de evaluar el efecto de la concentración del 2,4-D usando estas tres formulaciones y encontrar la más adecuada en cuanto a tasa de crecimiento y producción de enzimas para realizar los estudios de esta tesis.

Los resultados obtenidos en este estudio son presentados en las figuras 4 y 5 en las que se observan la tasa de crecimiento y actividad enzimática en el medio de cultivo donde crecieron los callos.

En la figura 4 se muestran los resultados con las tres formulaciones de MS (MS1, MS5, MS9) con 2,4-D (a = 0.25 mg/L, b = 0,5 mg/L). Como puede observarse en los medios MS1a y MS1b, la tasa de crecimiento es similar, lo mismo ocurre en los medios MS5a y MS5b, por lo que la concentración del 2,4-D aparentemente no influye en el crecimiento de los callos. En cambio con los medios MS9, se observa claramente una diferencia entre el MS9a y el MS9b. La tasa de crecimiento obtenida a los 30 días de haber inducido callos en el medio MS9b muestra un valor de aproximadamente cuatro veces mayor al obtenido con el MS1a y MS1b. Inclusive la tasa de crecimiento obtenida a los 45 días también es mayor (aproximadamente dos veces) que la obtenida al mismo tiempo con el MS1a y MS1b, por lo tanto el medio MS9b fue el mejor para obtener la mayor tasa de

crecimiento. Por otro lado el medio MS9a presenta una tasa de crecimiento similar al resto de los medio ya descritos (MS1a y MS1b, MS5a y MS5b). En nuestro caso la tasa de crecimiento es determinante para seleccionar el medio de cultivo, ya que conocemos que la producción de enzimas proteolíticas en los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* esta asociada al crecimiento.

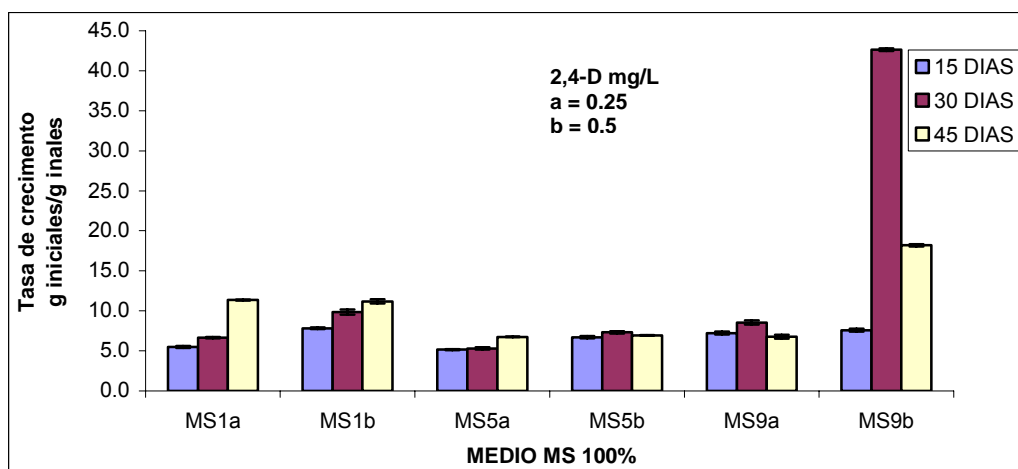


Figura 4. Efecto del 2,4-D en la tasa de crecimiento de callos crecidos en las diferentes formulaciones del medio MS: MS1, MS5 y MS9. (n = 3, desviación estándar < 5%)

Estos resultados están de acuerdo a los obtenidos por Badillo, et al., (2002), Barrera y Oliver, (2004) y Oliver et al., (2005).

En la figura 5 observamos la actividad proteolítica de los medios de cultivo en donde crecieron los callos. Cada una de las barras representa la actividad proteolítica determinada en cada resiembra de los callos a medio fresco.

La actividad proteolítica con el medio MS1a es más alta que la obtenida con el medios MS1b, y mayor que la obtenida con el resto de los medios probados, sin embargo en este medio se presenta una de las menores tasas de crecimiento. Por

otro lado la actividad proteolítica en los medios MS5a y MS5b, aparentemente es similar. Sin embargo la producción de estas enzimas en el medio MS9b es mayor que en el medio MS9a y ligeramente superior a MS1b, por lo tanto con el medio MS9b (0.5 mg/L de 2,4-D) se obtiene la mayor actividad proteolítica.

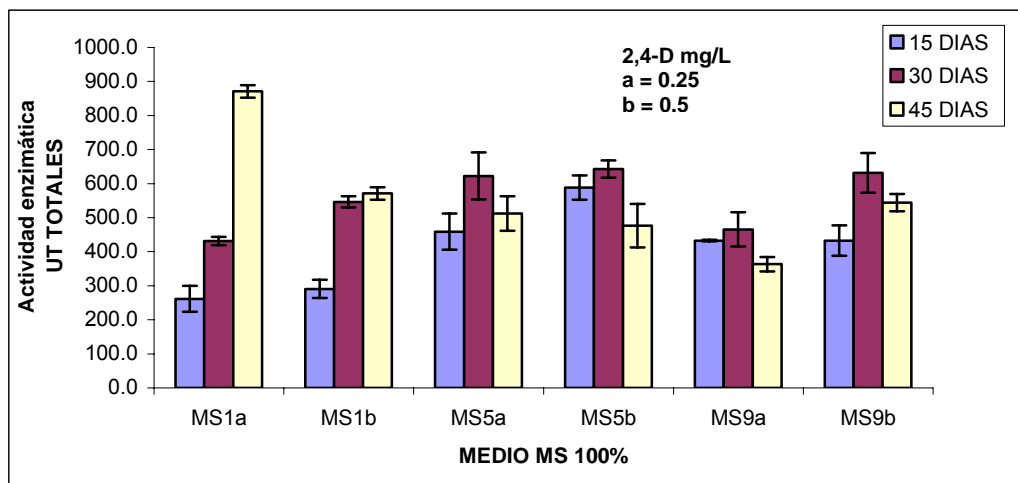


Figura 5. Efecto de la concentración del 2,4-D en la actividad proteolítica en cultivo de callos de *Jacaratia mexicana* con diferentes formulaciones del medio MS: MS1, MS5 y MS9. (n = 3)

Con base en lo arriba mencionado, el medio de cultivo seleccionado fue el MS9 completo en sales y con 0.5mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de BAP (MS9b) para realizar los estudios programados. Esta elección fue sustentada también con los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo de trabajo.

## 7.2 Estudio del efecto de un inductor a nivel matraz

Los resultados de la cinética del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* llevados a cabo con dos concentraciones de inductor son mostrados en la figura 6. Los cultivos de células en suspensión a nivel matraz se mantuvieron durante 80 días. Como puede observarse en la figura 6 la producción de enzima proteolítica presentó variaciones, que probablemente se deban a la disminución de la

concentración de sacarosa, es decir al consumo de sacarosa, sin embargo con las dos concentraciones de hidrolizado de caseína es notable el incremento de la actividad proteolítica determinada en los medios de cultivo. Los incrementos encontrados a los 35 días de haber iniciado el experimento fueron con 0.05% de 229%  $\pm$  21.8 y con 0.1% de 145%  $\pm$  14.4. Siendo mayor el incremento con 0.05% de inductor. Por otro lado se observó un primer máximo en la actividad proteolítica aproximadamente a los 35 días de los cultivo. De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) realizado con el programa informático SAS versión 6.1, la diferencia entre los valores de actividad enzimática con hidrolizado de caseína (inductor) y el control es significativa. El valor de esta diferencia es de 72900 UT/L. El programa SAS versión 6.1 fue utilizado para realizar el análisis estadístico de los valores presentados en esta tesis.

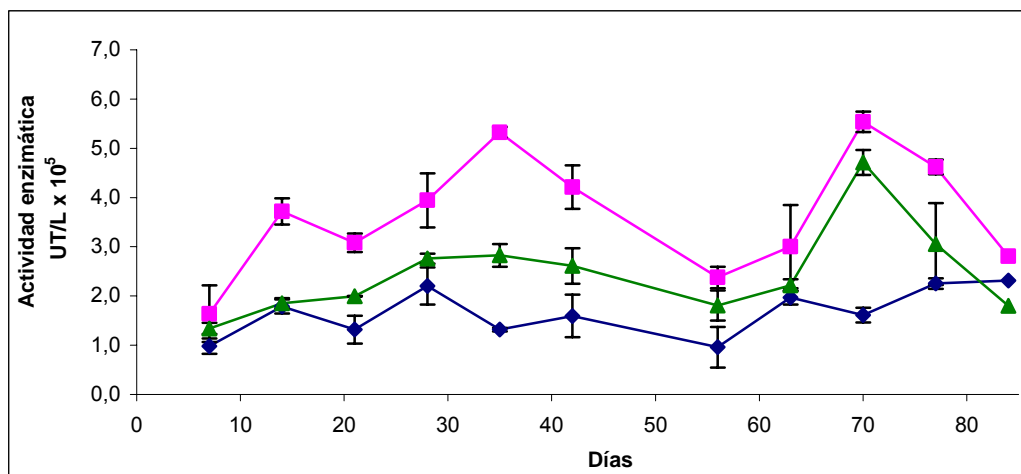


Figura 6. Efecto del hidrolizado de caseína (inductor) en la actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo donde crecieron las célula de *Jacaratia mexicana*; (■) 0.05%, (▲) 0.1% y (◆) control, nivel matraz. (n = 3)

Con respecto al consumo de sacarosa el mayor fue con 0.05% de inductor. La estimación semanal del consumo de sacarosa en presencia del inductor fue de 36.54% a 0.05% y de 31.9% con 0.1% de inductor y para el cultivo control, de

33.5%. El mayor consumo de sacarosa con 0.05% de inductor coincide con la mayor producción de enzima(s) proteolítica(s).

La figura 7 muestra que el crecimiento celular presenta un comportamiento similar en las dos concentraciones del inductor probadas, lo que sugiere que la presencia del inductor no afecta el desarrollo celular de *Jacaratia mexicana*. También podemos notar que existe un crecimiento diáuxico. La duración de la fase exponencial es de aproximadamente de 10 días, y posteriormente se alcanza la fase estacionaria. La diferencia de los valores de crecimiento celular entre el control y 0.05% de inductor que se aprecian en la gráfica 7 no son significativas, pero para 0.1% de inductor si hay una diferencia significativa de 0.843.

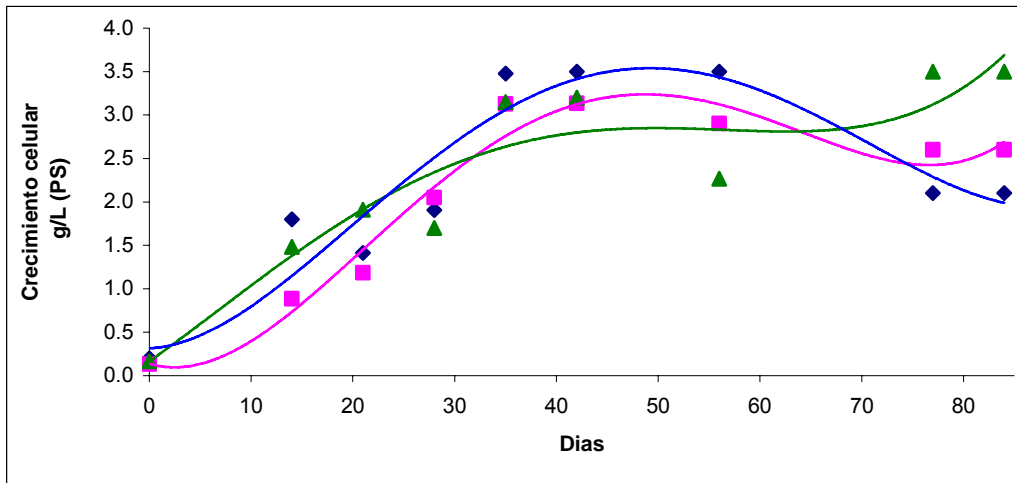


Figura 7. Efecto del hidrolizado de caseína (inductor) en el desarrollo del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en suspensión; (■) 0.05%, (▲) 0.1% y (◆) sin inductor, nivel matraz. (n = 3)

En la figura 8 se presenta el logaritmo base 10 (log) del crecimiento celular en donde es posible distinguir de manera más clara que la fase exponencial tiene una duración aproximada de 12 días.

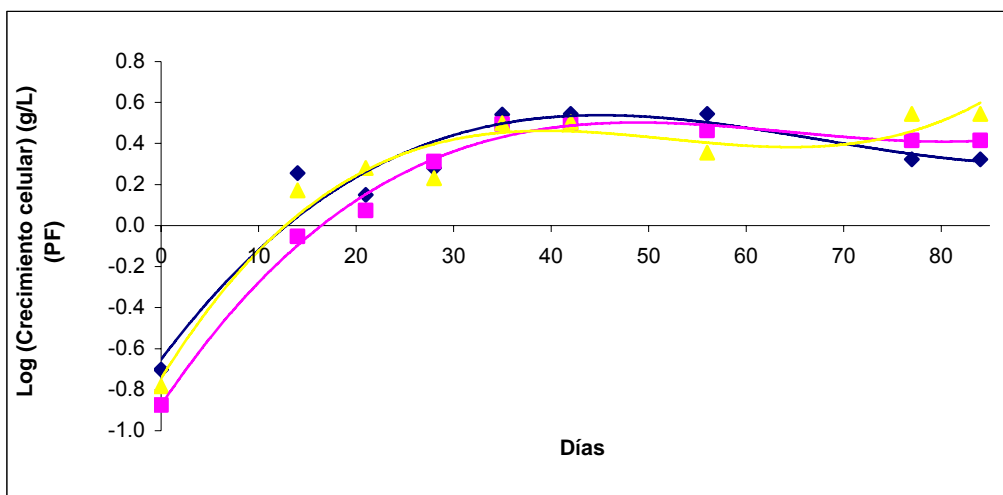


Figura 8. Efecto del hidrolizado de caseína (inductor) en el desarrollo del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en suspensión presentado en escala logarítmica; (■) 0.05%, (▲) 0.1% y (◆) sin inductor, nivel matraz.

### **7.3 Preparación del inóculo con inductor para cultivo en biorreactor**

Los resultados de la cinética de cultivo que se usó como inóculo en el cultivo en biorreactor con inductor son mostrados en las figuras 9, 10, 11 y 12. En la figura 9 se presenta la determinación de la actividad proteolítica en el medio de cultivo, como puede apreciarse se observa un aumento de la actividad enzimática a lo largo de los 21 días, en los que creció el inóculo. Los datos indican que las células estaban produciendo las enzimas proteolíticas. Durante esta cinética se cambió medio fresco a los 14 días de establecido el cultivo. A las muestras tomadas cada siete días y al medio de cultivo agotado se les determinó actividad proteolítica, proteína, consumo de sacarosa y biomasa (peso fresco y peso seco).



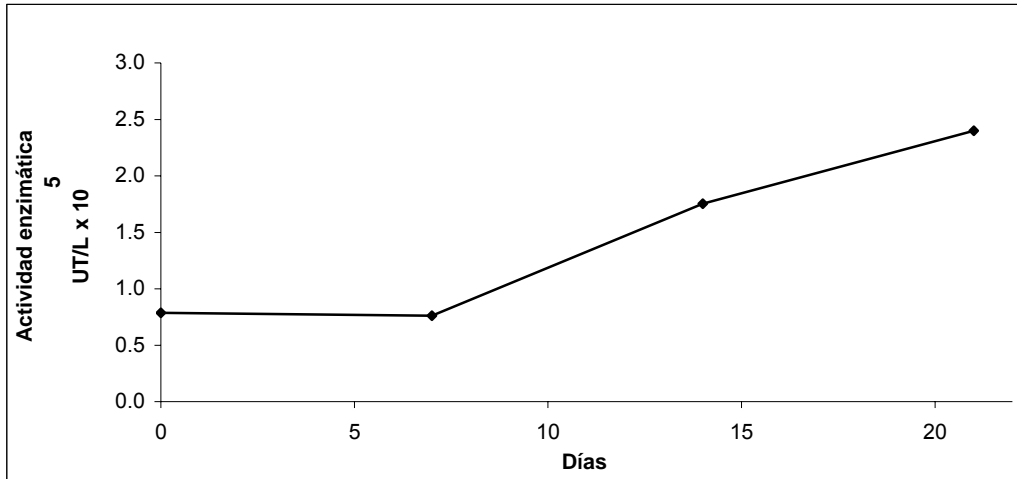


Figura 9. Actividad proteolítica del medio de cultivo celular de *Jacaratia mexicana* con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor).

Como se observa en la figura 10, el desarrollo de la biomasa presenta una fase log que inicia aproximadamente a los siete días como se observó en la cinética de cultivo celular de *Jacaratia mexicana* con inductor (figura 7), lo cual indicó que la biomasa utilizada para establecer el cultivo celular se encontraba en óptimas condiciones fisiológicas (edad, tamaño, etc.). Una vez alcanzada esta fase, el cultivo llegó a la fase estacionaria. Cabe mencionar que no fue observada la fase lag.

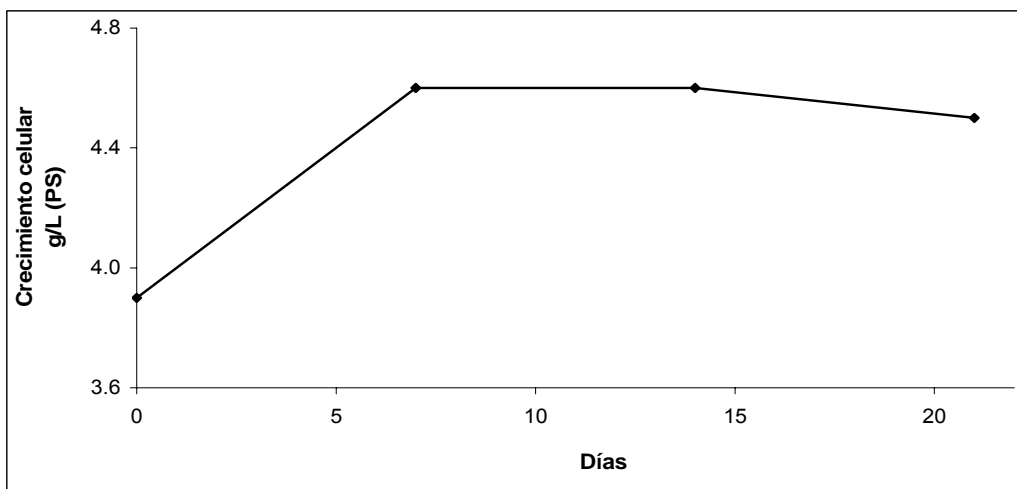


Figura 10. Desarrollo de la biomasa del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* (inóculo) con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor).

La figura 11 muestra que el consumo de la sacarosa durante el desarrollo del cultivo de *Jacaratia mexicana* fue de aproximadamente 40% en siete días, lo cual corresponde con datos presentados del consumo de sacarosa en los cultivos con el inductor en el apartado 7.2. Estos resultados fueron útiles para confirmar la velocidad de consumo de sacarosa de las células de *Jacaratia mexicana* en presencia del inductor (hidrolizado de caseína) mencionada en el punto 7.2. Cabe mencionar que en este cultivo se adicionó medio fresco cada 14 días.

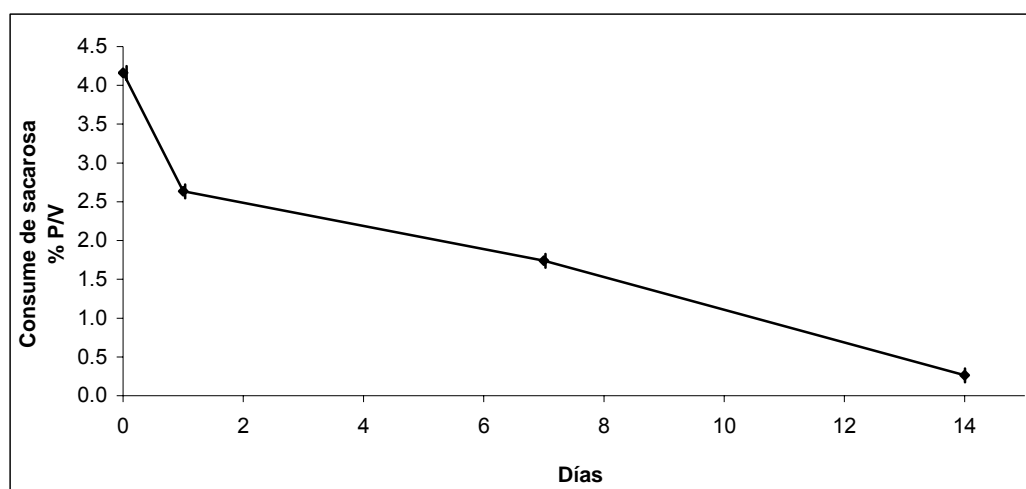


Figura 11. Consumo de sacarosa del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* (inóculo) con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor).

En la figura 12 es mostrada la concentración de proteína determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* y se observa que la concentración de proteína aumentó durante el desarrollo del cultivo, lo cual coincide con el aumento de la actividad proteolítica. El valor a los 14 días es ligeramente menor, esta disminución podría atribuirse a un error experimental, ya que para el siguiente punto (21 días) la proteína aumenta nuevamente, en concordancia con la actividad proteolítica.

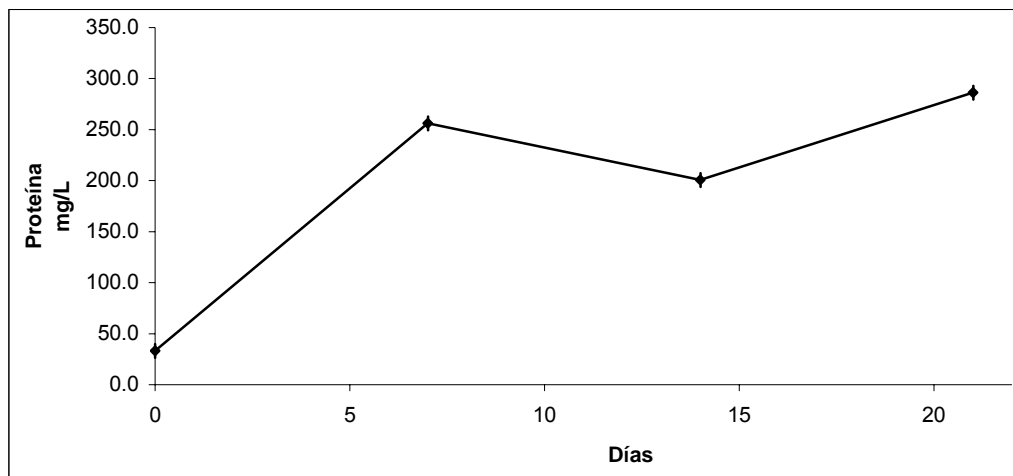


Figura 12. Determinación de proteína del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor).

#### **7.4 Cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor con el inductor**

Los resultados del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor con el inductor se presentan en las siguientes figuras.

En la figura 13 se muestra la actividad enzimática determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana*. En la gráfica es posible apreciar que la actividad enzimática se incrementa durante el transcurso del cultivo. Sin embargo esta presenta una disminución a los 14 días, y otra menos evidente a los 28 días de haberse iniciado el cultivo y se puede atribuir al periodo de adaptación de las células en el biorreactor. Una vez que alcanzó el valor máximo el día 42, esta decae ligeramente a los 49 días en donde se dio por terminado el cultivo.

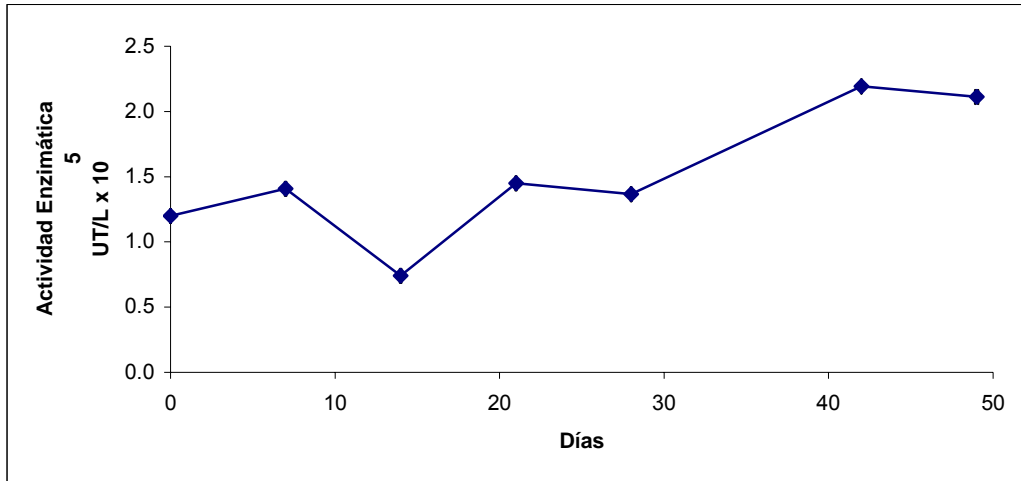


Figura 13. Actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor airlift con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor).

El crecimiento celular es mostrado en la figura 14. Se puede observar que el valor de la biomasa incrementó durante el cultivo, con ligeras disminuciones presentadas en los días 14 y 28 de haberse iniciado el cultivo, lo cual podría deberse a la disminución de sacarosa. Este comportamiento coincide con el de la actividad proteolítica, que presenta disminuciones en los mismos días.

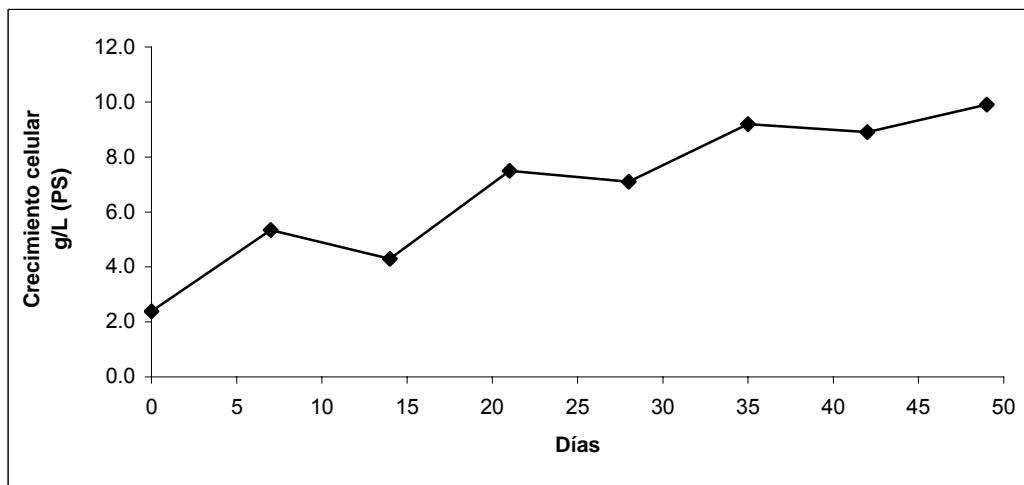


Figura 14. Crecimiento celular de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor airlift con 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor).

En cuanto a la concentración de proteína determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* en el biorreactor el valor máximo fue de  $13.67 \pm 0.004$  mg/L determinado el día 35 del cultivo.

El consumo de sacarosa durante la cinética fue de  $41.05 \pm 3.26\%$  a 7 días. Estos resultados coinciden con la velocidad de consumo de sacarosa del cultivo de células de *Jacaratia mexicana* en presencia del inductor (hidrolizado de caseína) a nivel matraz mencionada en los puntos 7.2 y 7.3.

En cuanto a la viabilidad celular de las muestras tomadas durante el cultivo. Las células presentaron una viabilidad en relación 5:1, es decir por cada célula no viable eran detectadas 5 viables lo que significa  $1.60 \times 10^5$  células viables/mL. Este comportamiento se presentó durante casi toda la cinética, solo al final de la misma la relación fue de 5:2.

### **7.5 Estudio del efecto de un elicitor de *A. niger* a nivel matraz**

Los resultados obtenidos del estudio del efecto del elicitor extracto de *A. niger* en el cultivo celular de *Jacaratia mexicana* son los siguientes. En la figura 15 se observa un incremento en la actividad proteolítica con la concentración de 25 mg/L a los 28 días del cultivo. Con las otras dos concentraciones de elicitor (50 y 75 mg/L) el incremento en la actividad enzimática no fue apreciable en comparación con el cultivo celular sin elicitor (control). La diferencia de actividad proteolítica con 25 mg/L de elicitor fue significativa con respecto al resto de las condiciones (50 y 75 mg/L de elicitor) y al control.

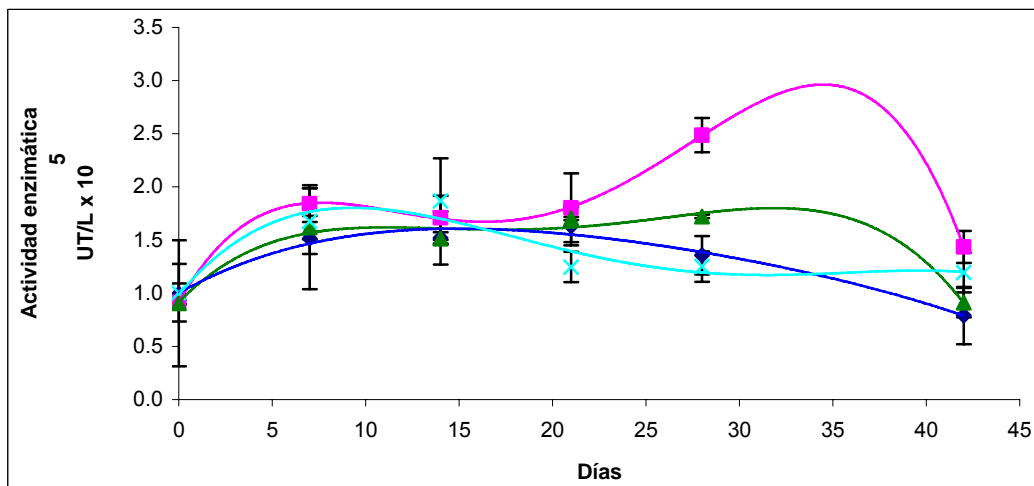


Figura 15. Efecto del extracto de *A. niger* (elicitor) en la actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo donde crecieron células de *Jacaratia mexicana*; (◆) 0 mg/L, (■) 25 mg/L, (▲) 50 mg/L, (×) 75 mg/L. (n = 3, desviación estándar < 5)

El incremento en la actividad proteolítica del medio donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* con 25 mg/L de elicitor fue 1.38 veces de actividad con respecto al control determinada a los 28 días del cultivo.

En la figura 16 en relación con el crecimiento celular determinado como g/L de peso seco se observa que en todas las concentraciones de elicitor probadas el crecimiento celular es similar, es decir la diferencia en el crecimiento celular no es significativa por la presencia del elicitor.

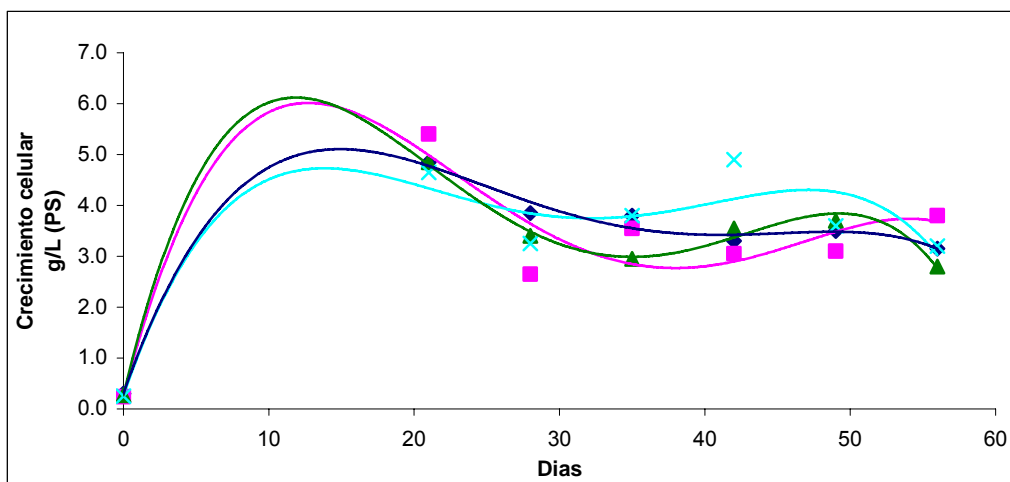


Figura 16. Efecto del extracto de *A. niger* (elicitor) en el desarrollo del cultivo celular en suspensión de *Jacaratia mexicana*; (◆) 0 mg/L, (■) 25 mg/L, (▲) 50 mg/L, (×) 75 mg/L. (n =3)

En el cuadro 3 se presentan los valores de consumo de sacarosa de 5 datos experimentales determinados cada 14 días del cultivo celular de *Jacaratia mexicana*. Se observa que el consumo de sacarosa del cultivo control, con 25 y con 50 mg/L es similar. Con la concentración de 75 mg/L el consumo de sacarosa es mayor.

Cuadro 3. Consumo de sacarosa en los cultivos de *Jacaratia mexicana* en suspensión con el extracto de *A. niger* (elicitor).

Elicitor(mg/L)	% de consumo de sacarosa a 14 días
0	83.61 ± 3.89
25	82.50 ± 5.58
50	83.83 ± 7.03
75	92.40 ± 7.50

En la Figura 17 se presenta la concentración de proteína determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* para cada una de las

concentraciones de elicitor probadas. Se obtuvieron las mismas cantidades de proteína con 50, 75 mg/L similares al control. Sin embargo se observó con 25 mg/L la cantidad de proteína fue la menor. De acuerdo a los resultados de actividad enzimática, se esperaba que la mayor cantidad de proteína correspondiera a 25 mg/L de elicitor, sin embargo esto no sucede. Esto pudo deberse a que la enzima presente tuviera una actividad proteolítica mayor con 25 mg/L que con el resto de las concentraciones o bien que con las concentraciones restantes se sintetizaron otras proteínas que no son necesariamente enzimas proteolíticas.

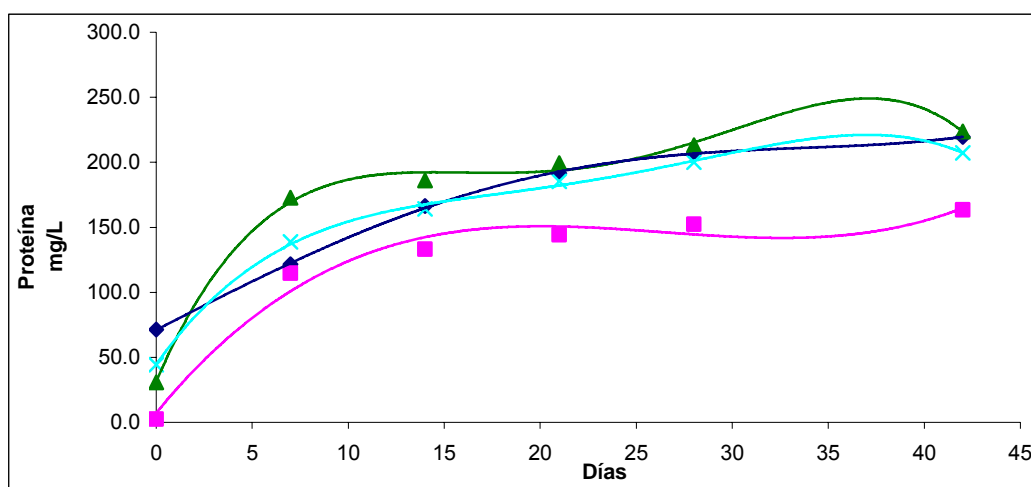


Figura 17. Efecto del extracto de *A. niger* (elicitor) en la síntesis de proteína del cultivo en suspensión de *Jacaratia mexicana* determinada en el medio de cultivo; (◆) 0 mg/L, (■) 25 mg/L, (▲) 50 mg/L, (×) 75 mg/L (n = 3)

### **7.6 Inóculo con elicitor para el cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en biorreactor**

Los resultados de la cinética del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* usado como inóculo con elicitor para el cultivo en el biorreactor se presentan en las siguientes figuras.



El la figura 18 se observa que la actividad enzimática presenta una disminución a los siete días de haberse iniciado el cultivo. Esta disminución puede atribuirse al periodo de adaptación de las células al cultivo en suspensión y posteriormente se observan incrementos constantes de la actividad proteolítica. Dichos incrementos en la actividad proteolítica, determinada en el medio de cultivo, demuestran que las células están produciendo las mencionadas enzimas. Cabe mencionar que durante esta cinética se cambio medio fresco a los 14 días de establecido el cultivo y se adicionó nuevamente 25 mg/L de elicitor. Las determinaciones de actividad proteolítica, proteína, consumo de sacarosa y biomasa (peso fresco y peso seco) fueron hechas al medio agotado y a las muestras tomadas cada siete días.

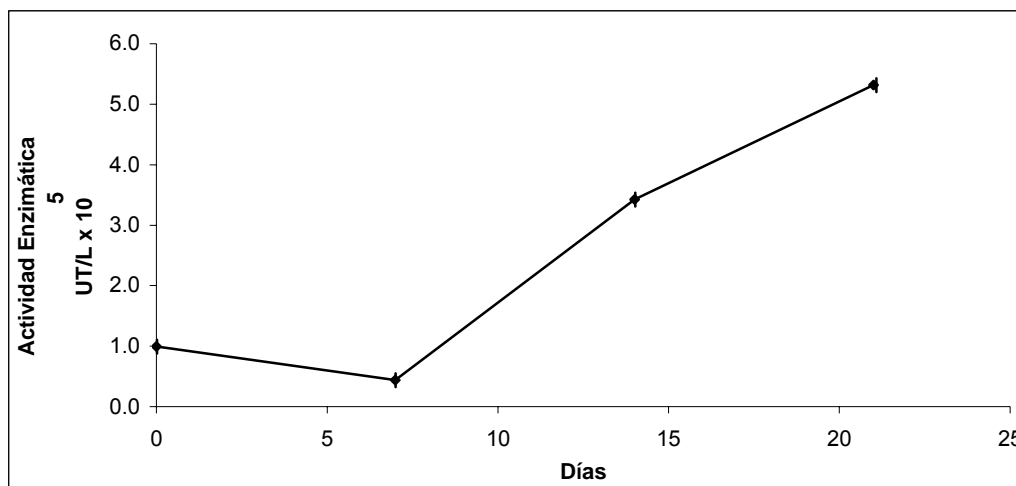


Figura 18. Actividad proteolítica del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* con 25 mg/mL de extracto de *A. niger* (elicitor) determinada en el medio de cultivo.

En la figura 19 se observa que también la proteína aumentó durante el desarrollo del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* con elicitor. Este incremento esta acorde con el aumento de la actividad enzimática presentada en la figura 18.

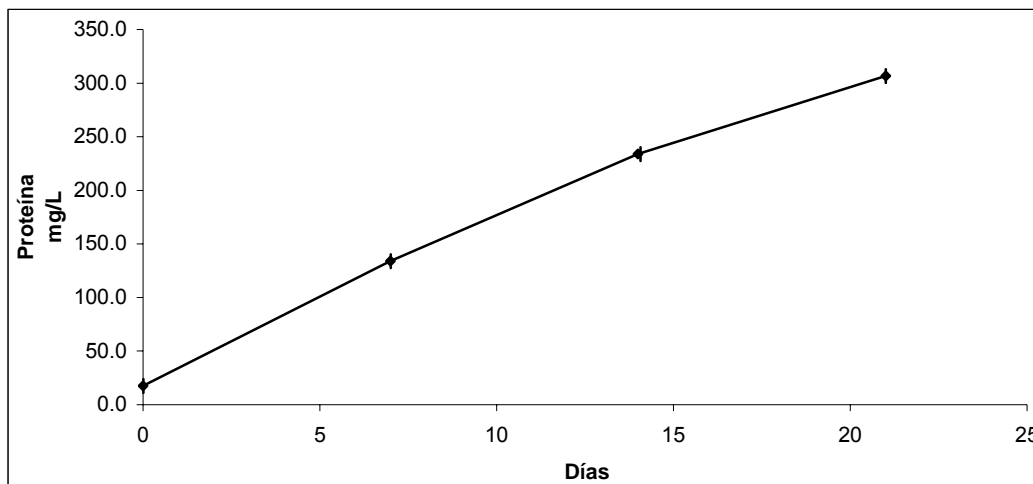


Figura 19. Determinación de proteína en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* con 25 mg/L de extracto de *A. niger* (elicitor).

En la figura 20 se presenta el crecimiento del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* con el elicitor y se observa que el desarrollo de la biomasa es adecuado para ser utilizado como inóculo en el biorreactor. Se observó un ligero descenso a los 21 días lo que podría atribuirse a un error experimental.

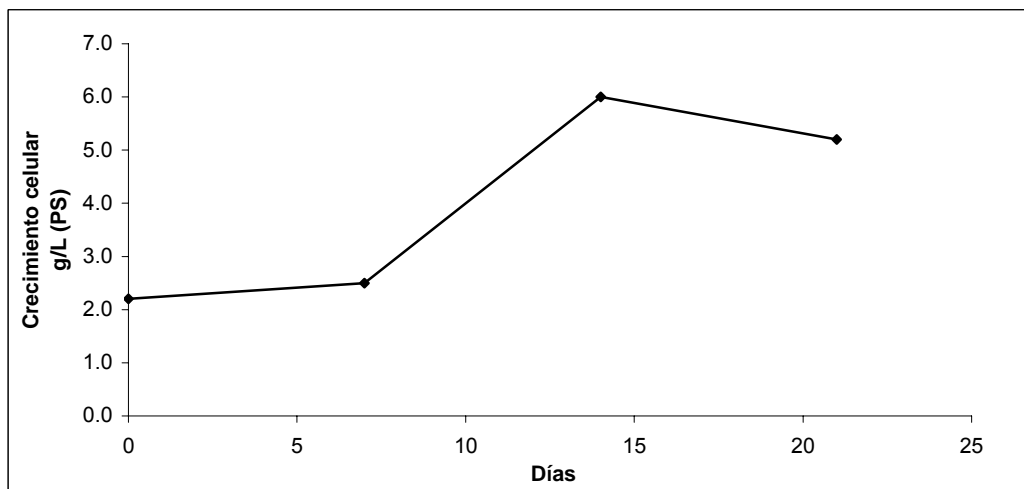


Figura 20. Desarrollo de la biomasa del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* (inóculo) adicionado con 25 mg/L del extracto de *A. niger* (elicitor).

El consumo de sacarosa observado en la gráfica 21 durante el desarrollo del cultivo de *Jacaratia mexicana* con el extracto de *A. niger* fue de aproximadamente de 40% cada semana, lo cual es similar al consumo de sacarosa en los cultivos celulares con el elicitor.

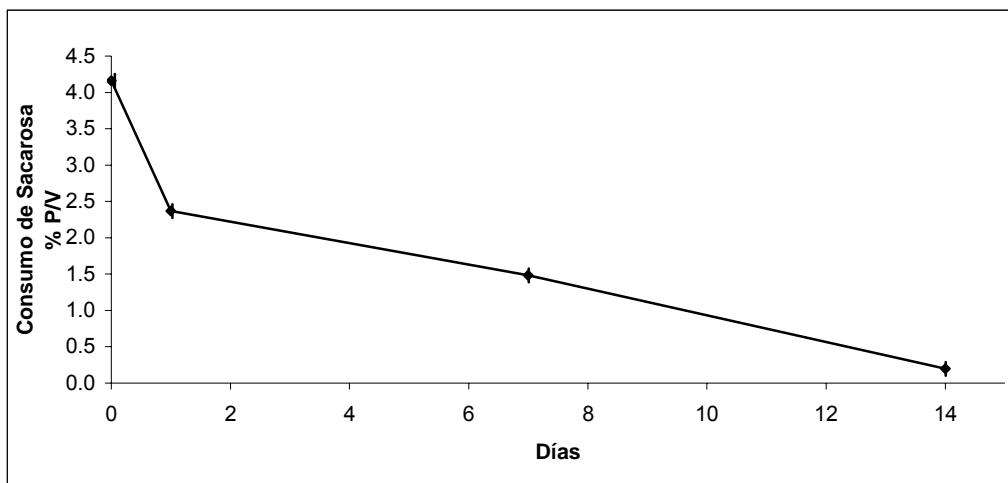


Figura 21. Consumo de sacarosa del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* (inóculo) con 25 mg/L del extracto de *A. niger* (elicitor).

Estos resultados nos indican que el inóculo se encuentra en óptimas condiciones metabólicas para usarlo como inóculo del biorreactor.

### **7.7 Cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor con el elicitor**

Los resultados del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor con el elicitor se presentan en las siguientes figuras. Las condiciones de trabajo del biorreactor fueron 0.5 vvm y 25° C.

En la figura 22 se muestra la actividad enzimática determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* en el biorreactor. En la gráfica es posible apreciar que la actividad enzimática se incrementa en el transcurso del desarrollo del cultivo. Sin embargo está presenta una disminución en

día 7, y otra menos evidente el día 28 de haberse iniciado el cultivo y la primera etapa se puede atribuir al periodo de adaptación de las células en el biorreactor. La actividad proteolítica alcanzó un valor máximo el día 35, y después decae el día 49 donde se dio por terminado el cultivo.

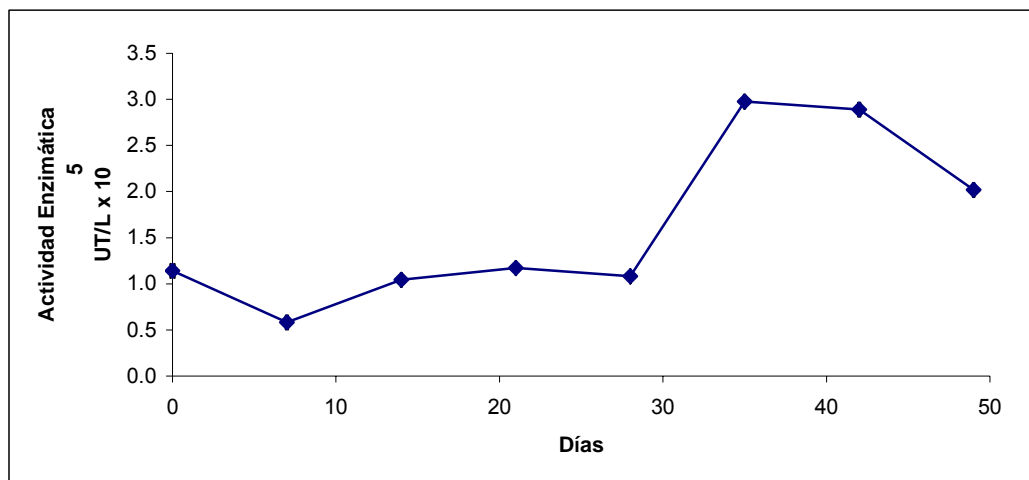


Figura 22. Actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor airlift con 25 mg/L de extracto de *A.niger* (elicitor).

El crecimiento celular es mostrado en la figura 23. Se puede observar que el valor de la biomasa incrementó en el transcurso de la cinética, con ligeras disminuciones después de 14 y 35 días de haberse iniciado el cultivo.

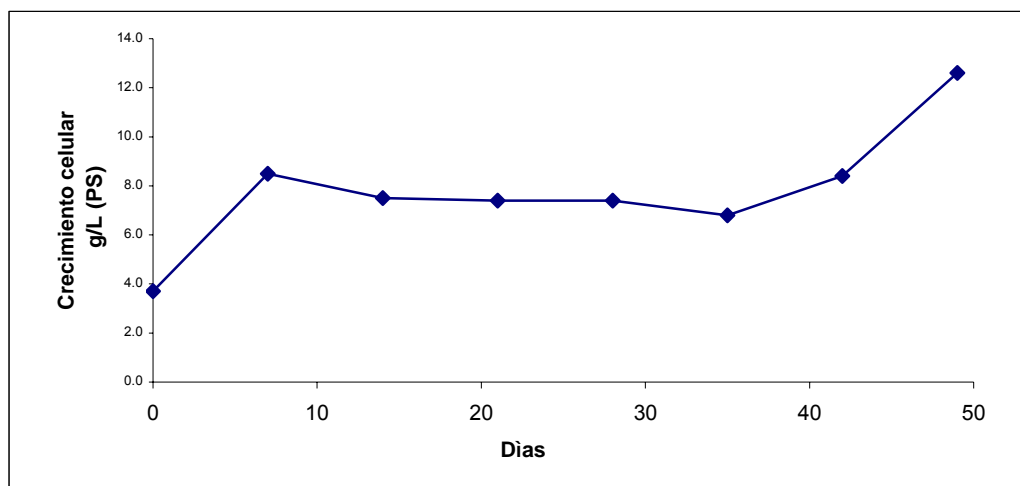


Figura 23. Crecimiento celular de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor airlift con 25 mg/L de extracto de *A.niger* (elicitor).

En cuanto a la concentración de proteína en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* en el biorreactor el valor máximo fue de  $15.16 \pm 0.007$  mg/L determinado el día 35 (datos no mostrados). El consumo de sacarosa durante la cinética fue de  $43.73 \pm 3.68\%$ . Estos resultados coinciden con la velocidad de consumo de sacarosa de las células de *Jacaratia mexicana* en presencia del inductor (hidrolizado de caseína) mencionada en los puntos 7.4 y 7.5.

Por otro lado se realizó cuenta y viabilidad celular de las muestras tomadas. Las células presentaban una viabilidad en relación 7:1, es decir por cada célula no viable eran detectadas 7 viables lo que significa  $1.4 \times 10^5$  células viables/mL. Este comportamiento se presentó durante casi toda la cinética del cultivo, solo al final de la misma la relación fue de 7:3.

Con el objeto de comparar los resultados con el inductor y el elicitor a nivel biorreactor se trazó la gráfica de actividad enzimática/crecimiento celular. Esta es

presentada en la figura 24, y en ella observamos que el efecto del inductor es mayor que el del elicitor, tal como ocurre a nivel matraz.

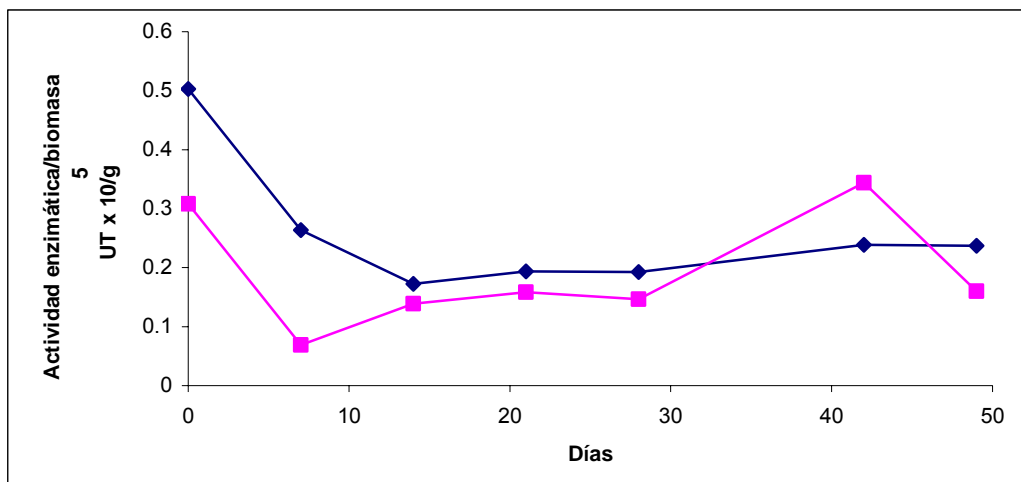


Figura 24. Actividad proteolítica/crecimiento celular determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor airlift con: (■) 25 mg/L de extracto de *A.niger* (elicitor) y (♦) 0.05% de hidrolizado de caseína (inductor).

### **7.8 Estimación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en el biorreactor airlift**

La estimación de la velocidad específica de crecimiento para el cultivo celular de *Jacaratia mexicana* con inductor fue de  $3.12 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$  ( $0.027 \text{d}^{-1}$ ) y con elicitor fue de  $2.5 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$  ( $0.022 \text{d}^{-1}$ ). Los valores obtenidos para ambos casos son similares, por lo que aparentemente el crecimiento no se vio afectado por la adición del inductor o el elicitor. Sin embargo esto no lo podemos afirmar ya que no se realizó un cultivo control a nivel biorreactor. Estos valores se calcularon con los datos del biorreactor utilizando la suposición y las ecuaciones de apartado 6.17.

## 7.9 Evaluación del desempeño del biorreactor

### 7.9.1 Tiempo de mezclado

En la figura 25 se presenta el tiempo de mezclado en función de la velocidad superficial de aire ( $v_s$ ) para la que se obtuvo el tiempo de mezclado. El tiempo de mezclado se determinó para cinco flujos de aire. Este disminuye conforme aumenta la velocidad superficial de aire. El tiempo de mezclado fue de 14 s para una velocidad superficial de aire de 0.35 cm/s. La velocidad superficial de aire del biorreactor donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* fue de 0.06 cm/s, y el tiempo de mezclado fue de 40 s.

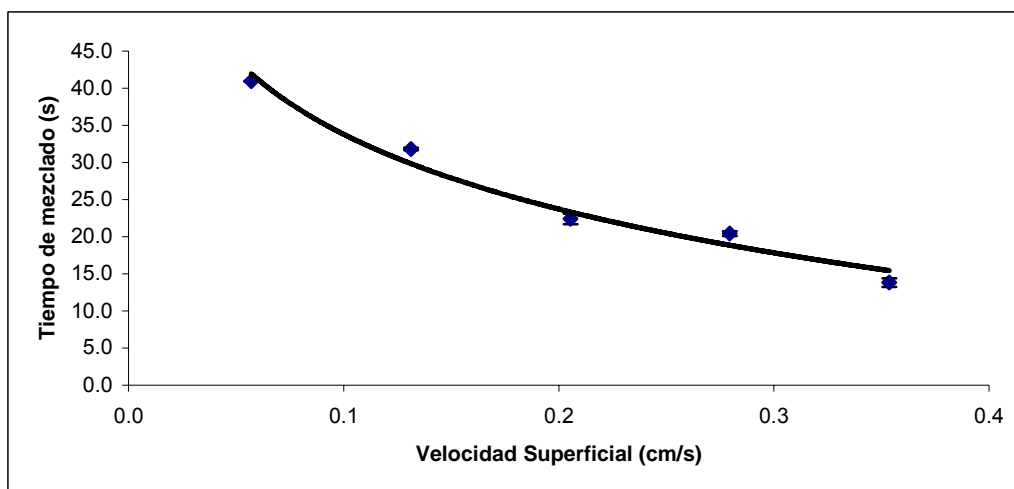


Figura 25. Tiempo de mezclado del biorreactor airlift determinado para un volumen de 800 mL de agua destilada. ( $n = 3$ , desviación estándar  $< 5\%$ ).

### 7.9.2 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

En la figura 26 se muestra el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) en función de la velocidad superficial ( $v_s$ ), empleando agua destilada. Con

una velocidad de 0.06 cm/s se encontró un  $k_{La}$  de 34.38 h<sup>-1</sup>. Usando el valor encontrado de  $k_{La}$  y tomando una diferencia de concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo de 1.0 mg/L, se obtiene una velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) de 0.93 mMol/Lh. Esta VTO es nueve veces mayor a lo requerido por las células vegetales en general, que de acuerdo a lo reportado por Kieran, et al., (1997) es del orden de 0.1 mMol/Lh.

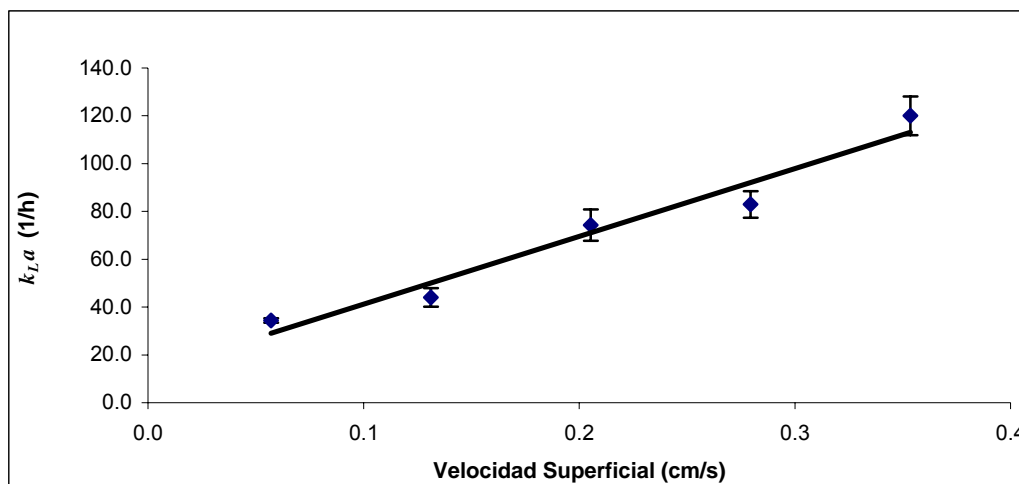


Figura 26. Coeficiente de transferencia de oxígeno del biorreactor airlift determinado para un volumen de 800 mL de agua destilada. (n = 3)

La viscosidad del medio de cultivo empleado para la producción de enzimas proteolíticas conteniendo células de *Jacaratia mexicana* es similar a la del agua destilada (Martínez, 2006). La semejanza en viscosidades hace que en el cultivo de *Jacaratia mexicana* se esperen tiempos de mezclado igualmente semejantes a los obtenidos con agua destilada.

El tiempo de mezclado y la VTO obtenidos fueron adecuados para la producción de enzimas proteolíticas y crecimiento celular de *Jacaratia mexicana*, como se observa en los resultados presentados en los apartados 7.6 y 7.7.



Los resultados de actividad enzimática y crecimiento celular obtenidos con el tiempo de mezclado y la VTO que se mantuvieron durante el desarrollo del cultivo de *Jacaratia mexicana* en el biorreactor airlift son similares a los obtenidos por Martínez, (2006). En los dos casos el valor máximo de actividad es de  $3.0 \times 10^5$  y el crecimiento celular alrededor de 150 g/L Peso Fresco (PF). Sin embargo, los valores de tiempo de mezclado, turbulencia y VTO en el trabajo de Martínez (2006) son superiores a los encontrados en esta tesis (tiempo de mezclado de 6 s y VTO 2 mMol/Lh), lo que hace suponer que la producción de enzimas proteolíticas y el crecimiento celular no son afectados por los mismos.

## **7.10 Caracterización de la(s) proteasa(s) obtenidas en cultivos *in vitro***

### **7.10.1 Determinación de peso molecular de las proteasas de los medios de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

En la figura 27, se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, con SDS, de las muestras de proteasas recuperadas del medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* en el biorreactor, después de 7 semanas del cultivo. Antes de dicha electroforesis, las muestras fueron sometidas a los procesos de liofilización y ultrafiltración. En el patrón electroforético se observa que el extracto del látex de *Jacaratia mexicana* presentó una banda de aproximadamente 24 kDa correspondiente al peso molecular de la “mexicaína” (carril 2). Las proteasas recuperadas de *Jacaratia mexicana*, en los carriles 3 a 5 también mostraron una banda de aproximadamente 24 kDa; lo cual nos indica que las células de *Jacaratia mexicana* cultivadas *in vitro* son capaces de producir las mismas proteasas presentes en el látex de dicha planta.

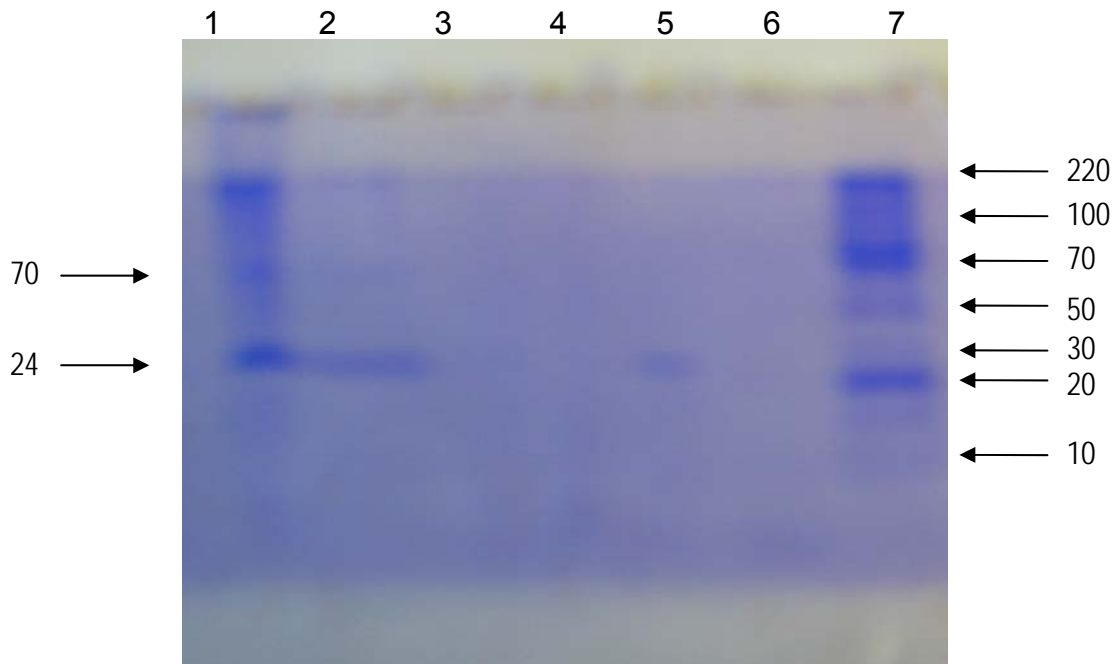


Figura 27. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS. Carril 1. Látex de *Jacaratia mexicana*. Carril 2. “mexicaína” (P-IV) purificada del látex de *Jacaratia mexicana*. Carriles 3 a 5. Medio de cultivo en donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* en el biorreactor *airlift* de 2 L. Carril 7. Marcador de peso molecular de 10 a 220 kDa.

### 7.10.2 Purificación por cromatografía de intercambio catiónico

En la figura 28 es presentado el perfil de elución de las proteasas extraídas del látex de *Jacaratia mexicana* de acuerdo al protocolo indicado en 6.15.1. El tiempo de elución en minutos se representa en el eje horizontal y en el vertical la absorbancia en mAu. En la figura 29 se muestra el perfil de elución obtenido de la purificación de las proteasas recuperadas del cultivo de células en suspensión de *Jacaratia mexicana*. Se observa que ambas figuras presenta un perfil similar, es decir tres picos, el primero corresponde a la fracción que no se unió a la columna Resource S, los otros dos corresponden a la fracción de enzimas proteolíticas

cati3nicas, ya que se unieron a la columna y eluyeron aproximadamente a la misma fuerza i3nica.

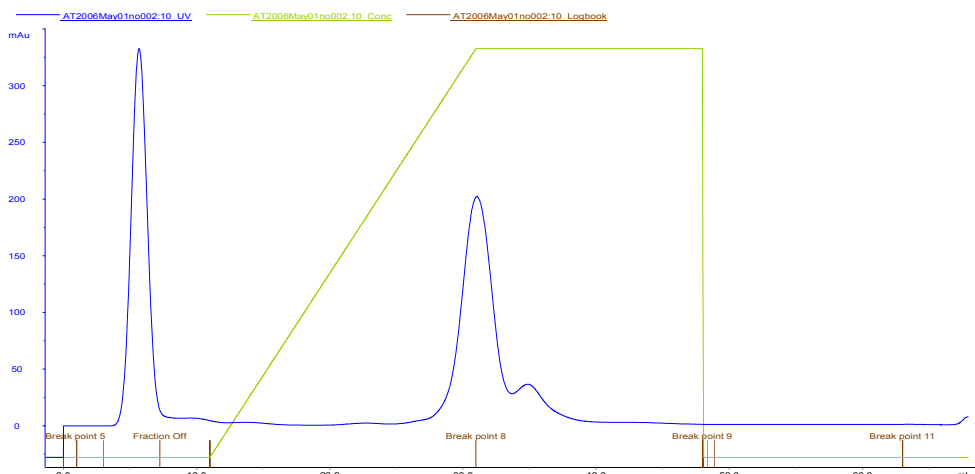


Figura 28. Cromatograma de las proteasas del l3tex de *Jacaratia mexicana* en una columna Resource S de un mL.

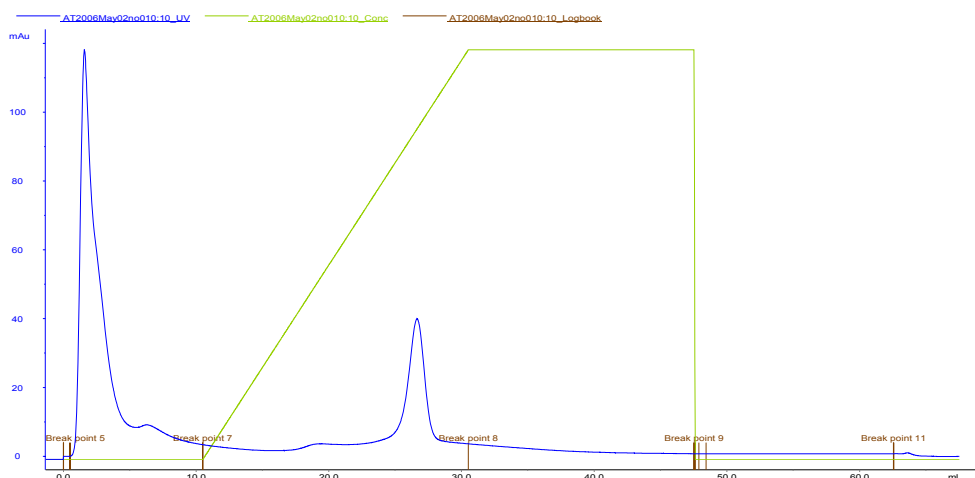


Figura 29. Cromatograma de las proteasas purificadas del medio de cultivo donde crecieron las c3lulas de *Jacaratia mexicana* en el biorreactor airlift en una columna Resource S de un mL.

## 8 DISCUSIÓN

La elección de la formulación del medio de medio de cultivo más adecuado para la inducción de callos y/o células en suspensión así como para la producción de enzimas proteolíticas estuvo de acuerdo con los resultados de Barrera y Oliver, (2004) y Oliver et al., (2005). Siendo la formulación del medio MS completo en sales y con 0.5 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de 2,4-D (MS9), la más adecuada para este estudio.

Con relación a la hipótesis de este trabajo (H1): la actividad proteolítica del medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana* se incrementó 229% con 0.05% de inductor y 145% con 0.1% de inductor respecto al control (ver figura 6), tal como sucedió en la producción de enzimas proteolíticas por *Serratia marcescens* en presencia de gelatina (Castañeda-Agulló, 1956) y con algunos aminoácidos como la leucina (Romero, et al., 2001). En el caso con células de *Jacaratia mexicana* resultó que la actividad enzimática se incrementó en un tiempo relativamente corto de iniciado el cultivo, como es mostrado en la figura 11 donde el efecto de inducción fue a partir del día 14. Este comportamiento también esta de acuerdo con lo reportado por Castañeda-Agulló (1956) es decir un incremento de la producción de enzimas, después de un tiempo corto de iniciado el cultivo con el inductor.

Es evidente el incremento de la actividad proteolítica en los cultivos de células *Jacaratia mexicana* con 0.05% del hidrolizado de caseína, fue aproximadamente de 2.3 veces con relación al control. Sin embargo, los incrementos de producción de enzimas proteolíticas con bacterias son mayores. Por ejemplo, resultados obtenidos por Braun (1980) en medios de cultivo suplementados con 0.7% (p/v) de leucina o caseína la actividad enzimática aumentó 60 veces con respecto al medio

no suplementado y además observó que la producción más alta de proteasas se encontró durante la fase estacionaria del cultivo. Cabe mencionar que no se esperan resultados numéricamente similares puesto que son sistemas biológicos diferentes, sin embargo en la literatura no se encontraron reportes de trabajos de inductores en células vegetales, por lo que el único punto de comparación son sistemas bacterianos. Además hay que tomar en cuenta que la concentración del inductor fue superior a la usada en este experimento.

Bromke y Hammel en 1978 en estudios de inducción en el cultivo de *Serratia marcescens* con gelatina con y sin glicerol, citratos y/o sulfato de amonio encontraron que solo utilizando 5% de gelatina obtuvo la mayor actividad proteolítica, en el medio de cultivo, con lo cual da evidencia el efecto de inductor de dicha proteína. Con lo cual podríamos suponer que ocurre algo similar en los cultivos de células de *Jacaratia mexicana* durante la inducción de las proteasas.

Se puede decir que tal como sucede con las bacterias, en células de *Jacaratia mexicana*, la producción de enzimas proteolíticas se incrementa cuando el medio de cultivo donde son crecidas contiene péptidos y/o proteínas o aminoácidos.

En cuanto al desarrollo de la biomasa en el cultivo celular de *Jacaratia mexicana* aparentemente no se vio afectado por la adición del inductor, en ninguna de las dos concentraciones usadas (solo se notaron ligeras diferencias, que atribuimos a variaciones experimentales). Lo anterior está de acuerdo con el trabajo de Castañeda-Agulló (1956) es decir, el desarrollo de la biomasa en el medio de cultivo adicionado con gelatina fue igual al que no tenía gelatina.

En relación al consumo de sacarosa (fuente de carbono) se observa que fue más rápido dicho consumo en presencia del inductor (0.05% del hidrolizado de caseína) que la del consumo del cultivo control (sin inductor) y la del cultivo con 0.1% de inductor. Esto está de acuerdo con los resultados del incremento en

actividad proteolítica del medio de cultivo, lo cual sugiere una mayor síntesis y/o liberación de proteasa (s) y por lo tanto las células requirieron un consumo mayor de la fuente de carbono para completar dicha síntesis.

La elicitación en los cultivos de *Jacaratia mexicana*, es observada de manera clara hasta los 28 días después de agregado el elicitor (25, 50 y 75 mg/L adicionados 3 veces con diferencia de 14 días); la concentración con la que se observó un incremento en la actividad proteolítica fue con 25 mg/L. Lo cual podría explicarse como sigue: fue necesaria una acumulación lenta de elicitor hasta alcanzar una concentración adecuada para lograr el efecto de elicitación y así incrementar la producción de enzimas proteolíticas. Xu, et al., (1998) con cultivos de callos de zanahoria (*Daucus carota*) obtuvieron el mayor incremento de actividad de peroxidasa con 50 mg/L de elicitor de *A. niger*. La actividad de dicha peroxidasa aumentó de 14.5 U/g PF a 54 U/g PF, es decir 3.7 veces. En los cultivos de *Jacaratia mexicana*, el incremento de la actividad proteolítica fue de aproximadamente 1.3 veces o 134% con respecto al control.

Durante el desarrollo del cultivo, además de adicionar elicitor cada 14 días se adicionaba medio fresco. Esto ocasionó un ligero incremento en la concentración de sales en el medio de cultivo, dado que en cada cosecha de medio agotado no es posible retirarlo completamente. También la acumulación de sales podría haber actuado como elicitor incrementando la producción de enzimas proteolíticas.

De acuerdo a lo reportado por Thuerig, et al., (2006), compuestos que actúan como elicitor proveniente de *Penicillium chrysogenum* son sensibles a la digestión por proteasas, pero no son sensibles a otras enzimas, lo que sugiere que la(s) molécula(s) que actúa como elicitor(es) es (son) de naturaleza proteica.

En cuanto a la concentración de elicitor utilizada en los cultivos de *Jacaratia mexicana* se puede pensar que fue necesaria una acumulación lenta del mismo,

para provocar una respuesta de defensa de las células y en consecuencia estas incrementaron la síntesis de dichas proteasas. La concentración del extracto de *A. niger* que provocó el efecto de elicitación fue de 50 mg/L, que se alcanzó después de la segunda adición de 25 mg/L del extracto de *A. niger*.

Por otro lado, la adición de sacarosa en forma de pulsos, actuó como elicitor en la producción de taxan por cultivos de *Taxus chinensis* y se usó como estrategia la adición de un jasmonato (elicitor) combinada con la adición de sacarosa a los siete días después de haber establecido el cultivo en suspensión de *T. chinensis* (Dong y Zhong, 2001). En nuestro caso la adición del medio fresco cada 14 días pudo haber tenido un efecto parecido al reportado por Dong, es decir la adición de sacarosa en pulsos y así incrementar la producción de enzima proteolítica.

Los resultados del biorreactor con inductor se logró el establecimiento del cultivo y las condiciones probadas fueron las adecuadas para mantener a las células y que estas produjeran enzimas proteolíticas. La actividad enzimática aumentó durante 42 días, por lo que se puede decir que este es el tiempo adecuado para encontrar la máxima producción de enzimas proteolíticas. Después de este tiempo la actividad decae. Por otro lado al analizar las gráficas de actividad enzimática y crecimiento celular se nota que en el tiempo en el que las células están en una etapa de crecimiento acelerado la actividad proteolítica aumentó considerablemente. Los resultados confirman que este es un metabolito parcialmente asociado al crecimiento, por lo que la acción y efecto del inductor son validos (Figuras 9 y 10). Este comportamiento es más evidente en los resultados obtenidos con el elicitor (Figuras 22 y 23).

Por otro lado en el caso del elicitor, las condiciones establecidas también fueron las adecuadas para lograr crecimiento celular y producción de enzimas proteolíticas en el biorreactor airlift. La actividad proteolítica aumentó durante 35 días, decayendo después de este tiempo. El crecimiento celular, de igual manera

se incrementó a lo largo de la cinética, sin embargo no se detecta disminución en el mismo. Aunque aparentemente la biomasa siguió creciendo los resultados de actividad enzimática, viabilidad e inclusive de proteína indicaban que el metabolismo del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* comenzaba a decaer.

En ambos casos (los cultivos con inductor o elicitor), el consumo de sacarosa coincidió con los resultados ya obtenidos a nivel matraz y en los cultivos usados como inóculos.

Los cromatogramas (Figuras 28 y 29) presentados evidencian que la(s) proteasa(s) producidas en el biorreactor son la(s) que se encuentra(n) en el látex de *Jacaratia mexicana*, ya que se observan perfiles de elución similares. Por otro lado se confirma con el gel de electroforesis (Figura 27), donde son apreciadas dos bandas de similar peso molecular, una corresponde al látex de *Jacaratia mexicana*, y la otra a las obtenidas en el medio de cultivo donde crecieron las células de *Jacaratia mexicana*, que la o las proteasa(s) producidas *in vitro* y las del látex de la planta son las mismas.

El tiempo de mezclado produjo una turbulencia adecuada para mantener homogeneidad en las fases presentes en el medio de cultivo de *Jacaratia mexicana* y una cantidad de oxígeno disuelto nueve veces mayor al requerido de manera general por células vegetales.

Por otro lado al comparar los valores de la velocidad específica de crecimiento obtenidos con inductor ( $3.12 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ) y elicitor ( $2.5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ) con el tiempo de mezclado (40 s) y la velocidad de transferencia de oxígeno ( $0.93 \text{ s}^{-1}$ ) se observa que el mezclado y la aireación suministrada al biorreactor fueron adecuadas para cubrir las necesidades metabólicas de las células de *Jacaratia mexicana*.



## 9 CONCLUSIONES

El crecimiento celular y la velocidad de consumo de la sacarosa en el cultivo de células de *Jacaratia mexicana* presentó un comportamiento similar con las concentraciones probadas de inductor, sin embargo, se observó un ligero aumento en la velocidad de consumo de la sacarosa con 0.05% de inductor. La actividad proteolítica y la concentración de proteína mostró un incremento con las dos concentraciones del inductor probadas con respecto al cultivo sin el inductor, siendo mayor el incremento con 0.05% (p/v) tanto en la actividad proteolítica como en la proteína determinadas en el medio de cultivo y observándose un máximo en la actividad enzimática a los 35 días de dichos cultivos.

El incremento de la actividad proteolítica del medio de cultivo donde crecieron las células con 0.05% del hidrolizado de caseína, fue de aproximadamente un 2.3 veces respecto al cultivo sin inductor.

La velocidad del consumo de sacarosa fue 20% mayor con 0.05% del inductor respecto al cultivo sin inductor, lo cual coincide con la mayor actividad enzimática detectada usando la misma concentración de inductor, lo que apoya los resultados que comprueban la hipótesis 1.

Para el caso del elicitor, la mejor concentración fue con 25 mg/L (adicionada al cultivo 4 veces en intervalos de 7 días, durante el desarrollo del experimento). El consumo de sacarosa fue mayor con esta concentración de elicitor, lo que concuerda con la mayor producción de enzima proteolítica. Por otro lado, el crecimiento celular no se vio afectado por la adición del elicitor.

El incremento de la actividad proteolítica en el medio en el que crecieron las células de *Jacaratia mexicana* con elicitador es de aproximadamente 1.3 veces con respecto al control, con lo que se comprueba la hipótesis 2.

Se confirma la presencia de proteasas similares a las del látex de la planta completa de *Jacaratia mexicana* en los medios de cultivo celulares de dicha planta por electroforesis SDS PAGE y por cromatografía de intercambio catiónico.

## 10 PERSPECTIVAS

A nivel molecular hay evidencia de una acumulación de mRNA de dichas proteasas bajo condiciones de estrés ambientales o durante etapas específicas del desarrollo de la planta. Se ha demostrado que este incremento es una respuesta al estrés por temperatura alta o baja, salinidad o al tratamiento con distintos elicitores abióticos, tal como sucede en la producción de proteasa utilizando cultivos de *Mesembryanthemum crystallinum* (Forsthoefel, 1998).

Por lo cual, como continuación de este trabajo se sugiere comprobar si esto sucede en los cultivos *Jacaratia mexicana* al adicionar un inductor o diferentes elicitores bióticos o abióticos cuando hay un incremento en producción de proteasas.

También se sugiere proponer nuevos experimentos para aclarar cual de los múltiples posibles factores causaron la elicitación en los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* o cuales son los posibles mecanismos de dicha elicitación.

## 11 REFERENCIAS

Apte, P.V., Kaklij, G.S., Heble, M.R. (1979) Proteolytic enzymes (bromelains) in tissue cultures of *Ananas sativus* (pineapple). Plant Science Letters. 14:57-62.

Badillo C., J.A.; Cruz M. A.; Garibay O. C; Oliver S. M.C. (2002). Enzimas proteolíticas de cultivo de callos de *Jacaratia mexicana*. III Encuentro Internacional de Biotecnología. Querétaro, Qro., del 6 al 9 de noviembre. pp. 118-121.

Barret, J. A. (1994) Classification of peptidases. Methods in enzymology. 244:1-15.

Barrera, B. G. (2004) Establecimiento de las condiciones de cultivo de células de *Bromelia hemisphaerica* para la obtención de proteasas. Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México.

Barrera Badillo G. y Oliver Salvador (2004). Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Jacaratia mexicana* para la producción de proteasas. III Congreso Internacional y XIV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Veracruz, Ver., del 31 de marzo al 2 de abril.

Bourgaud, F. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. 161: 839-851.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistry. 72: 248-254.

Braun, V, y Schmitz G. (1980) Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. Archives of Microbiology. 124: 55-61.

Briones, M. R. Cruz, M. T., Cortes V. M. I. Oliver, S. M. C. (1994) Preparaciones enzimáticas de interés industrial con proteínas de plantas mexicanas. Información tecnológica. 5(1), 57-62 (Chile).

Briones, M. R. (1996) Proteasas de plantas mexicanas potencialmente útiles en la industria alimentaria. Hidrólisis de proteínas vegetales. Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México.

Bromke, B.J. y Hammel J.M. (1978) Regulation of extracellular protease formation by *Serratia marcescens*. Canadian Journal of Microbiology. 25:47-52.

Castañeda Agulló M., Gavarrón F.F., Balcazar M.R. (1942). On a new protease from *Pileus mexicanus*. Science, 96:365.

Castañeda-Agulló, M. (1956) Studies on the biosynthesis of extracellular proteases by bacteria: *Serratia marcescens*, synthetic and gelatine media. Journal of General Physiology. 39: 369-375.

Cruz y Victoria, M. T., (1993) Aislamiento y caracterización parcial de la enzima proteolítica "hemisfericina" obtenida de *Bromelia hemisphaerica*. Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México.

Dixon, R. A., González, R.A. (1996) Plant cell culture. A practical approach. Ed. IRL Press, Oxford. 2da edición, pp 127.

Dong, H-D y Zhong, J.J. (2001) Significant improvement of taxane production in suspension by combining elicitation with sucrose feed. Biochemical Engineering Journal, 8: 145-150.

Ferreira, J.S. y Duke, S.O. (1997) Approaches for maximizing biosynthesis of medical plant secondary metabolites. AgBiotech News and Information. 9 (12):309-316.

Feverero, P., Cabral, J. M. S., Fonseca, M. M. R., Novais, J. M. and Pais, M. S. S. (1986) Callus and suspension culture of *Silybum marianum*: biosynthesis of proteins with clotting activity. Biotechnology Letters, 8(1); 19-24.

Figueiredo, A.C., Feverero, P., Cabral, J. M. S., Novais, J. M. (1987) Callus and suspension cultures for biomass production of *Cynara cardunculus*, Biotechnology Letters, 9, 3, 213-18.

Forsthoefel, N. R., Cushman, M. A. F., Ostrem J.A., Cushman, J.C. (1998) Induction of a cysteine protease cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum*

leaves by environmental stress and plant growth regulators. *Plant Science*. 136:195-206.

Francois, C., Marshall, R.D., Neuberger, A., (1961) The determination of mannose in hen's-egg albumin by radioisotope dilution. *Biochemical Journal*. 83:335-341.

Galili, G. y Höfgen R., (2001) Metabolic Engineering of Amino Acids and Storage Proteins in Plants. *Metabolic Engineering*. 4:3-11.

Guo, Z., Lamb, C., Dixon, R. (1998). A Serine Protease from Suspension-Cultured Soybean Cells. *Phytochemistry*. 47. 4:547-553.

Haard, N. F., (1998) Specialty enzymes from marine organism. *Food Biotechnology*. 52:7,64-67.

Jankiewicz, L. (2003) Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas, Ed. Mundi Prensa, pp 61-66, 93-122.

Kieran, P.M., MacLoughli P. F., Malone D. M. (1997). Plant cell suspensions cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*. 59, 39-52.

Lisowska K. y Wysokinska H. (2000) In vitro propagation of *Catalpa ovata* G. Don. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 60:171-176.

Martínez, G. J., (2006) Síntesis de proteasas por cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en biorreactor airlift de 2 L. Tesis de Licenciatura. UPIBI-IPN. México.

Martínez, G.J., García, S. S., Oliver, S. M.C. (2006) Desempeño de un biorreactor neumático para producción de enzimas proteolíticas por cultivo de células vegetales. XV Congreso de Ingeniería Bioquímica, Morelia, Michoacán. 3-7 de abril de 2006. pp 1571.

Medora, R.S., Campbell, J. M., Mell, G.P. (1973) Proteolytic enzymes in papaya cell cultures. *Lloydia* 40:612.

Nagamori, E., Omote M., Honda H., Kobayayashi T. (2001) Enhanced and prolonged production of plantlets regenerated from carrot callus in viscous additive-supplemented medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91:289-287.

Nielsen, J. y Villadsen, J. (1994) *Bioreaction Engineering Principles*. Ed. Plenum Press, pp 456.

Oliver, S. M. C., (1999) Purificación, caracterización y cristalización de la proteínasa cisteínica del látex del *Pileus mexicanus*: mexicana. Tesis de Doctorado. ENCB-IPN. México.

Oliver-Salvador, M. C., González-Ramírez, L. A., Gavira, J. A., Soriano-García, M., and García-Ruiz, J. M. (2004). Purification crystallization and preliminary X-ray analysis of mexicain. *Acta Crystallographica D60*, 2058-2060.

Oliver-Salvador M.C., Barrera-Badillo G., Martínez-Guillen J.B., Briones-Martínez R., and Cortes-Vázquez M.I. (2005). Proteases from cell culture of *Jacaratia mexicana*. 30TH FEBS Congress and 9Th IUBMB Conference, Budapest, 2-7 july. Cartel B1-024P, pg. 145.

Onken, U. y Weiland, P., (1983) *Airlift Fermenters: Construction, Behavior, and Uses*. *Advances in Biotechnology Processes*. 1: 67-95.

Ortega, M. L. y Del Castillo, L. M. (1966) Actividad de la mexicana en presencia de altas concentraciones de urea. *Ciencia Mexicana*. 24: 247-251.

Pereira, A. M. S., Bertoni, B. W., Cámara, F. L: A., Duarte, I.B. (2000) Co-cultivation of plant cells as a technique for the elicitation of secondary metabolite production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 60: 165-169.

Pérez, E. M., Ramírez R.M., Núñez H.G. (1999) *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*, Ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Primera Edición, pp. 179.

Presuel, M. L. G. (2000) *Diseño, construcción y caracterización de un biorreactor para la producción de embriones somáticos de alfalfa*. Tesis de Maestría del área químico biológica. ENCB-IPN. México.

Quintero, R. (1990) *Ingeniería Bioquímica*. Ed. Alhambra Mexicana. Primera edición, pp. 332.

Romero, F. J., García, L.A., Salas, J. A., Díaz, M., Quirós L. M. (2001) Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochemistry*. 36: 507-515.

Sajc, L., Vunjak-Novakovic, G. (2000) Bioreactors for plant engineering: an Outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*. 4:89-99.

Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi N., Ravishankar G.A. (2006) Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry* 41:50-60.

Smith, C.A. y Wood, E.J. (1998) *Biología molecular y Biotecnología*. Ed. Addison Wesley Iberoamericana. Primera edición, pp 215.

Shuler, M. L., (1993) Strategies for improving productivity in plant cell, tissue and organ culture in bioreactors. *Bioproducts and Bioprocess*. 2:235-245.

Tamer, I. M. (1997) Protease from freely suspended and immobilised *Mirabilis jalapa*. *Process Biochemistry*. 32 (3), 195-200.

Topete, M. Torres L.G., Ramírez M.E., Herrera M., Galindo E. (1991) Avances en los sistemas de cultivo masivos de células vegetales. *Ciencia y desarrollo*. Vol. XVIII. 99:73-96

Thuring, B., Felix, G., Blinder, A., Boller, T., Tamm, L. (2006) An extract of *Penicillium chrysogenum* elicits early defense-related response and induces resistance in *Arabidopsis thaliana* independently of known signaling pathways. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 67:180-193.

Van Handel E. (1967). Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry*. 22:280-283

[www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com) (26 de enero, 2007).

Wagner, F. y Vogelmann, H., (1977) Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. *Plant tissue cultures and its biotechnology application*. 245-252.

Whitaker, J. R., (1994) *Principles of enzymology for the food Sciences*. Segunda edición. Marcel Dekker, Inc. New York.

Woodward A. y Bartel, B. (2005) Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany*. 95: 707-735.



Xu, J.F., Sun, Y., Su, Z.G. (1998) Enhanced peroxidase production by suspension culture of carrot compact callus aggregates. *Journal of Biotechnology*. 65:203-208.

Zhong, J. (2002) Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94:591:599.

## 12 ANEXO

### Medio de Knop

Reactivos	g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
KNO <sub>3</sub>	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
Ca(NO <sub>3</sub> ). 4H <sub>2</sub> O	0.8
Agar	5.0
pH	5.5

### Medio de Murashige y Skoog

Reactivo	mL/L	g/L
* Macronutrientes	25 y 100	-
* Micronutrientes	25 y 100	-
Vitaminas	1.0	-
Sacarosa	-	20
Mioinositol	-	0.1
Agar noble	-	6.0
pH	5.6	

### \* Macronutrientes

	mg/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	85

<b>* Micronutrientes</b>	<b>mg/L</b>
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8.6
NaMoO <sub>5</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.2
FeSO <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8

#### **Regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.6**

Fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ..... 5.961 g/L

Fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ..... 7.098 g/L

Se preparan cada uno por separado a una molaridad de 0.05 M. Se ajusta el pH del fosfato de sodio dibásico con el fosfato de sodio monobásico hasta alcanzar un pH de 7.6.

#### **Caseína 1 %**

Caseína ..... 2 g

Regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.6 ..... 190 mL

Disolver la caseína en regulador de fosfatos frío 0.05 M pH 7.6. Calentar a baño a ebullición hasta disolver, enfriar y aforar.

#### **Cisteína.HCl 0.4 M**

Cisteína.HCl ..... 1.756 g

Regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.6 ..... 25 mL

La cisteína se disolvió en regulador de fosfatos, se ajustó a pH 7.6, se aforo al volumen final.

**Ácido tricloroacético 5%**

Ácido tricloroacético 5% ..... 5 g  
Agua destilada ..... 95 mL

El ácido tricloroacético se disolvió en agua destilada y se afora a 100 mL.

**Albúmina bovina (200 µg/mL)**

Albúmina bovina ..... 0.01 g  
Agua destilada ..... 50 mL

La albúmina bovina se disolvió en agua destilada.

**Reactivo de Antrona**

Antrona ..... 150 mg  
Acido sulfúrico diluido..... 100 mL

Disolver la antrona en el ácido sulfúrico diluido (70 mL de ácido sulfúrico y 36 mL de agua).

**Reactivo de Orcinol**

Orcinol ..... 1.6 g  
Agua ..... 100 mL

Disolver el orcinol en agua.

**Antibiótico**

Claforan inyectable sin lidocaína.....120 µL/300 mL Medio de cultivo  
Por cada litro de medio de cultivo adicionar 100 mg de antibiótico.

**Antimicótico**

Acido Bórico.....0.05 % (p/v)

Por cada 1000 mL de medio de cultivo adicionar 0.50 g de antimicótico.

### **Azul de Tripano**

Azul de Tripano al 20 % en PBS (Sigma T-8154, Solución 0.4 %, preparada en 0.81 % de NaCl y 0.6% de fosfato de potasio dibásico) PBS, regulador de fosfatos: NaCl 8.75 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.25 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L, KCl 0.2g/L a pH 7.2-7.3.

Cálculo:

Número de células por mililitro = Promedio obtenido de los conteos\*10,000\*dilución

### **Elaboración de geles con SDS**

1. Preparar el gel separador de acrilamida al 12 % (Para un volumen de 5 mL: 1.7 mL de H<sub>2</sub>O, 2 mL de Acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 1.25 mL de Tris 2 M pH 8.8, 25 µL PSA, , 2.5 µL TEMED, 50 µL SDS al 10 %).
2. Vaciar la acrilamida y dejar que polimerice por aproximadamente 20 minutos.
3. Preparar el gel concentrador de acrilamida al 4 % (Para un volumen de 2 mL: 1.25 mL de H<sub>2</sub>O, 0.275 mL de Acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 0.525 mL de Tris 2 M pH 6.8, 10 µL PSA, 2 µL TEMED).
4. Vaciar la acrilamida, colocar el peine y dejar polimerizar por 20 minutos.
5. Sacar el peine, limpiar los pozos y colocar 30 µL de la muestra preparada [40 µL de muestra, 10 µL de regulador de muestra (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.4 % azul de bromofenol y 40% glicerol)].

Las muestras se corrieron a 80 mV durante la etapa de concentración y a 120 mV durante la etapa de separación utilizando amortiguador de Tris-Glicina con SDS como amortiguador de corrida.

### Curva tipo para la determinación de proteína por el método de Bradford

La curva tipo para la determinación de proteína por el método de Bradford se construyó de acuerdo al cuadro mostrado a continuación:

Cuadro 4. Elaboración de la curva tipo de proteína por el método de Bradford.

BSA 200 µg/mL (mL)	0	0.05	0.1	0.15	0.20	0.25
Agua destilada (mL)	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.0
Reactivo de Bradford (mL)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Concentración de BSA (µg/mL)	0	40	80	120	160	200

Cada una de las diluciones se realiza por triplicado. Después de cinco minutos de agregado el reactivo de Bradford, leer la absorbancia a 595 nm y calcular la ecuación de la recta. La cantidad de proteína contenida en las muestras es determinada interpolando la absorbancia en la curva tipo elaborada con la albúmina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones.

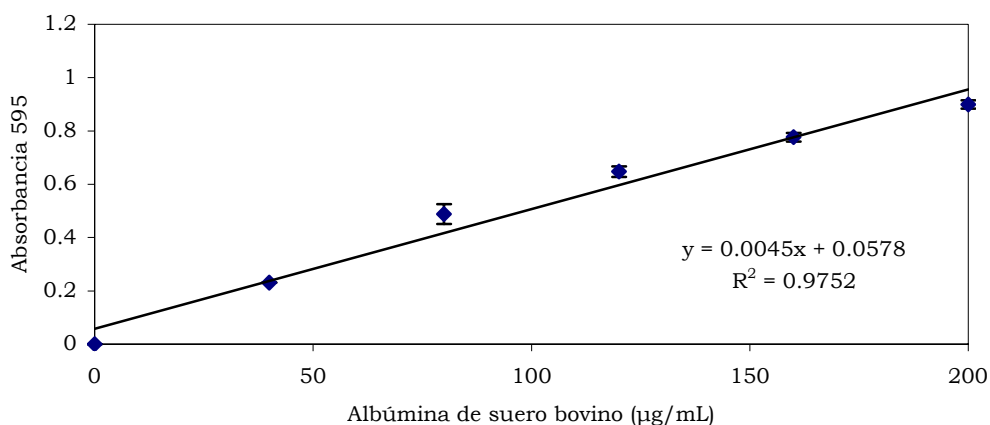


Figura 30. Curva tipo de proteína por el método de Bradford.

### Curva tipo para la determinación de actividad enzimática por el método de Kunitz modificado

A partir de una solución que contenga 500  $\mu$  moles/litro de tirosina (la solución contiene 2 partes de regulador de fosfatos pH 7.6 y 3 partes de ATC 5%). Hacer una curva tipo con 10 diferentes alícuotas (0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4, 2.7 y 3.0 mL) de la solución de tirosina Adicionar la mezcla de regulador-ATC para llevar a un volumen final de 3.0 mL, y efectuar la lectura de absorbancia a 280 nm. Elaborar la curva tipo por triplicado.

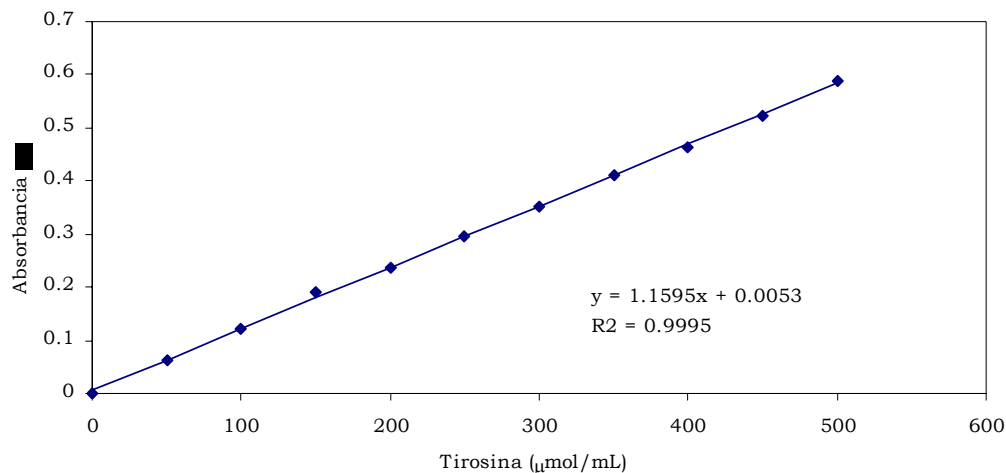


Figura 31. Curva tipo de tirosina.

### Curva tipo para la determinación de sacarosa por el método de la antrona

La curva tipo para la determinación de sacarosa por el método de la antrona se construyó de acuerdo al cuadro mostrado a continuación:

Cuadro 5. Elaboración de la curva tipo de sacarosa por el método de la antrona.

Sacarosa (mL)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Agua destilada (mL)	0.023	0.021	0.019	0.017	0.015
KOH (mL)	0.025				
Reactivo de antrona (mL)	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750
Concentración de sacarosa mg/mL	20	40	60	80	100

Realizar la curva tipo usando cada una de las diluciones indicadas en el cuadro 5 por triplicado. Agregar KOH e incubar durante de 10 minutos a ebullición. Dejar enfriar a temperatura ambiente y adicionar el reactivo de la antrona, incubar a 40° C durante 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 620 nm. Calcular la ecuación de la recta.

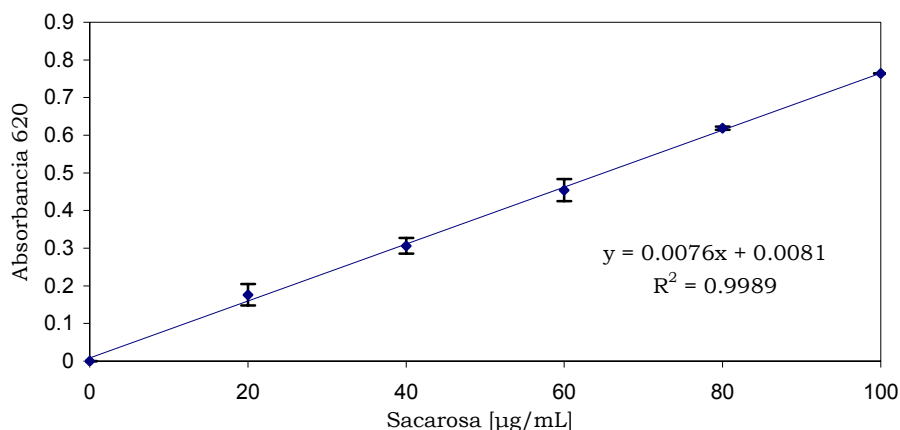


Figura 32. Curva tipo de sacarosa por el método de la antrona.

### Curva tipo para la determinación de glucosa por el método del orcinol-Ácido sulfúrico

La curva tipo para la determinación de glucosa por el método del orcinol-ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se construyó de acuerdo al cuadro mostrado a continuación:

Cuadro 6. Elaboración de la curva tipo de glucosa por el método de orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

glucosa (mL)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Agua destilada (mL)	0.08	0.06	0.04	0.2	0
Orcinol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)	0.85				
Concentración de glucosa mg/mL	20	40	60	80	100



Realizar la curva tipo usando cada una de las diluciones indicadas en el Cuadro 6 por triplicado. Agregar el reactivo de orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e incubar durante 45 minutos a 80° C, enfriar a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 505 nm y calcular la ecuación de la recta. La cantidad de elicitor contenido en los extractos de *Aspergillus niger*, expresadas en mg/L de glucosa es determinada interpolando los datos de absorbancia en la curva tipo de glucosa por el método del orcinol.

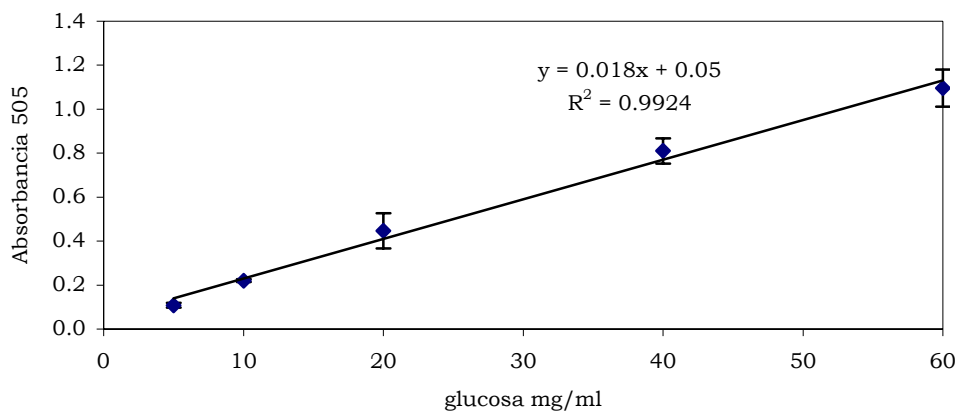


Figura 33. Curva tipo de glucosa por el método de orcinol-ácido sulfúrico