



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

---

**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS POR CULTIVO  
CELULAR DE *Jacaratia mexicana* EN UN BIORREACTOR DE 6 L**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

**PRESENTA**

**ELÍAS OCTAVIO GÓMEZ MONTES  
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**DIRIGIDA POR:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN OLIVER SALVADOR**

**DRA. NORMA GÜEMES VERA**



**México, D.F., 2011**



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

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 14 del mes de enero del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la UPIBI – IPN para examinar la tesis titulada:

**“PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS POR CULTIVO CELULAR DE  
*Jacaratiá mexicana* EN UN BIORREACTOR DE 6L”**

Presentada por el alumno:

<u>Gómez</u>	<u>Montes</u>	<u>Elías Octavio</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
Con registro: <table border="1"><tr><td>A</td><td>0</td><td>9</td><td>0</td><td>0</td><td>6</td><td>7</td></tr></table>			A	0	9	0	0	6	7
A	0	9	0	0	6	7			

aspirante de:

**Maestría en Ciencias en Bioprocesos**

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

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dra. María del Carmen Oliver  
Salvador

Dr. Juan Silvestre Aranda  
Barradas

Director de tesis

Dra. Norma Guemes Vera

Dr. Jorge Yañez Fernández

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Edgar Salgado Manjarrez



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

**CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS**

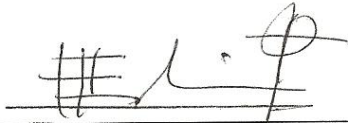
En la Ciudad de México, D.F. el día 14 del mes de enero del año 2011, la que suscribe Ingeniero en Alimentos Elías Octavio Gómez Montes alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A090067, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI-IPN) manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Oliver Salvador y la Dra. Norma Güemes Vera y cede los derechos del trabajo intitulado "Producción de enzimas proteolíticas por cultivo celular de *J. mexicana* en un biorreactor de 6 L" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, graficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [elias\\_tatus@yahoo.com.mx](mailto:elias_tatus@yahoo.com.mx), [njgv2002@yahoo.com.mx](mailto:njgv2002@yahoo.com.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


I. A. Elías Octavio Gómez Montes

## Declaración de originalidad

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”

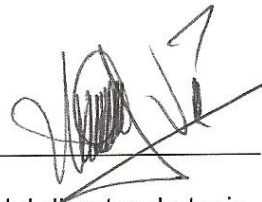


I. A. Elías Octavio Gómez Montes



Vo. Bo. del director de tesis

Dra. María del Carmen Oliver Salvador



Vo. Bo. del director de tesis

Dra. Norma Güemes Vera

El trabajo de investigación titulado “**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS POR CULTIVO CELULAR DE *Jacaratia mexicana* EN UN BIORREACTOR DE 6 L**” se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico nacional, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Oliver Salvador y la Dra. Norma Güemes Vera con el apoyo de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y del Programa Institucional de Formación de Investigadores y con el financiamiento de los siguientes proyectos:

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN CULTIVOS CELULARES DE *Jacaratia mexicana*. OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MS. Clave SIP 20091092

Síntesis de enzimas proteolíticas en cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor de tanque agitado. Escalamiento del proceso. Clave SIP 20100222

## DEDICATORIA

*A mis padres, mis hermanos y mis sobrinos por todo el amor y el apoyo que me han brindado en todos y cada uno los momentos de mi vida; esta meta que se cumple es por y para ustedes...*

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por haberme dado la vida y guiar cada uno de mis pasos. Gracias por todas las conversaciones que tuvimos en los momentos difíciles.

A la **Dra. María del Carmen Oliver Salvador** por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador.

Al **Dr. Jorge Yáñez Fernández** y la **Dra. Norma Güemes Vera** por haberme propuesto grandes retos y ayudarme a tomar las mejores decisiones. Sin su apoyo y confianza no hubiese iniciado ni concluido esta etapa académica.

Al **Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas** y **Dr. Jesús Agustín Badillo Corona** por sus grandes consejos, sugerencias y aportaciones en la realización y escritura de este documento.

Al **Instituto Politécnico Nacional (IPN)** y la **Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI)** por permitirme continuar mi formación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por haberme otorgado una beca con la cual pude culminar la presente investigación.

A la persona más importante en mi vida **Grisel** (Chiquirirri), Gracias por tu infinita paciencia, por tu tierna compañía y tú inagotable apoyo; gracias a ti he aprendido a ser una mejor persona día a día. Hoy se cumple una más de nuestras metas, tu sabes que este trabajo también es tuyo así como mi vida y todo mi amor. Te amo muchísimo Osi...

A mis compañeros de Maestría **Víctor, Roxana, Caridad, Luis Alberto, Francisco, Ricardo, Josefina** y **Michel** por compartir buenos y malos momentos.

A mis compañeros de laboratorio **Daniel, Denisse, Pamela** y **Flavio** por haber compartido estos 2 años de trabajo, diversión, alegrías, triunfos y fracasos. Ustedes saben que para mis son más que compañeros de laboratorio...Gracias AMIGOS.

A **Verónica Pacheco, Verónica Chávez, Héctor Molina** por su apoyo incondicional, sus consejos y su amistad.

## Resumen

El cultivo de células vegetales es una herramienta biotecnológica en la producción de una gran variedad de metabolitos de interés comercial, entre los que se encuentran las enzimas. Las proteasas del látex de *Jacaratiá mexicana* pueden competir en aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria donde se emplea la papaína. *J. mexicana* es una planta silvestre que crece en regiones subtropicales de México. El objetivo de este estudio fue producir enzimas proteolíticas a partir del cultivo celular de *J. mexicana* en un biorreactor de tanque agitado de 6 L y establecer la composición óptima del medio para el cultivo de callos y de células en suspensión de *J. mexicana* a nivel matraz.

En este trabajo se probaron cinco diferentes condiciones para la germinación de semillas de *J. mexicana* de las cuales el medio MS¼ en sales con un pretratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presentó mayor porcentaje de germinación, ocho diferentes formulaciones del medio MS con los cuales se realizó el cultivo de callos y células en suspensión de *J. mexicana* a nivel matraz. El cultivo de callos se realizó en medio de Murashige y Skoog (1962) con 0.6% de agar, suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y 0.25 mg/L de BAP (6-benciladenina). Se probaron dos tipos de vitaminas MS y B5 1 mg/L. Se probaron cuatro diferentes concentraciones de fósforo (como KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.340, 0.255, 0.170 y 0.085 mg/L. Con el medio MS+B5+P se obtuvieron las mayores tasas de crecimiento y actividad proteolítica en el cultivo de callos, con respecto al cultivo celular en suspensión con el medio MS+B5+P se obtuvo la mayor producción de biomasa, síntesis de proteína y actividad proteolítica; por lo tanto se eligió al medio de cultivo mencionado anteriormente para el cultivo en biorreactor de tanque agitado de 6 L. Se logró establecer el cultivo celular de *J. mexicana* en un biorreactor de tanque agitado de 6 L cuyas condiciones de operación fueron 0.5 vvm, velocidad de agitación 229 rpm, temperatura 27 °C; durante este cultivo se logró mantener la viabilidad celular de 85 a 90% así como también se observaron incrementos en la biomasa de 1.5 veces, en la proteína de 2.8 veces, y la actividad proteolítica de 2.7 veces a los 21 días de cultivo. Se obtuvieron valores de biomasa de 2.4 veces, similares de proteína y de actividad proteolítica de 3.9 veces mayores en comparación con el biorreactor de tanque agitado de 0.5 L con las mismas condiciones de operación. De los medios de cultivo en suspensión se recuperaron las enzimas proteolíticas y por electroforesis en gel de poliacrilamida se identificaron proteína(s) similar(es) en peso molecular a la proteasa cisteínica “mexicana”, presente en el látex de *J. mexicana*.



## Abstract

The plant cell culture is a biotechnological tools in the production of a variety of metabolites with commercial interest, among which are the enzymes. Proteases from latex of *Jacaratia mexicana* can compete in industrial applications which pharmaceutical and food where papain is used. *Jacaratia mexicana* is a wild plant that grows in subtropical regions of Mexico. The objective of this thesis was to investigate the formulation of Murashige & Skoog (MS) to give greater increases in biomass and proteolytic activity in callus and cell suspension cultures of *Jacaratia mexicana* in flask, in order to produce proteolytic enzymes from *Jacaratia mexicana* cell culture in a stirred tank bioreactor 6 L.

In this work we tested eight different formulations of MS medium for callus and cell suspension culture of *Jacaratia mexicana* in flask. The callus culture was performed on MS medium with 0.6% agar, supplemented with 0.5 mg/L of 2.4-D (2.4-dichlorophenoxyacetic acid) and 0.25 mg/L BAP (6-benzyladenine). Were tested two vitamins types MS and B5 1 mg/L. Were studied four different concentrations of phosphorus (as  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.340, 0.255, 0.170 and 0.085 mg/L. The MS+B5+P showed the highest growth rates and proteolytic activity in the callus culture. With the MS+B5+P were had the highest biomass production, protein synthesis and proteolytic activity in cultured cells in suspension, so this formulation was selected for MS medium culture in stirred tank bioreactor 6 L . Results showed the *Jacaratia mexicana* cell culture in a stirred tank bioreactor 6 L at 0.5 vvm, agitation speed of 229 rpm, 27 °C during 21 days of culture and cell viability was maintained at 85 to 90%. And there were increases in biomass of 1.5 times, in protein synthesis 2.8 times, and the proteolytic activity of 2.7 times at 21 days of culture. Comparing these results with those obtained with the stirred tank bioreactor of 0.5 L with the same operating conditions show the following: in biomass production was 2.4 times higher in protein synthesis was similar and proteolytic activity through was 3.9 times higher. Proteolytic enzymes were recovered from the culture medium in suspension and were identified the proteins by polyacrylamide gel with similar molecular weight like cysteine protease "mexicain" present in the latex of *Jacaratia mexicana*.

## ÍNDICE GENERAL

Acta de revisión .....	i
Declaración de originalidad .....	iii
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Índice de figuras .....	xiii
Índice de cuadros .....	xv
Índice de ecuaciones.....	xvi
Índice de abreviaturas .....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cultivo de tejidos vegetales .....	1
1.1.1. Tejido calloso.....	2
1.1.2. Cultivo de células en suspensión.....	2
1.1.3. Cultivo de células vegetales en biorreactor .....	3
1.1.4. Biorreactor de tanque agitado.....	4
1.2. Enzimas proteolíticas .....	4
1.2.1. Importancia de las enzimas proteolíticas.....	5
1.2.2. Fuentes vegetales de enzimas proteolíticas .....	6
1.2.3. Enzimas proteolíticas de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	6
1.3. Antecedentes del cultivo de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	7
2. JUSTIFICACIÓN .....	9
3. OBJETIVOS .....	10
3.1. Objetivo general .....	10
3.2. Objetivos específicos .....	10
4. METODOLOGÍA.....	11
4.1. Protocolo experimental .....	11
4.2. Evaluación de ocho formulaciones de medios MS para los cultivos de callos y células en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	12
4.2.1. Material biológico .....	12
4.2.2. Desinfección de semillas de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	12
4.2.3. Germinación de semillas de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	12

4.2.4.	Formulación de los medios de cultivo probados .....	13
4.2.5.	Establecimiento del cultivo de callos de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	13
4.2.6.	Determinación de la tasa de crecimiento en el cultivo de callos de <i>J. mexicana</i> .....	13
4.2.7.	Determinación de la actividad proteolítica en el medio semisólido.....	14
4.3.	Preparación del cultivo de <i>Jacaratia mexicana</i> en suspensión.....	14
4.4.	Determinación de la viabilidad celular .....	14
4.5.	Determinación de biomasa en los cultivos de células en suspensión .....	14
4.6.	Determinación de la actividad proteolítica del cultivo en suspensión .....	15
4.7.	Determinación de proteína en los cultivos en suspensión .....	15
4.8.	Determinación del consumo de sacarosa.....	15
4.9.	Evaluación del desempeño hidrodinámico del biorreactor.....	16
4.9.1.	Descripción del biorreactor de tanque agitado .....	16
4.9.2.	Condiciones de operación del biorreactor de tanque agitado de 6 L para el cultivo en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	16
4.9.3.	Determinación del tiempo de mezclado por el método de adición de pulsos .....	16
4.9.4.	Determinación del número de potencia, la velocidad del impulsor, la potencia suministrada, microturbulencia y las velocidades de corte en el biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	17
4.9.5.	Determinación de la velocidad de transferencia y consumo de oxígeno.....	18
4.10.	Condiciones de la cinética del cultivo celular de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	19
4.11.	Recuperación de las proteasas de los medios de cultivo .....	19
4.12.	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.....	19
4.13.	Caracterización bioquímica de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	20
4.13.1.	Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática sobre BAPNA de las proteasas recuperadas de los medios de los cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	20
4.13.2.	Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad proteolítica de las enzimas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	20
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
5.1.	Evaluación de los medios MS para los cultivos de callos y células en suspensión.....	22
5.1.1.	Germinación de semillas de <i>Jacaratia mexicana</i> .....	22

5.1.2.	Efecto de la composición del medio MS en la tasa de crecimiento de los cultivos de callos de <i>J. mexicana</i> .....	23
5.1.3.	Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica de los cultivos de callos de <i>J. mexicana</i> .....	24
5.1.4.	Efecto de la composición del medio MS en la biomasa de los cultivos de células en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	25
5.1.5.	Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica en los cultivos de células en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	26
5.1.6.	Efecto de la composición del medio MS en la síntesis de proteína en los cultivos de células en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	27
5.1.7.	Consumo de sacarosa en los cultivos de <i>J. mexicana</i> en suspensión.....	27
5.1.8.	Efecto de la concentración de fósforo en los cultivos celulares de callos y suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	28
5.1.9.	Efecto de la concentración de fósforo en la actividad proteolítica y proteína en los cultivos celulares de callos y suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	29
5.2.	Evaluación del desempeño hidrodinámico del biorreactor de 6 L en cultivo celular de <i>J mexicana</i> .....	32
5.2.1.	Determinación del número de potencia, la velocidad del impulsor, la potencia suministrada y las velocidades de corte en el biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	32
5.2.2.	Velocidad de transferencia y consumo de oxígeno.....	33
5.3.	Cultivo en suspensión de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L	34
5.3.1.	Producción de biomasa del cultivo celular de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L .....	34
5.3.2.	Síntesis de proteína durante el cultivo en suspensión de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	36
5.3.3.	Actividad proteolítica durante el cultivo en suspensión de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	37
5.3.4.	Consumo de sacarosa durante el cultivo en suspensión de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	38
5.4.	Consumo de Oxígeno en el cultivo celular de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L .....	38
5.5.	Determinación del pH del cultivo celular de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L .....	38
5.6.	Recuperación y caracterización de las enzimas producidas en cultivos en suspensión .....	39

5.6.1. Recuperación de las proteasas de los medios de cultivo en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	39
5.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.....	40
5.6.3. Caracterización bioquímica de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	40
6. CONCLUSIONES.....	44
7. PERSPECTIVAS.....	45
8. BIBLIOGRAFÍA .....	46
9. ANEXOS.....	51

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama de bloques del protocolo experimental para el cultivo de células en suspensión de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L .....	11
<b>Figura 2.</b> Biorreactor de tanque agitado de 6 L, New Brunswick Scientific Co Inc® (New Jersey U.S.A) .....	16
<b>Figura 3.</b> Numero de Reynolds contra número de potencia .....	17
<b>Figura 4.</b> Plántulas de <i>J. mexicana</i> , <b>A)</b> germinadas en medio MS¼ con pretatamiento con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , <b>B)</b> Plántulas germinadas con Medio MS¼, <b>C)</b> Plántulas germinadas con medio Knop .....	23
<b>Figura 5.</b> Efecto de la concentracion de fósforo (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) en la tasa de crecimiento de callos de <i>J. mexicana</i> .....	28
<b>Figura 6.</b> Efecto de la concentracion del fósforo (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) en la producción biomasa de los cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	29
<b>Figura 7.</b> Efecto de la concentracion de fósforo (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) en la actividad proteolítica del medio de los cultivos de callos de <i>J. mexicana</i> .....	30
<b>Figura 8.</b> Efecto de la concentracion de fósforo (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) en la actividad proteolítica del medio de los cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	30
<b>Figura 9.</b> Efecto de la concentración de fósforo (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) en la síntesis de proteína en los cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	31
<b>Figura 10.</b> Determinación de la velocidad de transferencia y consumo de oxígeno en el cultivo en suspension de <i>J. mexicana</i> .....	34
<b>Figura 11.</b> Biorreactor de tanque agitado de 6 L, New Brunswick Scientific Co Inc® con cultivo de células de <i>J. mexicana</i> . .....	34
<b>Figura 12.</b> Cinética de biomasa del cultivo celular en suspensión de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	35
<b>Figura 13.</b> Imágenes de células de <i>J. mexicana</i> por microscopio optico 10X .....	36
<b>Figura 14.</b> Cinética de la sintesis de proteína por cultivos celulares en suspension de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	36
<b>Figura 15.</b> Cinética de la actividad proteolitica de las enzimas sintetizadas a partir del cultivo en suspension de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	37
<b>Figura 16.</b> Consumo de sacarosa en durante el cultivo en suspension de <i>J. mexicana</i> en biorreactor de tanque agitado de 6 L.....	38
<b>Figura 17.</b> Diagrama del proceso de recuperación de las enzimas proteolíticas del medio de los cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> . .....	39

<b>Figura 18.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS. <b>Carril 1)</b> Marcador de peso molecular de 26.6 a 180 kDa. <b>Carriles 2 y 3)</b> Medio de cultivo en donde crecieron las células de <i>J. mexicana</i> .....	40
<b>Figura 19.</b> Efecto del pH sobre la actividad enzimática de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> . .....	41
<b>Figura 20.</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	42
<b>Figura 21.</b> Efecto del pH sobre la actividad enzimática de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> . .....	43
<b>Figura 22.</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	43

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Medios de cultivo MS probados en el cultivo de callos y células en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	13
<b>Cuadro 2.</b> Porcentaje de germinación de los diferentes medios utilizados para la germinación de semillas de <i>J. mexicana</i> .....	22
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en la tasa de crecimiento de callos de <i>J. mexicana</i> .....	23
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica de las enzimas de <i>J. mexicana</i> liberadas al medio de cultivo .....	24
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en el cultivo de células en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	25
<b>Cuadro 6.</b> Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica de las enzimas de <i>J. mexicana</i> liberadas al medio de cultivo .....	26
<b>Cuadro 7.</b> Efecto de la composición del medio MS en la producción de proteína en el cultivo en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	27
<b>Cuadro 8.</b> Consumo de sacarosa en los cultivos en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	28
<b>Cuadro 14.</b> Velocidad del impulsor, potencia suministrada, velocidad de corte, microturbulencia y tiempo de mezclado empleados para el cultivo de células en suspensión de <i>J. mexicana</i> .....	32
<b>Cuadro 15.</b> Valores de volumen, proteína y actividad proteolítica de los medios de cultivo recuperados y concentrados por ultrafiltración .....	39



## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.....	14
Ecuación 2.....	17
Ecuación 3.....	17
Ecuación 4.....	17
Ecuación 5.....	17
Ecuación 6.....	18
Ecuación 7.....	18
<i>Ecuación 8</i> .....	18
Ecuación 9.....	18

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Cultivo de tejidos vegetales

Las plantas han sido una fuente importante de alimentos y compuestos industriales y medicinales, durante cientos de años. Pese a los avances en la síntesis química de compuestos orgánicos, las plantas siguen siendo las mejores productoras de estos compuestos en todo el mundo, ya que tienen la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios (Dixon y Gonzales, 1994; Kieran *et al.*, 1997; Calva *et al.*, 2002). Los antecedentes del cultivo de tejidos vegetales se remontan a finales de los años 30, en que los biólogos alemanes Schleiden y Schwann sugirieron el concepto de totipotencialidad de las células, según el cual cada célula es una unidad independiente capaz de formar un organismo completo si se le pone en condiciones favorables (Smith y Street, 2002). En 1860, Sachs y Knop realizaron experimentos que ayudaron a determinar que ciertos elementos eran importantes para el crecimiento de las plantas. Knop, en 1865, publicó los resultados del efecto de la composición nutritiva sobre el crecimiento y estableció la fórmula de una solución nutritiva simple, que ha sido el punto de partida para modificaciones posteriores por otros autores (citado en Hurtado y Merino, 1987). Haberland asimiló todos esos conceptos y en 1898 discutió la posibilidad de demostrar que todas las células vegetales tienen la capacidad para formar plantas completas, es decir, que tienen totipotencialidad (citado en Hurtado y Merino, 1987). Esta hipótesis no pudo ser demostrada hasta 1934, cuando White comprobó que era factible cultivar con éxito órganos vegetales, y utilizó para ello raíces de jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y Nobercourt, en 1939, obtuvo raíces adventicias de callos de zanahoria (*Daucus carota*) (citado en Hurtado y Merino, 1987; Villalobos, 1990)

Se llama cultivo de tejidos vegetales al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Pérez *et al.* 1999). Las ventajas del cultivo de tejidos vegetales con respecto al método tradicional de obtención de metabolitos a partir de plantas cultivadas en el campo, destacan las siguientes:

- ▣ Independencia de las condiciones climáticas adversas y de los problemas de plagas.
- ▣ Control del suministro del producto independiente de la disponibilidad de la planta.
- ▣ Sistemas de producción bajo condiciones controladas y optimizadas.
- ▣ Producción más consistente en cuanto a calidad y rendimiento del producto.
- ▣ Es posible lograr mejores rendimientos con respecto a los obtenidos por el cultivo de la planta completa.
- ▣ Mínimas necesidades de espacio para el desarrollo de la producción.
- ▣ Población celular uniforme y facilidad de extracción del producto.

(Calva *et al.*, 2002; Mulabagal *et al.*, 2004)

### **1.1.1. Tejido calloso**

En 1939, dos investigadores europeos, Nobecourt y Gautheret, y un norteamericano, White, hicieron las primeras observaciones sobre la proliferación de grandes masas de tejido desdiferenciado (callos), derivadas de raíces de zanahoria.

El callo es un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una diferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido (citado en Hurtado y Merino, 1987).

El cultivo de callos a partir de tejidos vegetales (callos cultivados asépticamente en tubos de ensayo con medio líquido, matraces agitados o biorreactores) está encontrando cada vez mayor uso en la biotecnología vegetal como una herramienta para la manipulación genética de plantas, micropopagación, estudio del metabolismo y desarrollo celular en plantas, y más recientemente, para la producción comercial de productos naturales (Macdonald *et al.*, 1995)

El cultivo de callos se puede dividir en las siguientes etapas:

- I. Inducción. Las células del inóculo inicial comienzan su crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- II. Proliferación celular. El tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.
- III. Inducción de la diferenciación. Se obtienen meristemos, embrioides, tejido vascular, etc., a partir de la masa celular del callo.
- IV. Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

La inducción de tejido calloso se produce cuando la proporción de auxinas es superior a la de las citocininas. Las auxinas son las responsables de la aparición de este tipo de tejido, mientras que las citocininas sólo favorecen su proliferación. En ciertas especies la inducción de tejido calloso puede lograrse agregando únicamente auxinas al medio de cultivo (Pérez *et al.*, 1999).

### **1.1.2. Cultivo de células en suspensión**

Se le denomina cultivo de células en suspensión al cultivo *in vitro* de células vegetales aisladas o en pequeños agregados, distribuidas en un medio nutritivo líquido y en constante movimiento, las cuales presentan una alta tasa de división celular y una homogeneidad relativamente alta. El cultivo de células en suspensión puede iniciarse a partir de cualquier explante inoculado en medio líquido con agitación; sin embargo, hay una mayor probabilidad de éxito y rapidez en la obtención del cultivo si se parte de tejido calloso; por lo tanto, los cultivos de células en suspensión generalmente se inician transfiriendo fragmentos de tejido calloso a medio nutritivo líquido, y agitándolos para facilitar la dispersión celular y la oxigenación del medio (Pérez *et al.*, 1999). Este sistema es útil para llevar a cabo estudios sobre embriogénesis, crecimiento y

diferenciación, organogénesis, bioquímica y metabolismo; también para la obtención de productos secundarios (Hurtado y Merino, 1987).

Por otra parte, estas células son susceptibles de recibir de manera rápida y uniforme cualquier tipo de estímulo externo que se aplique y cuyo efecto se desee estudiar; asimismo, la falta de clorofilas y carotenos en la mayoría de las células vegetales obtenidas de un cultivo celular es de gran utilidad para el aislamiento y purificación de enzimas de origen vegetal. La velocidad de crecimiento de un cultivo de células en suspensión depende de la densidad inicial del inóculo, de la duración en cada caso de la fase *lag* y de la tasa de multiplicación del cultivo. Los dos últimos factores dependen del genotipo de las líneas celulares, del medio nutritivo y de las condiciones de incubación (Pérez *et al.*, 1999).

### **1.1.3. Cultivo de células vegetales en biorreactor**

Un biorreactor es un recipiente dentro del cual ocurren transformaciones bioquímicas, las cuales pueden ser causadas por la acción de células vivas o de enzimas (Lee, 1992). Para seleccionar el tipo de biorreactor y su diseño para el cultivo de células, se deben tener en cuenta las propiedades de dichos cultivos. En la década de 1960 se cultivaron las primeras células vegetales en suspensión, para lo cual fueron utilizados varios diseños de biorreactores, a nivel de laboratorio, adaptados de los biorreactores usados para el cultivo de bacterias, levaduras y células animales (Dixon y Gonzales, 1994).

El uso del cultivo de células vegetales es una alternativa para obtener una gran variedad de metabolitos de interés industrial, para lo cual se requiere del cultivo a gran escala de líneas celulares altamente productoras en biorreactores (Trejo *et al.*, 2005).

En los últimos 30 años se han evaluado diferentes configuraciones de biorreactores para el cultivo de células vegetales (Rodríguez y Galindo, 1999; Sajc *et al.*, 2000). Las condiciones hidrodinámicas prevalecientes en un biorreactor son las que en general tienen un efecto mayor sobre el crecimiento de células vegetales. En cambio, las velocidades de transferencia de oxígeno y de calor en la mayoría de los biorreactores, son mayores a los requerimientos de los cultivos celulares, debido principalmente a que su velocidad de crecimiento y la concentración celular son relativamente bajas (Shuler y Kargi, 2002).

El parámetro hidrodinámico que generalmente tiene mayor influencia sobre el crecimiento de células vegetales es la velocidad de corte, que se define como el gradiente de velocidad de un fluido (la variación de velocidad a la cual una capa de fluido pasa sobre una capa adyacente). La velocidad de corte y la viscosidad del líquido determinan los esfuerzos de corte o las fuerzas de cizalla que prevalecen en un biorreactor.

Las células vegetales generalmente han sido descritas como sensibles a los esfuerzos de corte, lo cual impide el cultivo de muchas líneas celulares en biorreactores. Sin embargo,

existen varios estudios que señalan que esta susceptibilidad a los esfuerzos de corte varía de una línea celular a otra. Incluso se ha aumentado la productividad a pesar de cambios morfológicos en las células debidos a mayores esfuerzos de corte (Trejo *et al.*, 2005). Es importante conocer la velocidad de corte que prevalece en los biorreactores debido a que, cuando el fluido es no newtoniano, la velocidad de corte tiene influencia sobre la viscosidad aparente de los fluidos y por lo tanto afecta las características del mezclado y de transferencia de masa (Sánchez *et al.*, 2006).

#### **1.1.4. Biorreactor de tanque agitado**

Usualmente, son recipientes cilíndricos cuya relación de altura a diámetro es de 1 a 3. La agitación se lleva a cabo por uno o más impulsores, los cuales pueden ser axiales o radiales. El gas es suministrado por un difusor, sin embargo, la dispersión del gas es función del impulsor (Shuler y Kargi, 2002).

En los biorreactores aireados, que además están equipados con impulsores, los fenómenos de flujo son complicados debido a la combinación de la agitación y las burbujas de aire.

Cuando el gas es suministrado al biorreactor, las burbujas de gas se dirigen a zonas de baja presión, lo cual da como resultado la formación de cavidades (volúmenes llenos de aire), atrás de las paletas del impulsor. La formación de dichas cavidades y de la dominancia del movimiento del impulsor o del aire sobre el patrón de flujo, depende de la relación entre el flujo del gas y la velocidad de agitación (expresada como número de aireación,  $NA$ ). Cuando el número de aireación es pequeño se presenta una dispersión gas-líquido homogénea en el tanque; si el número de aireación es muy grande, el patrón de flujo del líquido es determinado por el flujo del gas (Nielsen y Villadsen, 1994; van't Riet y Tramper, 1991).

En el tanque agitado se puede considerar que el mezclado es perfecto a pequeña escala, debido a que la agitación es intensa y previene que existan diferencias locales en las variables del proceso (Ochieng *et al.*, 2007).

## **1.2. Enzimas proteolíticas**

Las enzimas que hidrolizan las uniones peptídicas se llaman enzimas proteolíticas, peptidasas, proteasas o proteinasas. Sin embargo, peptidasa es el término avalado por la Comisión de Enzimas (EC). Una hidrólisis completa de una proteína a aminoácidos requiere de la acción de diferentes enzimas, las cuales actúan como un sistema multienzimático (Whitaker 1994). Las proteasas se clasifican dependiendo de la reacción que catalizan, la estructura química del sitio activo y de su estructura tridimensional.

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.
- 3) La estructura tridimensional y la relación evolutiva entre ellas.

En relación a la naturaleza del sitio catalítico se encuentran los cinco grupos siguientes:

- I. Proteasas serínicas: tienen un residuo de serina en el sitio activo.
- II. Proteasas cisteínicas: tienen un residuo de cisteína en el sitio activo. Ejemplos: papaína, ficina, mexicaína.
- III. Proteasas treonínicas: poseen un residuo de treonina en el sitio activo. Los ejemplos típicos de esta clase de enzimas son las subunidades catalíticas del proteosoma.
- IV. Proteasas aspárticas: Presentan dos residuos de ácido aspártico en el sitio activo y presentan su máxima actividad catalítica a pH ácido.
- V. 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.

(Barret, 1994)

### **1.2.1. Importancia de las enzimas proteolíticas**

Las proteasas participan en la iniciación, mantenimiento y terminación de una gran variedad de procesos biológicos; el mantenimiento y transformación de proteínas intracelulares, el transporte y activación de las proteínas; participan también en los mecanismos de defensa de las células fagocíticas de los eucariotes y en el caso de las células vegetales son importantes en los procesos de germinación de las semillas, de senescencia, de maduración de frutos, etc. (Pérez *et al.*, 1999).

Se ha propuesto que las proteinasas presentes en el látex de los frutos de la familia de las Caricáceas podrían jugar un papel parecido a los factores de coagulación de la sangre dotados de actividad proteolítica; por otro lado, es posible que estas enzimas intervengan en el proceso de regeneración del tejido de mamíferos (efecto mitogénico).

Gomes *et al.* (2005) demostraron la actividad mitogénica de preparaciones del látex de *Carica candamarcensis*, utilizando células cultivadas de mamíferos. También existen reportes de que la papaína tiene un efecto protector sobre las úlceras gástricas en ratas (Mello *et al.*, 2007). Así mismo, se comprobó que estas proteasas tienen también potencial angiogénico, es decir, intervienen en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes (Mello *et al.*, 2007).

Los usos más importantes de las enzimas proteolíticas se encuentran en la industria alimentaria y farmacéutica.

*Industria alimentaria:*

- ❖ Clarificación de cervezas, tratamiento de la malta y cebada

- ❖ Ablandamiento de carnes.
- ❖ Extracción de zumos, saborizantes, especias y pigmentos.
- ❖ Fabricación de vinos, y clarificación de jugos de frutas y vinos (junto con las celulasas y pectinasas)
- ❖ Elaboración de hidrolizados de proteínas.

#### *Industria farmacéutica*

- ❖ Tratamiento de quemaduras y pequeñas úlceras.
- ❖ Elaboración de medicamentos para la digestión de proteínas.
- ❖ Eliminación de ciertos parásitos.

En general la industria de los alimentos prefiere el uso de enzimas proteolíticas de origen vegetal, ya que se consideran por Food Drug Administration (FDA) como Sustancias Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS) y esto se debe a que provienen de partes comestibles de distintas plantas (Dixon y Gonzales, 1994).

#### **1.2.2. Fuentes vegetales de enzimas proteolíticas**

En el grupo de las 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 mexicana 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* (Cruz y Victoria, 1993).

#### **1.2.3. Enzimas proteolíticas de *Jacaratia mexicana***

Las caricáceas son una familia de plantas que producen grandes cantidades de proteasas, encontrándose entre ellas *J. mexicana*, también conocida como *Pileus mexicanus*. Esta planta silvestre crece en las regiones subtropicales de la República Mexicana, con frutos semejantes a los de la papaya (*Carica papaya*) y de cuyo látex fue aislada la proteasa “mexicaína” en 1942 por Castañeda. Dicha enzima fue caracterizada como una proteína cisteínica, monomórfica de gran estabilidad y con mayor actividad proteolítica específica que la papaína (Romero *et al.* 1976).

Por mucho tiempo se pensó que la denominada “mexicaína” era la única proteasa presente en el látex de *J. mexicana* y que era una sola enzima, sin embargo, en estudios bioquímicos

recientes se ha demostrado la existencia de al menos cinco proteasas presentes en el látex. De acuerdo con el orden de elución de la proteasas del extracto de látex en la cromatografía de intercambio catiónico, se les nombro proteasas P-I, P-II, P-III, P-IV y P-V; esta ultima presenta mayor actividad específica que la proteasa P-IV. A la proteasa P-IV por ser la más abundante se le denomino mexicaina (Oliver, 1999).

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 *J. mexicana* pueden competir con ella (Briones *et al.*, 1994; Briones, 1996).

### **1.3. Antecedentes del cultivo de *Jacaratia mexicana***

Las proteasas cisteínicas de la familia de las Caricáceas, entre la que se encuentra la papaya (*Carica papaya*) tienen múltiples aplicaciones en la industria de los alimentos, además en preparaciones farmacéuticas conocidas (antiparasíticas, uso en medicamentos para la digestión de proteínas). Y por otra parte el uso potencial terapéutico de las nuevas actividades farmacológicas, angiogénica y mitogénica (Mello *et al.*, 2008, Gomes *et al.*, 2009). Aunado al potencial uso como un reactivo en la investigación científica. El mercado mundial de las enzimas representa aproximadamente 1000 millones de dólares anuales del cual las proteasas representan el 45% (Rao *et al.*, 1998).

En nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado que las proteasas cisteínicas de *Jacaratia mexicana* pueden competir con la papaína en usos industriales donde esta se emplea. Las proteasas cisteínicas de Caricáceas tienen gran importancia desde el punto de vista económico y científico, por lo cual se plantea como una alternativa de producción constante de esta(s) enzima(s) proteolítica(s) de *J. mexicana* es por medio de cultivos celulares en suspensión de dicha planta. Por lo que hemos realizado una amplia investigación a cerca de las condiciones para el establecimiento de cultivos celulares de *J. mexicana*. En estudios realizados por Oliver *et al.*, se estableció la formulación más apropiada del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) para la inducción de callos, usando 12 formulaciones del medio MS denominados MS1 al MS12. En nueve de las 12 formulaciones se logró la inducción y el cultivo de callos de dicha planta. De las nueve formulaciones, tres presentaron la mayor inducción de callos y producción de enzimas proteolíticas, los medios denominados MS1, que contenía 1.0 mg/L de 2,4 ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), MS5 adicionado con una auxina y una citocinina (1.0 mg/L de 2,4-D +0.25 mg/L de cinetina) y MS9 con 1.0 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de bencil aminopurina (BAP), (Oliver *et al.*, 2002).



Se demostró la producción de enzimas proteolíticas cisteínicas en cultivo de callos y en células en suspensión de *J. mexicana*, también que las proteasas son liberadas al medio de cultivo y que la producción de estas enzimas está asociada al crecimiento celular del cultivo (Oliver *et al.*, 2002; Barrera y Oliver, 2004; Oliver *et al.*, 2005).

Se estudió el efecto de la concentración de la auxina 2,4-D, (a 0.25, 0.5 y 1.0 mg/L) con medio MS completo y a 25% de sales, observándose que la concentración de la auxina 2,4-D, influye en la inducción y desarrollo de los callos. Y la formulación que resultó ser la mejor para la producción de las proteasas fue con el medio MS completo con 0.5 mg/L de BAP y de 0.5 mg/L de 2,4-D. Con esta formulación para el cultivo de callos se estableció el cultivo de células de *J. mexicana* en suspensión a nivel matraz (Martínez, 2006).

Por otro lado, los resultados del efecto de la concentración de sacarosa (2 y 4 %) con medio MS completo y a 25% de sales en cultivos celulares de *J. mexicana* en suspensión, indicaron que la formulación más adecuada del medio de cultivo para la síntesis de proteasas fue el MS completo en sales, con 0.5 mg/L de auxinas y 4% de sacarosa. Con dicha composición de medio MS se llevó a cabo un cultivo en biorreactor *air-lift* de 2 L durante 80 días (Martínez, 2006). Además se estudió el efecto de inductores y elicitores con el propósito de incrementar la producción de enzimas proteolíticas en cultivos celulares de *J. mexicana* en un biorreactor *air-lift* de 2 L, adicionando un hidrolizado de caseína (0.5 g/L) como inductor o un extracto de *Aspergillus niger* como elicitador (25 mg adicionado en cuatro intervalos de 7 días) observándose incrementos en la actividad proteolítica de 2.3 y 1.3 veces respectivamente (Barrera, 2007). Y usando caseína (0.05 g/L) como inductor se observó un incremento en la actividad proteolítica en el medio de cultivo de 1.6 veces (Montaño, 2007). También se establecieron cultivos celulares de *J. mexicana* en tres tipos de biorreactores, observándose que estas células pueden crecer en un biorreactor de tanque agitado. Los resultados fueron un crecimiento de biomasa de los cultivos celulares de *J. mexicana* similar (17%) en el biorreactor *airlift* y en el de columna de burbujeo, mientras que en el tanque agitado mecánicamente este incremento fue del 21%. La actividad proteolítica obtenida en los biorreactores de columna de burbujeo y *airlift* fue del mismo orden de magnitud ( $1.2 \times 10^4$  UT/L), en cambio en el biorreactor de tanque agitado la actividad fue mayor ( $1.7 \times 10^4$  UT/L). La viabilidad de cultivos celulares de *J. mexicana* fue similar (aprox. 84%) en los tres tipos de biorreactores bajo las condiciones hidrodinámicas estudiadas. Las velocidades de corte generadas en las condiciones de operación de los tres biorreactores (13 a  $400 \text{ s}^{-1}$ ) no provocaron disminución en la producción de enzimas proteolíticas, ni cambio significativo en la viabilidad y morfología celular de dichos cultivos. Estas evidencias experimentales sugieren que las células de *J. mexicana* son resistentes al estrés hidrodinámico generado por un biorreactor de tanque agitado dentro de las condiciones estudiadas (Morales, 2008).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años la biotecnología ha experimentado grandes avances destacando el cultivo de células vegetales para la producción de una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios, entre los cuales se encuentran las enzimas. Las enzimas proteolíticas tienen múltiples aplicaciones principalmente en las industrias alimentaria y farmacéutica y la familia de las Caricáceas es una fuente vegetal de proteasas, dentro de la cual se encuentra *J. mexicana*, que produce grandes cantidades de proteasas cisteínicas. Sin embargo es una planta silvestre que crece en regiones subtropicales de México y da frutos sólo en ciertas temporadas del año por lo tanto el cultivo *in vitro* de esta planta es una alternativa para la producción constante de estas enzimas.

En estudios de nuestro grupo de trabajo se demostró la producción de enzimas proteolíticas en cultivos de callos y en células en suspensión de *J. mexicana*, observando que estas enzimas son liberadas al medio de cultivo y asimismo se ha observado que la producción de estas enzimas está asociada al crecimiento celular. Para realizar los cultivos celulares en suspensión de *J. mexicana* desde nivel matraz hasta el cultivo en biorreactor se deben considerar dos aspectos de gran relevancia, la composición del medio de cultivo que es fundamental para lograr el máximo desarrollo celular y producción de estas enzimas. Y por otra parte considerar los parámetros hidrodinámicos del biorreactor tales como la velocidad de corte y la microturbulencia, con valores que eviten el daño celular ocasionando una disminución en la producción de enzimas y/o el posible rompimiento de las células.

Dada la importancia científica y posibles aplicaciones industriales de las proteasas de *J. mexicana* este trabajo propone establecer el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana* a nivel matraz y en biorreactor de tanque agitado de 6 L.

### **3. OBJETIVOS**

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

Producción de enzimas proteolíticas de cultivos celulares en suspensión de *J. mexicana* en un biorreactor de tanque agitado de 6 L en comparación con el de tanque agitado de 0.5L.

#### **3.2. Objetivos específicos**

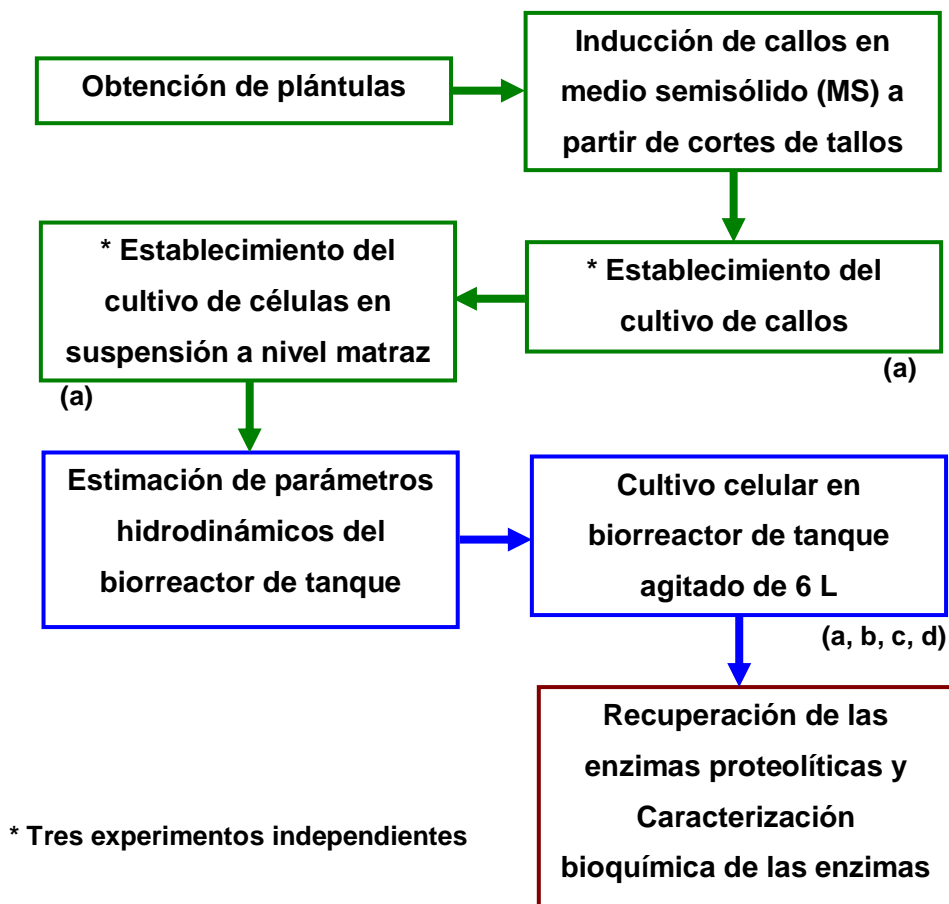
1. Evaluación de ocho formulaciones de medios MS para los cultivos de callos y células en suspensión
2. Evaluación del desempeño hidrodinámico del biorreactor de 6 L en el cultivo celular de *J mexicana*, en relación con el de 0.5L
3. Recuperación y caracterización bioquímicamente las enzimas proteolíticas de los cultivos celulares de *J. mexicana*

#### 4. METODOLOGÍA

La estrategia experimental estuvo dividida con base en tres objetivos:

1. Evaluación de los medios MS para los cultivos de callos y células en suspensión
2. Evaluación del desempeño hidrodinámico del biorreactor de 6 L en cultivo celular de *J mexicana*.
3. Recuperación y caracterización de las enzimas producidas en cultivos en suspensión

##### 4.1. Protocolo experimental



(a) Determinación de la actividad proteolítica y biomasa en el medio de cultivo

(b) Determinación de la viabilidad celular y consumo de sacarosa

(c) Evaluación del desempeño hidrodinámico del biorreactor

**Figura 1.** Diagrama de bloques del protocolo experimental para el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

## **4.2. Evaluación de ocho formulaciones de medios MS para los cultivos de callos y células en suspensión de *J. mexicana***

### **4.2.1. Material biológico**

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

### **4.2.2. Desinfección de semillas de *Jacaratia mexicana***

Las semillas se colocaron en detergente “extrán” (Merk®) al 2% (v/v) durante 40 minutos, se enjuagaron con suficiente agua destilada estéril para eliminar el detergente y se pasaron a un vaso estéril con etanol (High Purity®) al 70% por 1 minuto. Se enjuagaron varias veces con agua estéril para eliminar el etanol y se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 1.25%, (cloro libre) durante 10 min. Se enjuagaron varias veces con agua estéril para eliminar el hipoclorito de sodio. Las semillas se dejaron hidratando en un vaso de precipitados con agua estéril aproximadamente 24 horas, en condiciones de asepsia (protocolo de acuerdo a Oliver *et al.*, 1999). Posteriormente se probaron otras condiciones de desinfección, donde se colocaron las semillas durante 6 minutos en ácido sulfúrico (Reasol®) 6N, posteriormente se enjuagaron con agua corriente, para proseguir con la desinfección en detergente extrán al 2% (v/v) durante 20 minutos, se enjuagaron con suficiente agua destilada estéril para eliminar el detergente y se pasaron a un frasco estéril con etanol al 70% por 2 minutos posteriormente se trataron con cloruro de benzalkonio 0.2% (Reasol®) estéril por 20 minutos y finalmente se enjuagaron varias veces con agua estéril.

### **4.2.3. Germinación de semillas de *Jacaratia mexicana***

Del vaso de precipitados, con la ayuda de una espátula estéril se tomaron una a una las semillas y se pasaron a tubos con medio de cultivo Knop (ver anexos), Murashige & Skoog (ver anexos) ¼ en sales (MS¼). Posteriormente se probaron otros medios para la germinación de semillas que fueron: medio de cultivo MS con vitaminas B5 (MS-B5), MS¼ en sales con un pretratamiento de las semillas descrito en la sección anterior y en tierra esterilizada durante 3 horas. A cada uno de los tubos se les colocaron 3 semillas tratadas como se describe anteriormente, los tubos se colocaron en fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 27 °C hasta que la plántula alcanzó un tamaño aproximado de 12-15 cm. (protocolo de acuerdo a Martínez, 2006).

#### 4.2.4. Formulación de los medios de cultivo probados

Con el propósito de incrementar la tasa de crecimiento celular de los cultivos de callos y células en suspensión, se continuó con los estudios previos acerca de encontrar la formulación del medio de cultivo para tal fin (Oliver Vallejo, 2009; Guzmán-Reyes 2009;) y se determinó realizar un diseño de bloques completamente al azar con las formulaciones del medio de cultivo que dieron los mejores resultados, todos los medios de cultivo fueron formulados básicamente con 0.5 mg/L de ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) (Sigma Aldrich®), 0.25 mg/L de 6-bencil aminopurina (BAP) (Sigma Aldrich®) 3% de sacarosa (J. T. Baker®) y 0.6% de agar noble (Difco®); las variables a estudiar en la formulaciones del medio de cultivo MS, se presentan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Medios de cultivo MS probados en el cultivo de callos y células en suspensión de *J. mexicana*.

Vitaminas	MS completo en sales				MS ½ en sales			
	B5		MS		B5		MS	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> g/L	0.17	0.34	0.17	0.34	0.085	0.255	0.085	0.255
Medios de cultivo	MS-B5	MS-B5+P	MS-MS	MS-MS+P	MS½-B5	MS½-B5+P	MS½-MS	MS½-MS+P

B5: Vitaminas Gamborg's 1000X, MS: Vitaminas Murashige & Skoog; ambas de Sigma Aldrich®

#### 4.2.5. Establecimiento del cultivo de callos de *Jacaratia mexicana*

En una campana de flujo laminar, se realizaron cortes de aproximadamente de 1 cm del tallo de las plantas germinadas. Se colocaron 3 cortes de tejido en cada frasco tipo Gerber® con 20 mL de los ocho medios MS mencionados en el Cuadro 1. Los explantes se colocaron en un cuarto de cultivo con fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura de 26±3 °C. Se realizaron tres experimentos independientes con 10 repeticiones de cada uno de los medios de cultivo probados.

#### 4.2.6. Determinación de la tasa de crecimiento en el cultivo de callos de *J. mexicana*

Los callos inducidos bajo las condiciones antes mencionadas, fueron transferidos a medios de cultivo frescos en periodos de aproximadamente tres y ocho semanas (resiembr), hasta que estos alcanzaron un peso entre tres y cinco gramos. En cada una de las resiembras, se determinó el peso fresco de los callos por diferencia de peso de los frascos con medio de cultivo nuevo previo y posterior a la colocación de los callos. Posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la tasa de crecimiento empleando la Ecuación 1.

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{\text{peso final del callo (Peso fresco)}}{\text{peso inicial del explante (Peso fresco)}}$$

Ecuación 1

#### 4.2.7. Determinación de la actividad proteolítica en el medio semisólido

Se determinó la actividad proteolítica por el método de Ortega y del Castillo (1966) y Oliver (1999) en los medios de cultivo semisólidos donde crecieron los callos. El medio de cultivo se disgregó con una espátula estéril, se agregaron 1 mL de cisteína (Sigma Aldrich®) 0.2M, en regulador de fosfatos 0.05M, pH 7.6, los frascos se incubaron a 35°C, durante 15 minutos, se agregara a cada uno de los frascos 10 mL de caseína (Sigma Aldrich®) al 1% en regulador de fosfatos 0.05M, pH 7.6, la reacción procedió durante tres horas a 35°C, al término de ésta se tomaron alícuotas de 0.5 mL de la mezcla y se colocaran en 0.75 mL de ácido tricloroacético (ATC) (J. T. Baker®) al 5%, esto se dejó en reposo durante una hora, se centrifugaran a 6000 g durante 20 minutos y se determinó la absorbancia a 280 nm contra un blanco de reactivos (0.75 mL de ATC al 5% y 0.5 mL de regulador de fosfatos, 0.05M, pH 7.6). Con estas lecturas de absorbancia se expresara la actividad proteolítica en Unidades de Tirosina (UT=μg de Tirosina liberados h<sup>-1</sup>, en las condiciones de reacción indicadas) usando la ecuación de una Curva Tipo de Tirosina (ver anexos).

#### 4.3. Preparación del cultivo de *Jacaratia mexicana* en suspensión

Se prepararan matraces Erlenmeyer de 125 mL, a los cuales se les agregaron aproximadamente 50 mL de los ocho medios MS mencionados en el Cuadro 1, con 0.5 mg/mL de 2,4-D, 0.25 mg/L BAP y 4% de sacarosa. El medio se esterilizó a 121 °C 20 minutos (Morales, 2008). Se inocularon con aproximadamente de 5-10% (p/v) peso fresco de los callos anteriormente producidos, se sometieron a agitación a 120 rpm y fotoperíodo de 16 horas luz 8 de oscuridad a una temperatura de 25±2 °C. Se hicieron recambio de medio fresco cada tres y siete semanas.

#### 4.4. Determinación de la viabilidad celular

Se adicionó azul de tripano (ver anexos) y muestra en proporción 1:1, colocando una alícuota conocida en la cámara de Neubauer (Marienfeld®, Alemania) y se observara al microscopio. Se contarán todas las células, las vivas aparecieron refringentes y las muertas se tiñeron de azul. Se tomo en cuenta las diluciones (protocolo de acuerdo a Morales, 2008).

#### 4.5. Determinación de biomasa en los cultivos de células en suspensión

Se pesaron membranas de 0.22 μm Millipore®, se filtraron a través de ellas dos mililitros de cultivo en suspensión, los filtros se colocaron en una estufa a 60 °C, hasta que las membranas

alcanzaron un peso constante y por diferencia de peso se calculó el peso seco de las células por mililitro presentes en el medio de cultivo en suspensión (protocolo de acuerdo a Morales, 2008).

#### **4.6. Determinación de la actividad proteolítica del cultivo en suspensión**

Se colocaron en microtubos (Eppendorf®) 180 µL del medio de cultivo donde crecieron las células de *J. mexicana* y se adicionaron 60 µL de cisteína 0.8M en regulador de fosfatos 0.05M, pH 7.6; las muestras se incubaron a 37 °C durante 15 minutos para activar la enzima. Se colocaron, en microtubos, 475 µL de caseína al 1% como sustrato y se agregaron 25 µL de la enzima activada. La actividad enzimática se realizara por triplicado durante una hora a 37 °C, deteniendo la reacción con 750 µL de ATC al 5%. El testigo sólo se preparó con 475 µL de caseína al 1%; transcurridas las tres horas se le agregaron 750 µL ATC al 5% y 25 µL de la enzima activada. Los tubos se dejaron en reposo durante una hora, se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 minutos y se determinara la absorbancia a 280 nm contra un blanco de reactivos (750 µL de ATC al 5% y 500 µL de regulador de fosfatos, 0.05M, pH 7.6. Con estas lecturas de absorbancia se expresó la actividad proteolítica en Unidades de Tirosina (UT=µg de Tirosina liberados h<sup>-1</sup>, en las condiciones de reacción indicadas usando la ecuación de una Curva Tipo de Tirosina (ver anexos).

#### **4.7. Determinación de proteína en los cultivos en suspensión**

La cantidad de proteína presente en los medios de cultivo en suspensión donde crecieron las células de *J. mexicana* se determinó mediante el método de Bradford (1976). Se tomaron 100 µL del medio de cultivo y se adicionaron 1000 µL del reactivo de Bradford (ver anexos); después de 5 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm. La determinación se realizó por triplicado, ajustando contra un blanco de reactivos (250 µL de agua y 750 µL de reactivo de Bradford). Con dichas lecturas se calculó el contenido de proteína mediante la ecuación de la recta obtenida de una curva tipo de Bradford (ver anexos).

#### **4.8. Determinación del consumo de sacarosa**

El consumo de sacarosa se determinó por el método de antrona. Se colocaran 25 µL del sobrenadante del medio de cultivo en y se adicionaron 25 µL de una solución de KOH al 30%. Se colocaran en baño de agua a ebullición por 10 minutos y se permitió que se enfriaran a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 750 µL de reactivo de antrona (Sigma Aldrich®) que se prepararon en el momento (ver anexos) y se colocaron en un baño a 40 °C por 10 minutos, los tubos se dejaron reposar durante 15 minutos posteriormente se leyó la



absorbancia a 620 nm. La concentración de sacarosa se determinó usando la ecuación de una curva tipo de sacarosa (ver anexos) (Van Handel, 1967).

#### **4.9. Evaluación del desempeño hidrodinámico del biorreactor**

##### **4.9.1. Descripción del biorreactor de tanque agitado**

Se utilizó un biorreactor New Brunswick Scientific Co Inc<sup>®</sup> (New Jersey U.S.A) de tanque agitado mecánicamente con la flecha montada en la tapa del recipiente. Este biorreactor tuvo un volumen nominal de 6 L con dos impulsores, los cuales fueron turbinas Rushton de seis paletas.



**Figura 2.** Biorreactor de tanque agitado de 6 L, New Brunswick Scientific Co Inc<sup>®</sup> (New Jersey U.S.A)

##### **4.9.2. Condiciones de operación del biorreactor de tanque agitado de 6 L para el cultivo en suspensión de *J. mexicana***

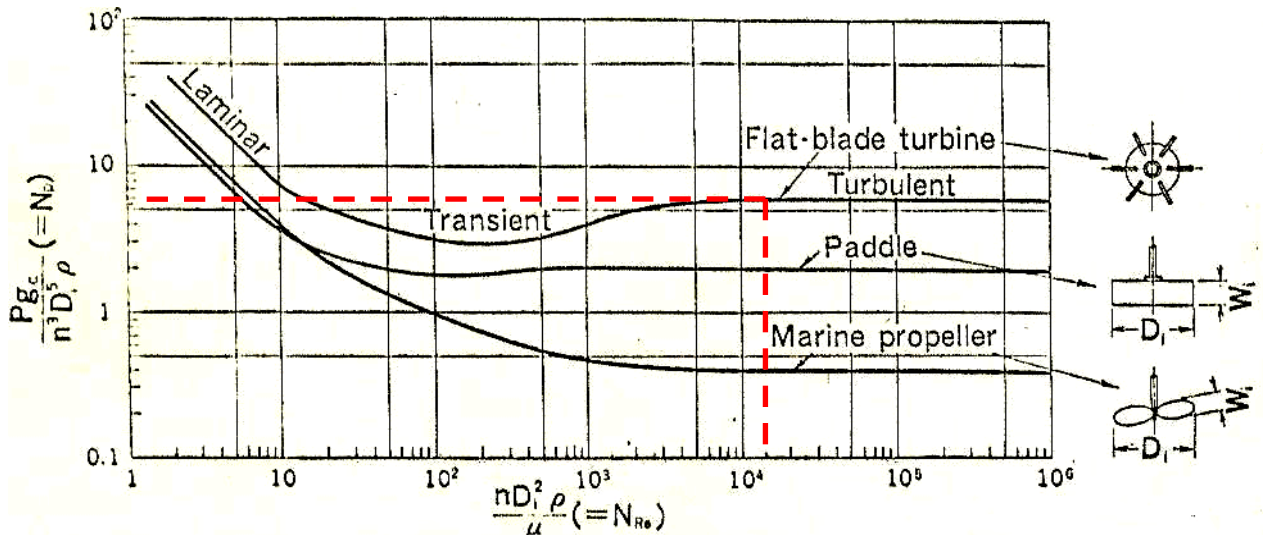
El biorreactor se inoculó con una concentración de 5% de biomasa en peso fresco. El volumen de operación fue de 4 L y la aireación de 0.5 vvm, la agitación se mantendrá en 229 rpm. Al igual que para el inóculo, la toma de muestra se realizó cada siete días. El biorreactor fue alimentado con sacarosa cada siete días para mantener la concentración en 40 g/L.

##### **4.9.3. Determinación del tiempo de mezclado por el método de adición de pulsos**

El tiempo de mezclado en biorreactor se determinó conteniendo agua destilada como líquido de prueba. La velocidad de aireación que se empleó fue de 0.5 vvm. El pH se midió cada 0.16 s con un electrodo de pH conectado a una computadora. El flujo de aire se midió con un rotámetro. Para determinar el tiempo de mezclado, el pH se ajustó a aproximadamente 9.5 con NaOH 6 N y se adicionó una alícuota de HCl 6 N. El tiempo que tardó en bajar y estabilizarse el pH, fue considerado como el tiempo de mezclado.

**4.9.4. Determinación del número de potencia, la velocidad del impulsor, la potencia suministrada, microturbulencia y las velocidades de corte en el biorreactor de tanque agitado de 6 L**

En número de potencia ( $N_p$ ) se estimó gráficamente para un flujo turbulento con número de Reynolds de  $14.6 \times 10^3$  como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Numero de Reynolds contra número de potencia

La velocidad del impulsor ( $N_i$ ) se estimó a partir de la Ecuación 2.

$$Re = \frac{N_i d_i^2 \rho}{\mu} \quad \text{Ecuación 2}$$

La potencia suministrada ( $P$ ) se estimó mediante la Ecuación 3 para flujo turbulento, donde el número de potencia es independiente del numero de Reynolds

$$P = N_p N_i^3 d_i^5 \quad \text{Ecuación 3}$$

La microturbulencia ( $\lambda$ ) se estimó mediante la Ecuación 4.

$$\lambda = \left( \frac{V^3}{P_m} \right)^{\frac{1}{4}} \quad \text{Ecuación 4}$$

La velocidad de corte promedio ( $\gamma$ ) en el tanque agitado de 6 L fue estimada de acuerdo a la Ecuación 5.

$$\gamma = \left( \frac{4 N_p \rho d_i^2}{\pi 3^3 K} \right)^{\frac{1}{(1+n)}} N_i^{\frac{3}{(1+n)}} \quad \text{Ecuación 5}$$

#### 4.9.5. Determinación de la velocidad de transferencia y consumo de oxígeno

Se utilizó un biorreactor de tanque agitado de 0.5L de volumen nominal, operando a un volumen de 0.35 L, a 400 rpm, 1 vvm y 27 °C, conteniendo un cultivo celular en suspensión de *J. mexicana* cuya densidad celular fue de 175 g/L en peso fresco (5% de inóculo).

Para determinar la velocidad de transferencia (VTO) y consumo de oxígeno (VCO) se empleó el método dinámico. Se introdujo un flujo de gas (N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>) hasta que se observaron valores mínimos y constantes de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, posteriormente se introdujo un flujo de aire y se comenzó la agitación hasta observar valores máximos y constantes de oxígeno disuelto, posteriormente se interrumpió la aireación y agitación hasta obtener valores mínimos y constantes de oxígeno disuelto en el medio. La velocidad de consumo (VCO) y la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) se determinaron a partir del cambio en la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo con respecto del tiempo después de detener y reiniciar la aireación respectivamente. El procedimiento se repitió varias veces en el cual se empleó un electrodo de oxígeno conectado a una computadora y se tomaron las lecturas cada 12 segundos. Bajo estas condiciones, la ecuación de balance de masa para oxígeno disuelto en la fase líquida considerada con un mezclado homogéneo que se puede describir como sigue:

$$\left(\frac{dC_{O_2}}{dt}\right) = K_L a \cdot (C^* - C) - q_{O_2} \cdot C_X \quad \text{Ecuación 6}$$

Al no haber transferencia de oxígeno la Ecuación 6 se puede simplificar a:

$$VCO = -q_{O_2} \cdot C_X \quad \text{Ecuación 7}$$

Al relacionar la biomasa presente con la velocidad de consumo de oxígeno se tiene:

$$VECO = \frac{VCO}{C_X} \quad \text{Ecuación 8}$$

Al no haber consumo de oxígeno la Ecuación 6 se puede simplificar a:

$$VTO = K_L a \cdot C^* \quad \text{Ecuación 9}$$

Protocolo de acuerdo a García-Ochoa, *et al.* (2010).

#### **4.10. Condiciones de la cinética del cultivo celular de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L**

#### **4.11. Recuperación de las proteasas de los medios de cultivo**

El medio de cultivo en suspensión donde crecieron las células de *J. mexicana* se dejó sedimentar por aproximadamente 24 horas. Después, en condiciones de asepsia, se decantó el sobrenadante y de éste se recuperaron las enzimas proteolíticas. Se dializó por ultrafiltración en una celda con una membrana de 5 kDa (Millipore®) de corte molecular, usando nitrógeno de alta pureza a 2.8 kg/cm<sup>2</sup>. Las muestras purificadas y el marcador de peso molecular se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS como se describe siguiente sección.

#### **4.12. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS**

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se realizó de acuerdo a Schägger y Von (1987). Para preparar el gel separador se utilizaron 2 mL de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 3.3 mL de regulador del gel (Tris 3 M y SDS 0.3%), 1.3 g de glicerol, 3.4 mL de agua destilada, 50 µL de persulfato de amonio y 8 µL de TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina). Se vació la acrilamida en el molde para el gel y se dejó polimerizar 15 minutos. Se preparó el gel concentrador de acrilamida al 3%, utilizando 0.7 mL de acrilamida-bisacrilamida, 1.55 mL de regulador del gel, 4 mL de agua destilada, 32 µL de persulfato de amonio y 8 µL de TEMED. Se vació la acrilamida, en la cámara de electroforesis Hoefer™ Dual Gel Caster (Amersham Biosciences U.S.A.) se colocó el peine y se dejó polimerizar durante 20 minutos. Después, se retiró el peine, se limpiaron los pozos con papel filtro y se colocaron 20 µL de muestra preparada [100 µL de muestra + 5 granos de azúcar + 8 µL de regulador de muestra (5 mL de glicerol al 50%, 2 mL de SDS al 10%, 1 mL de azul de bromofenol, 1.4 mL de agua destilada y Tris-HCl 1M, pH 6.8)].

Las muestras se corrieron a 70 mV durante la etapa de concentración y a 90 mV durante la etapa de separación (durante 15 y 60 minutos, respectivamente) utilizando un regulador del ánodo (Tris 0.2 M, pH 8.9) y un regulador del cátodo (Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M y SDS 0.1%) como amortiguadores de corrida. Para visualizar la muestra en el gel, este se sumergió en una solución teñidora (ácido acético 10%, azul de Coomassie G-250 1%, metanol 40% y agua destilada) por 12 horas después el gel se enjuagó con agua destilada y se sumergió en una solución desteñidora (ácido acético 10%, metanol 40% y agua destilada) durante 24 horas para eliminar el exceso de colorante, posteriormente se digitalizó la imagen del gel.

#### **4.13. Caracterización bioquímica de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de *J. mexicana***

##### **4.13.1. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática sobre BAPNA de las proteasas recuperadas de los medios de los cultivos en suspensión de *J. mexicana***

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se prepararon microtubos que contenían 0.5mL de BAPNA (Sigma Aldrich®) 10mM, en dimetil sulfóxido (DMSO) y regulador de fosfatos 0.1M, con cisteína 25mM y EDTA 25mM a pH 7. Esta solución se incubó a diferentes temperaturas: 25, 30, 40, 50, 55, 60 y 65°C. Posteriormente, para iniciar la reacción se adicionaron a los tubos con el sustrato, 0.1 mL de la solución de enzima y a los testigos se les añadió 0.1mL del mismo regulador, se mezclaron y se dejó transcurrir la reacción por 10 min a cada una de las temperaturas de incubación. La reacción se detuvo agregando 0.25 mL de ácido acético y se midió el incremento de absorbancia a 410nm contra un blanco de reactivos. Para determinar el efecto del pH se prepararon microtubos que contenían 0.5mL de BAPNA 10mM, en DMSO y regulador a los diferentes pH preparados de la siguiente manera: pH 5.0 y 5.5 (acetatos 0.1M), pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 (fosfatos 0.1M), pH 8.5, 9.0, 9.5 10.0 (boratos 0.1M) con cisteína 25mM y EDTA 25mM, ajustando a los diferentes pH antes mencionados. Esta solución se incubó a 40°C. Posteriormente, para iniciar la reacción se adicionaron a los tubos con el sustrato, 0.1mL de la solución de enzima y a los testigos se les añadió 0.1mL del mismo regulador, se mezclaron y se dejó transcurrir la reacción por 10 minutos. La reacción se detuvo agregando 0.25mL de ácido acético y se midió el incremento de absorbancia a 410 nm contra un blanco de reactivos (Dubois, *et al.* 1989).

##### **4.13.2. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad proteolítica de las enzimas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de *J. mexicana***

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica se tomaran 180 µL del medio de cultivo donde crecieron las células de *J. mexicana* y se adicionaran 60 µL de cisteína 0.8M en regulador de fosfatos 0.05M, pH 7.6; las muestras se incubaron a 37 °C durante 15 minutos para activar la enzima. Se colocaron en tubos eppendorf, 475 µL de caseína al 1% como sustrato y se agregaran 25 µL de la enzima activada. La actividad enzimática se realizara por triplicado durante una hora a diferentes temperaturas 25, 30, 40, 50, 55, 60 y 65 °C. Para determinar el efecto del pH sobre la actividad proteolítica se tomaran 180 µL del medio de cultivo donde crecieron las células de *J. mexicana* y se adicionaran 60 µL de cisteína 0.8 M en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.6; las muestras se incubaron a 37 °C durante 15 minutos para activar la enzima. Se colocaron en tubos eppendorf, 475 µL de caseína como sustrato preparada al 1% en diferentes reguladores preparados de la siguiente manera: pH 5.0 y 5.5 (acetatos 0.05M), pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 (fosfatos 0.05M), pH 8.5, 9.0,

9.5 10.0 (boratos 0.05M) y se agregaran 25  $\mu\text{L}$  de la enzima activada. La actividad enzimática se realizó por triplicado durante una hora a temperatura de 37 °C, deteniendo la reacción con 750  $\mu\text{L}$  de ATC al 5%. Para las dos determinaciones anteriores el testigo sólo se preparó con 475  $\mu\text{L}$  de caseína al 1% preparada como se menciona anteriormente; transcurridas las tres horas se le agregaran 750  $\mu\text{L}$  ATC al 5% y 25  $\mu\text{L}$  de la enzima activada. Los tubos se dejaron en reposo durante una hora, se centrifugaran a 6000 rpm durante 15 minutos y se determinara la absorbancia a 280 nm contra un blanco de reactivos (750  $\mu\text{L}$  de ATC al 5% y 500  $\mu\text{L}$  de regulador de fosfatos, 0.05M, pH 7.6 para cuando se determino el efecto de la temperatura y a cada uno de los diferentes pH analizados. Con estas lecturas de absorbancia se expresara la actividad proteolítica en Unidades de Tirosina ( $\text{UT} = \mu\text{g}$  de Tirosina liberados  $\text{h}^{-1}$ , en las condiciones de reacción indicadas) usando la ecuación de una Curva Tipo de Tirosina (ver anexos).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Evaluación de los medios MS para los cultivos de callos y células en suspensión

#### 5.1.1. Germinación de semillas de *Jacaratia mexicana*

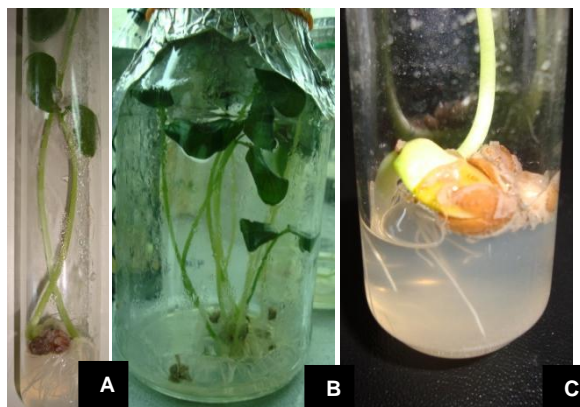
Con la finalidad de obtener plántulas utilizadas para iniciar el cultivo de callos, se germinaron semillas de *J. mexicana* como se describe en la sección de materiales y métodos en el Cuadro 2 se muestran los valores de porcentaje y tiempo de germinación obtenidos con los cuatro diferentes medios de cultivo empleados para la germinación de semillas de *J. mexicana*, donde se puede observar que los valores de porcentaje mayores fueron con medio MS¼ con el pretratamiento de las semillas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N durante 6 minutos (90%) y con tierra (73%). Sin embargo cuando se germinó en tierra estéril, con la finalidad de reducir en tiempo de germinación se observó una contaminación con hongos filamentosos que crecieron en el medio provocando la contaminación de las plántulas, a pesar la desinfección de estas previo a la inducción de callos, se observó contaminación en los frascos donde se realizó el cultivo de callos. Por lo tanto no es recomendable utilizar tierra ya que a pesar de tiempos largos de esterilización (3 horas) las esporas de hongos permanecen viables.

**Cuadro 2.** Porcentaje de germinación de los diferentes medios utilizados para la germinación de semillas de *J. mexicana*

Medio de cultivo	Germinación (%)	Tiempo de germinación (días)
Knop	53	20
<b>MS¼</b>	<b>73</b>	<b>13</b>
MS-B5	30	25
**MS¼	90	12
*Tierra	85	11

\* Contaminación por hongos, \*\*Pretratamiento de semillas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N

Con el medio MS ¼ y realizando un pretratamiento de las semillas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N se obtuvo un porcentaje mayor de germinación de 60, 37 y 17% con respecto al medio MS-B5, Knop, MS¼ en sales respectivamente, en la Figura 4 se pueden observar las plántulas cultivadas en los medios MS¼ en sales y con medio Knop. Este incremento en el porcentaje de germinación cuando se aplicó un pretratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N se debe a que la testa de la semilla es reblandecida facilitando el paso de los nutrientes presentes en el medio de cultivo hacia el embrión.



**Figura 4.** Plántulas de *J. mexicana*, **A)** germinadas en medio MS¼ con pretatamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, **B)** Plántulas germinadas con Medio MS¼, **C)** Plántulas germinadas con medio Knop

### 5.1.2. Efecto de la composición del medio MS en la tasa de crecimiento de los cultivos de callos de *J. mexicana*

Con el objetivo de obtener callos friables de *J. mexicana* para el posterior cultivo de células en suspensión. Se realizó el cultivo de callos como se describe en la sección de materiales y métodos. El incremento en la biomasa se determinó como se describe en el apartado de materiales y métodos, resemebrados cada tres y ocho semanas. El Cuadro 3 muestra los resultados obtenidos de la tasa de crecimiento de uno de los tres experimentos, donde se puede observar un incremento con respecto al tiempo, este comportamiento es similar en los tres experimentos realizados (los resultados de los otros dos experimentos se muestran en los anexos).

**Cuadro 3.** Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en la tasa de crecimiento de callos de *J. mexicana*

Medio de cultivo	*Tasa de crecimiento	**Tasa de crecimiento
MS-B5	7.3±0.8	17.6±1.1
MS-MS	6.7±0.5	18.2±0.9
<b>MS-B5+P</b>	<b>11.8±0.9</b>	<b>30.3±0.5</b>
MS-MS+P	9.9±0.4	23.3±1.0
MS½-B5	5.4±0.6	18.5±0.2
MS½-MS	5.5±0.7	17.5±0.5
MS½-B5+P	9.1±0.8	22.5±1.1
MS½-MS+P	8.0±0.7	20.7±0.9

Resultados del experimento dos, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Ocho semanas de cultivo,

Con el medio de cultivo MS-B5+P presentó el mayor incremento en de todos medios probados. Se obtuvo un incremento en la tasa de crecimiento de 76, 62 y 19% en comparación con los medios MS-MS, MS-B5 y MS-MS+P respectivamente. En relación a los medios de cultivo con



la mitad de la concentración de sales el medio MS $\frac{1}{2}$ -B5+P presentó valores de 68, 65 y 13% comparado con los medios de cultivo MS $\frac{1}{2}$ -B5, MS $\frac{1}{2}$ -MS, y MS $\frac{1}{2}$ -MS+P respectivamente. Martínez (2006) reportó mayores tasas de crecimiento en el cultivo de callos de *J. mexicana* empleando el medio MS completo con respecto a  $\frac{1}{4}$  en sales, observándose tasas de crecimiento similares a los 30 días de cultivo. Con lo anterior se puede decir que el desarrollo de las células en el cultivo de callos está directamente relacionado a la concentración de nutrientes presentes en el medio MS así como del tipo y la concentración de reguladores de crecimiento empleados en estos cultivos.

### 5.1.3. Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica de los cultivos de callos de *J. mexicana*

La actividad proteolítica de las enzimas producidas por los callos de *J. mexicana* se determinó como se describe en la sección de materiales y métodos cada tres y ocho semanas. En el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos de las unidades de tirosina por litro de medio cultivo de uno de los tres experimentos, donde se puede observar un incremento con respecto al tiempo, este comportamiento es similar en los tres experimentos realizados (los resultados de los otros dos experimentos se muestran en los anexos).

**Cuadro 4.** Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica de las enzimas de *J. mexicana* liberadas al medio de cultivo

Medio de cultivo	*Actividad proteolítica (UT/L)	**Actividad proteolítica (UT/L)
MS-B5	26,060.81±1,292.98	60,273.25±546.51
MS-MS	28,888.47±628.30	58,031.11±1,492.81
<b>MS-B5+P</b>	<b>39,318.07±794.52</b>	<b>81,276.65±686.86</b>
MS-MS+P	35,059.89±301.96	72,079.70±380.75
MS $\frac{1}{2}$ -B5	12,520.96±563.30	56,809.66±326.64
MS $\frac{1}{2}$ -MS	10,315.45±100.22	44,730.35±3,417.34
MS $\frac{1}{2}$ -B5+P	33,989.44±447.34	68,441.20±1,835.61
MS $\frac{1}{2}$ -MS+P	29,385.81±2,489.35	52,403.88±2,038.82

Resultados del experimento dos, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Ocho semanas de cultivo,

Con el medio de cultivo MS-B5+P se obtuvo el mayor incremento en la actividad proteolítica con relación a todos los medios probados. Siendo dichos incrementos de 50, 36 y 12% en comparación con los medios MS-B5, MS-MS y MS-MS+P respectivamente. En relación a los medios de cultivo con la mitad de la concentración de sales probados con el medio MS $\frac{1}{2}$ -B5+P se obtuvo el mayor incremento de estos medios siendo 229, 171 y 15% comparado con los medios de cultivo MS $\frac{1}{2}$ -MS, MS $\frac{1}{2}$ -B5 y MS $\frac{1}{2}$ -MS+P respectivamente.

Martínez (2006) reporta que empleando el medio MS completo en sales y 0.5 mg/L de 2,4-D como regulador de crecimiento en el cultivo de callos se obtiene una mayor producción de

enzimas proteolíticas de *J. mexicana* liberadas, que se traduce en un incremento en la actividad proteolítica determinada en los medios de cultivo donde crecieron dichos callos.

Barrera (2004) reporta incrementos en la actividad proteolítica en el cultivo de callos de *Bromelia hemisphaerica* cuando se emplea el medio MS completo en con respecto a ¼ en sales.

Los resultados mencionados anteriormente muestran que existe una relación directa entre la actividad proteolítica y la composición del medio de cultivo, ya que al aumentar dichas sales se observan incrementos en la actividad proteolítica, además se puede inferir que está vinculada al crecimiento de los callos.

#### 5.1.4. Efecto de la composición del medio MS en la biomasa de los cultivos de células en suspensión de *J. mexicana*

Los cultivos de células en suspensión de *J. mexicana* se realizaron como se describe en la sección de materiales y métodos. El incremento en la biomasa se determinó como se describe en el apartado de materiales y métodos sembrados cada tres y ocho semanas En el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos de la biomasa de uno de los tres experimentos, donde se puede observar un incremento con respecto al tiempo, este comportamiento es similar en los tres experimentos realizados (los resultados de los otros dos experimentos se muestran en los anexos).

**Cuadro 5.** Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana*

Medio de cultivo	*Biomasa (g/L) <sub>PS</sub>	**Biomasa (g/L) <sub>PS</sub>
MS-B5	3.2±0.3	5.5±0.1
MS-MS	2.3±0.5	4.8±0.4
<b>MS-B5+P</b>	<b>6.4±0.2</b>	<b>12.2±0.9</b>
MS-MS+P	5.0±0.4	10.0±0.5
MS½-B5	1.6±0.2	3.1±0.3
MS½-MS	2.0±0.4	3.6±0.3
MS½-B5+P	3.3±0.3	6.4±0.5
MS½-MS+P	4.3±0.2	8.6±0.7

Resultados del experimento dos, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Siete semanas de cultivo, PS: Peso seco.

El medio de cultivo MS-B5+P presentó un incremento en biomasa de 178, 100 y 28% en comparación con los medios MS-MS, MS-B5, y MS-MS+P respectivamente un comportamiento similar se observa con los medios con la mitad de la concentración de sales. En relación a los

medios de cultivo con la mitad de la concentración de sales; con el medio MS $\frac{1}{2}$ -B5+P se observó un incremento de biomasa de 106, 65 con respecto a los medios MS $\frac{1}{2}$ -B5, MS $\frac{1}{2}$ -MS respectivamente.

#### 5.1.5. Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica en los cultivos de células en suspensión de *J. mexicana*

La actividad proteolítica de las enzimas producidas por las células en suspensión de *J. mexicana* se determinó como se describe en la sección de materiales y métodos cada tres y siete semanas. En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos de las unidades de tirosina por litro de medio cultivo de uno de los tres experimentos, donde se puede observar un incremento con respecto al tiempo, este comportamiento es similar en los tres experimentos realizados (los resultados de los otros dos experimentos se muestran en los anexos).

**Cuadro 6.** Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica de las enzimas de *J. mexicana* liberadas al medio de cultivo

Medio de cultivo	*Actividad proteolítica (UT/L)	**Actividad proteolítica (UT/L)
MS-B5	102,358.82±669.16	189,789.68±5,018.72
MS-MS	100,308.42±1,969.96	162,819.05±7,026.20
<b>MS-B5+P</b>	<b>186,582.90±4,014.97</b>	<b>375,035.34±2,007.49</b>
MS-MS+P	174,280.50±4,684.13	338,128.16±18,067.37
MS $\frac{1}{2}$ -B5	93,605.19±1,003.74	186,240.91±24,089.83
MS $\frac{1}{2}$ -MS	69,394.71±3,356.94	140,106.94±17,063.23
MS $\frac{1}{2}$ -B5+P	171,204.90±5,018.72	255,087.00±3,011.23
MS $\frac{1}{2}$ -MS+P	129,566.03±7,695.36	278,508.87±20,094.86

Resultados del experimento dos, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Siete semanas de cultivo,

El medio de cultivo MS-B5+P presentó un incremento en la actividad proteolítica de 86, 82 y 7% en comparación con los medios MS-MS, MS-B5 y MS-MS+P respectivamente. En relación a los medios de cultivo con la mitad de la concentración de sales el medio MS $\frac{1}{2}$ -B5+P se presentaron incrementos de la actividad de 146, 82 y 32% comparando con los medios de cultivo MS $\frac{1}{2}$ -MS, MS $\frac{1}{2}$ -B5 y MS $\frac{1}{2}$ -MS+P respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Martínez (2006) quien demostró la influencia de la concentración de sales del medio MS en la actividad proteolítica del medio de cultivos en suspensión de *J. mexicana*, indicando un incremento del 28% y 27% en la actividad proteolítica al emplear MS completo en sales con respecto a MS $\frac{1}{4}$ .

### 5.1.6. Efecto de la composición del medio MS en la síntesis de proteína en los cultivos de células en suspensión de *J. mexicana*

La concentración de proteína en los cultivos en suspensión de *J. mexicana* se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos cada tres y siete semanas. En el Cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos de la proteína excretada al medio de cultivo de uno de los tres experimentos, donde se puede observar un incremento con respecto al tiempo, este comportamiento es similar en los tres experimentos (los resultados de los otros dos experimentos se muestran en los anexos).

**Cuadro 7.** Efecto de la composición del medio MS en la producción de proteína en el cultivo en suspensión de *J. mexicana*

Medio de cultivo	*Proteína(mg/L)	**Proteína(mg/L)
MS-B5	19.8±2.91	47.35±2.64
MS-MS	28.4±5.43	44.79±6.55
<b>MS- B5+P</b>	<b>36.0±0.66</b>	<b>67.27±0.30</b>
MS-MS+P	29.9±3.23	63.34±0.63
MS½-B5	17.0±4.80	43.47±0.19
MS½-MS	10.3±0.99	16.36±1.26
MS½-B5+P	34.4±0.16	53.44±4.85
MS½-MS+P	26.0±2.16	56.41±1.34

Resultados del experimento dos, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Siete semanas de cultivo,  $\sigma \leq 5\%$

Con el medio de cultivo MS-B5+P se presentaron incrementos en concentración de proteína en el medio de cultivo de 82, 26 y 20% en comparación con los medios MS-B5, MS-MS y MS-MS+P respectivamente. En relación a los medios de cultivo con la mitad de la concentración de sales el medio MS½-B5+P se presentaron incrementos proteína de 234, 102 y 32% comparado con los medios de cultivo MS½-MS, MS ½-B5 y MS ½-MS+P respectivamente.

### 5.1.7. Consumo de sacarosa en los cultivos de *J. mexicana* en suspensión

La concentración de sacarosa en los cultivos en suspensión de *J. mexicana* se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos cada tres y siete semanas. En el Cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos del consumo de sacarosa de uno de los tres experimentos, donde se puede observar un consumo casi total de la sacarosa presente en el medio, este comportamiento es similar en los tres experimentos realizados (los resultados de los otros dos experimentos se muestran en los anexos).

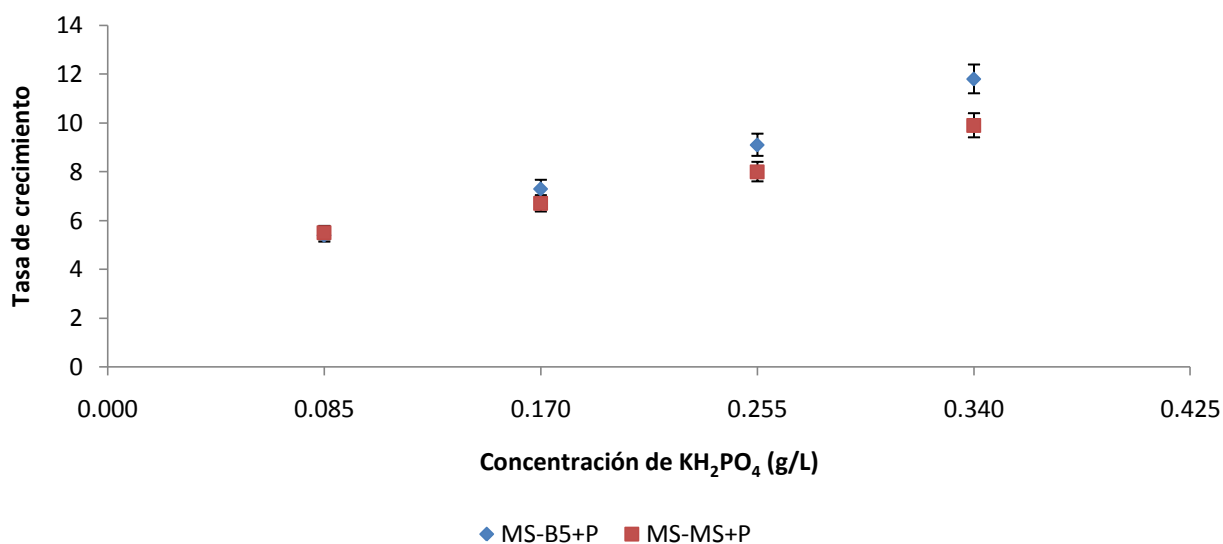
**Cuadro 8.** Consumo de sacarosa en los cultivos en suspensión de *J. mexicana*

Medio de cultivo	*Sacarosa (g/L)	**Sacarosa (g/L)
MS-B5	37.4±2.5	39.8±0.1
MS-MS	36.5±3.0	39.8±0.2
MS-B5+P	35.8±4.0	39.6±0.2
MS-MS+P	35.2±3.8	39.6±0.1
MS½-B5	36.2±3.7	39.4±0.5
MS½-MS	35.3±4.0	39.4±0.3
MS½-B5+P	33.3±4.2	39.7±0.1
MS½-MS+P	36.4±3.1	39.2±0.6

Resultados del experimento dos, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Siete semanas de cultivo,

### 5.1.8. Efecto de la concentración de fósforo en los cultivos celulares de callos y suspensión de *J. mexicana*

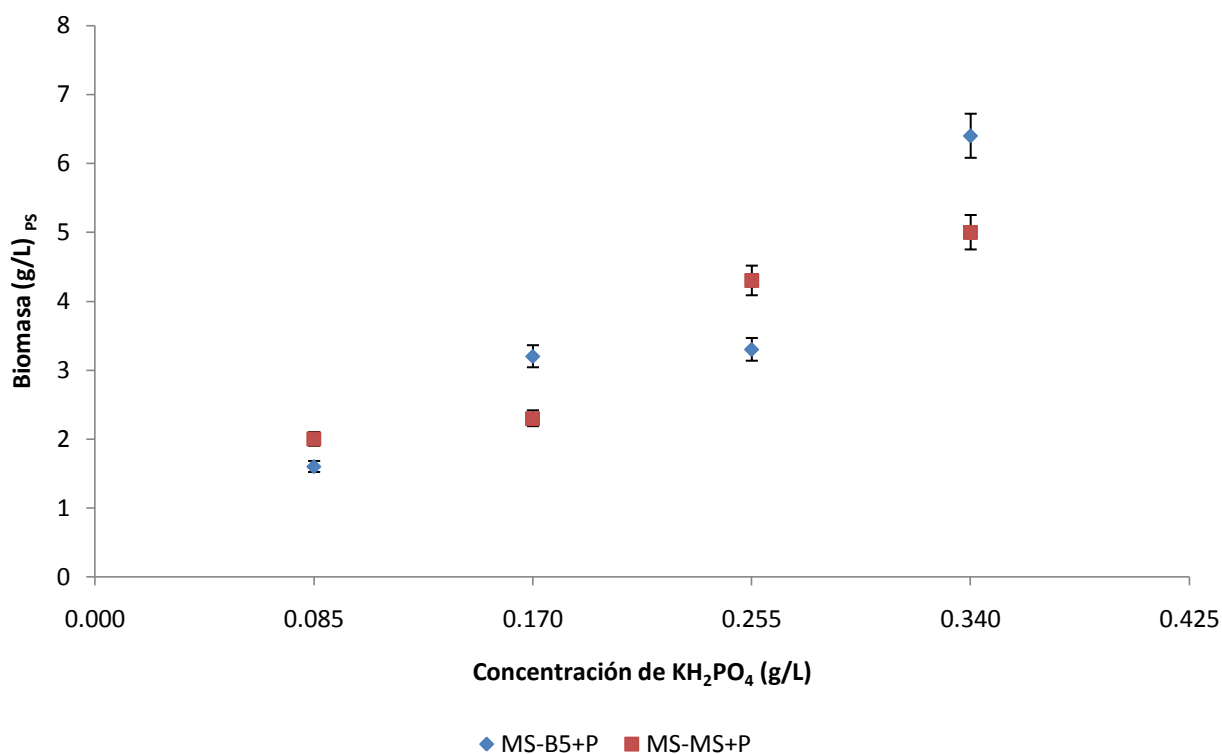
Con la finalidad de estudiar la influencia que tiene la concentración de fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) presente en el medio de cultivo sobre la tasa de crecimiento de los callos y el incremento de la biomasa (expresada en peso fresco) en el cultivo de callos y de células en suspensión de *J. mexicana* se determinaron dichos incrementos como se describe en el apartado de materiales y métodos. En las Figuras 5 y 6 se muestran los resultados del cultivo de callos y células en suspensión respectivamente.



**Figura 5.** Efecto de la concentración de fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en la tasa de crecimiento de callos de *J. mexicana*

Con el medio MS-B5+P y MS-MS+P se presentaron la tasa de crecimiento mayor con respecto a los otros medios de cultivo probados. Con el medio de cultivo MS-B5+P se presentaron incrementos de biomasa de 119,62, 30% con respecto a los medios MS½-B5, MS-B5, MS½-

B5+P, por otro lado con MS-MS+P se presentaron incrementos de 80, 47, 23% con respecto a MS $\frac{1}{2}$ -MS, MS-MS, MS $\frac{1}{2}$ -MS+P. Comparando los dos medios que tienen mayor influencia sobre la tasa de crecimiento con MS-B5+P la tasa de crecimiento es 19% mayor que con MS-MS+P.



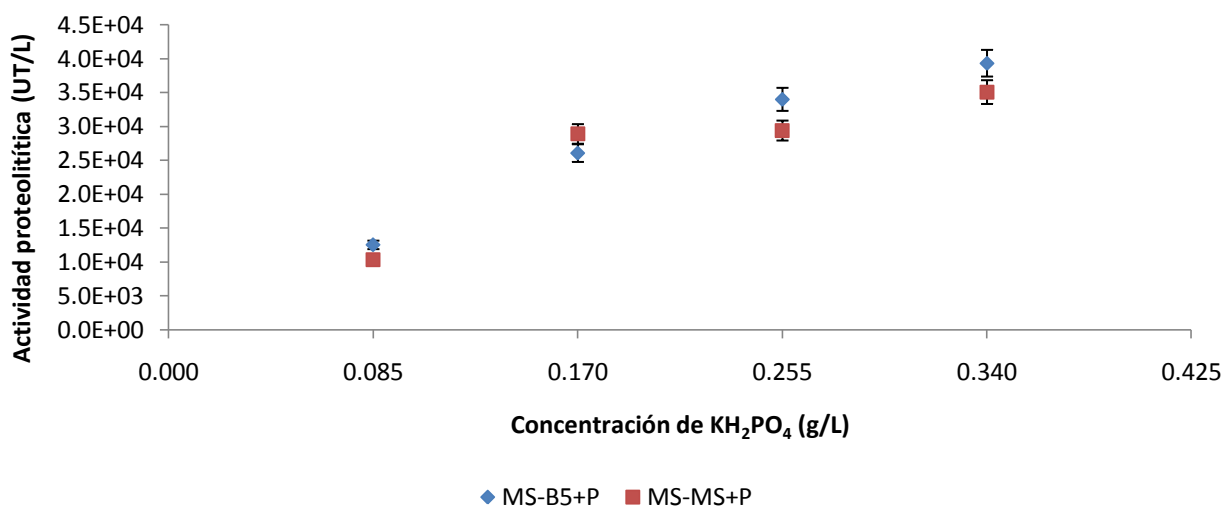
**Figura 6.** Efecto de la concentración del fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en la producción biomasa de los cultivos en suspensión de *J. mexicana*

Con el medio MS-B5+P y MS-MS+P se presentaron los valores más altos de biomasa con respecto a los otros medios de cultivo probados. Con el medio de cultivo MS-B5+P se presentó un incremento en el mismo parámetro de 300,200, 194% con respecto a los medios MS $\frac{1}{2}$ -B5, MS-B5, MS $\frac{1}{2}$ -B5+P, por otro lado MS-MS+P presentó incrementos de 150, 117, 16% con respecto a MS $\frac{1}{2}$ -MS, MS-MS, MS $\frac{1}{2}$ -MS+P. Comparando los dos medios que tienen mayor influencia sobre la tasa de crecimiento con MS-B5+P la tasa de crecimiento es 28% mayor que con MS-MS+P.

#### 5.1.9. Efecto de la concentración de fósforo en la actividad proteolítica y proteína en los cultivos celulares de callos y suspensión de *J. mexicana*

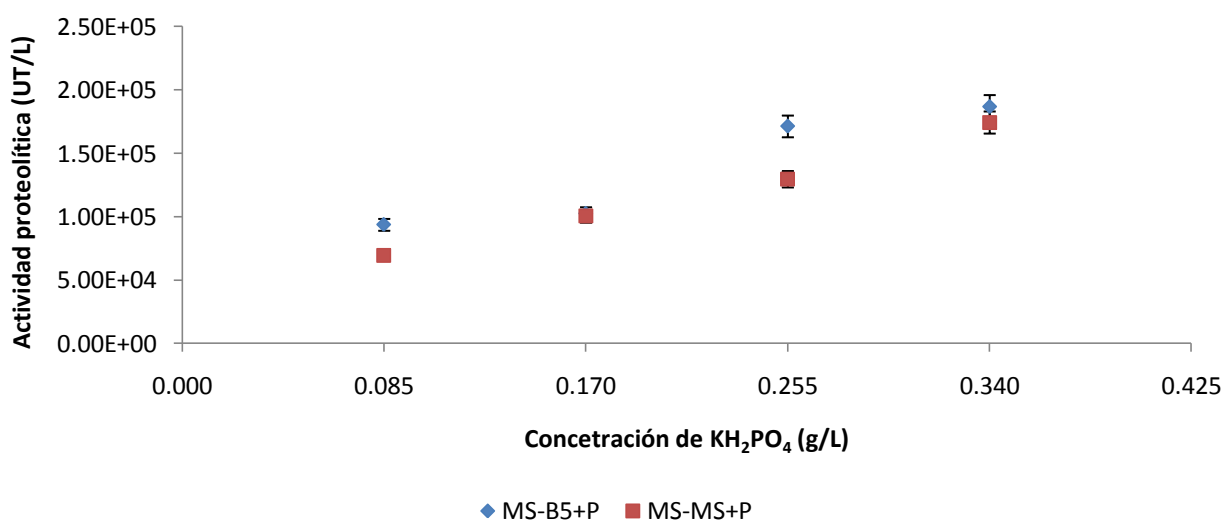
Cuando se analizan los resultados de las Figuras 7, 8 y 9 se observa que la actividad proteolítica y la síntesis de proteína, aumenta conforme se incrementa la concentración de fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) presente en el medio de cultivo y esta relación es evidente tanto con los medios suplementados con vitaminas B5 como MS. Aparentemente no hay una influencia

determinante en la actividad proteolítica y la síntesis de proteína en relación a las vitaminas usadas en los medios de cultivo.



**Figura 7.** Efecto de la concentración de fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en la actividad proteolítica del medio de los cultivos de callos de *J. mexicana*

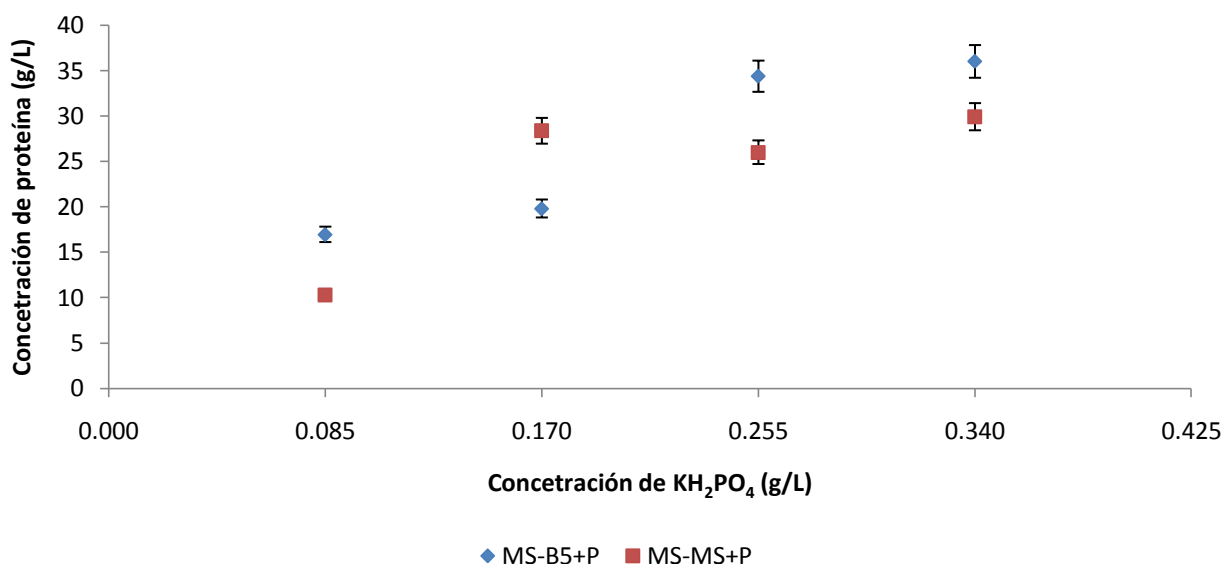
Los cultivos de callos en los medios MS-B5+P y MS-MS+P presentaron los valores más altos de actividad proteolítica con respecto a los demás medios de cultivo probados. Los callos cultivados en MS-B5+P mostraron incrementos de 214, 51, 16% con respecto a MS $\frac{1}{2}$ -B5, MS-B5, MS $\frac{1}{2}$ -B5+P, por otra parte MS-MS+P presentó incrementos de 240, 21 y 19% con respecto a MS $\frac{1}{2}$ -MS, MS-MS, MS $\frac{1}{2}$ -MS+P. Comparando los dos medios que presentan mayor influencia sobre la actividad proteolítica, con MS-B5+P se obtiene una actividad proteolítica 12% mayor que con MS-MS+P.



**Figura 8.** Efecto de la concentración de fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en la actividad proteolítica del medio de los cultivos en suspensión de *J. mexicana*

Con el cultivo de células en suspensión los medios MS-B5+P y MS-MS+P presentaron los valores más altos actividad proteolítica con respecto a los demás medios de cultivo probados. Los callos cultivados en MS-B5+P mostraron incrementos de 99, 82, 9% con respecto a MS $\frac{1}{2}$ -B5, MS-B5, MS $\frac{1}{2}$ -B5+P, por otra parte MS-MS+P presentó incrementos de 151, 73 y 34% con respecto a MS $\frac{1}{2}$ -MS, MS-MS, MS $\frac{1}{2}$ -MS+P. Comparando los dos medios que presentan mayor incremento en la actividad proteolítica, con MS-B5+P las unidades de actividad proteolítica son 7% mayores que con MS-MS+P.

Como puede observarse (figura 8) aparentemente no hay una influencia determinante en cuanto al incremento de la actividad proteolítica los cultivos, en relación a las vitaminas usadas en los medios de cultivo.



**Figura 9.** Efecto de la concentración de fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en la síntesis de proteína en los cultivos en suspensión de *J. mexicana*

En el cultivo de células en suspensión los medios MS-B5+P y MS $\frac{1}{2}$ -B5+P presentaron los valores más altos actividad proteolítica con respecto a los demás medios de cultivo probados. Los callos cultivados en MS-B5+P mostraron incrementos de 112, 81, 5% con respecto a MS $\frac{1}{2}$ -B5, MS-B5, MS $\frac{1}{2}$ -B5+P, por otra parte MS-MS+P presentó incrementos de 190, 15 y 6% con respecto a MS $\frac{1}{2}$ -MS, MS $\frac{1}{2}$ -MS+P, MS-MS. Comparando los dos medios que presentan mayor incremento sobre la actividad proteolítica, MS-B5+P es 5% mayor que MS $\frac{1}{2}$ -B5+P.

El efecto de la concentración de fosforo en los cultivos vegetales es diverso: forma parte del mecanismo energético, en la fosforilación y desfosforilación de proteínas y enzimas, en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, etc. (Pérez *et al.*, 2004). Los resultados mostrados anteriormente indican una influencia determinante en la síntesis de proteína y en la actividad proteolítica así



como de la tasa de crecimiento que se expresa como incremento de biomasa en el cultivo de callos y células en suspensión de *J. mexicana*, un efecto similar se observó en los cultivo de: suspensión de *Silene vulgaris* (2005), *Oryza sativa* (Shih y Kao, 1996), *Panax ginseng* y *Panax quinquefolium* (Liu y Zhong, 1998) y ginseng (Zhang y Zhong, 1997; Liu y Zhong 1998).

## 5.2. Evaluación del desempeño hidrodinámico del biorreactor de 6 L en cultivo celular de *J mexicana*

Para desarrollar la ingeniería del biorreactor y optimizar el proceso de producción de proteasas, es necesario conocer el desempeño hidrodinámico del biorreactor, evaluado a nivel laboratorio. Con la finalidad de determinar las condiciones de operación del biorreactor de tanque agitado de 6 L para llevar a cabo el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana* a un volumen mayor se estimaron diversos parámetros hidrodinámicos, que serán comparados con los resultados obtenidos en investigaciones previas donde se empleo un biorreactor de tanque agitado de 0.5 L.

### 5.2.1. Determinación del número de potencia, la velocidad del impulsor, la potencia suministrada y las velocidades de corte en el biorreactor de tanque agitado de 6 L

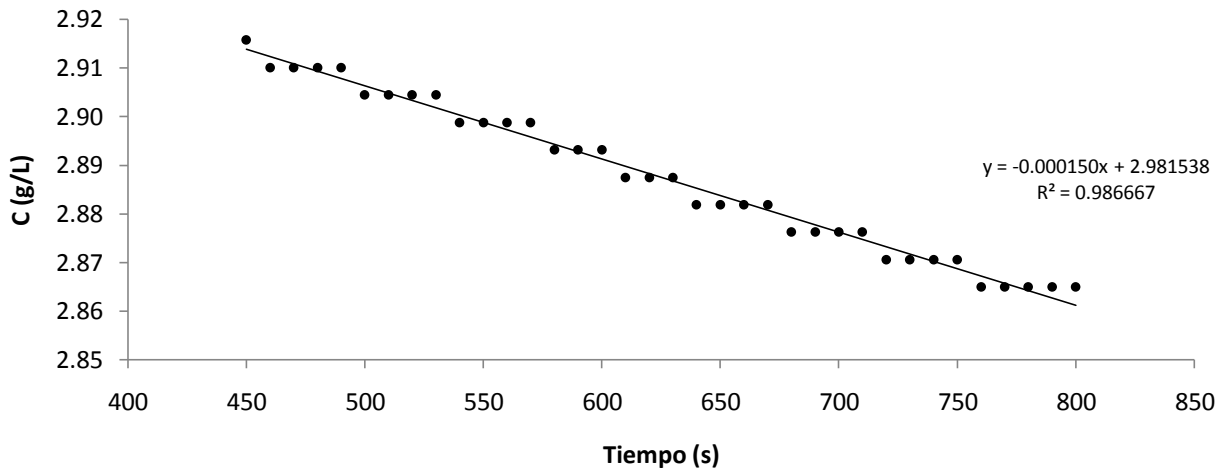
Existen diversas ecuaciones que sugieren que, en fluidos Newtonianos, la velocidad de corte promedio y máxima depende de las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del cultivo y las propiedades físicas y mecánicas del biorreactor en flujos laminares y turbulentos, respectivamente. Sánchez *et al.* (2006) correlacionaron valores de la velocidad de corte promedio del impulsor con la velocidad rotacional de éste. Se llevo a cabo dicha correlación y los valores obtenidos de la estimación de dichos parámetros se muestran en el Cuadro 14.

**Cuadro 9.** Velocidad del impulsor, potencia suministrada, velocidad de corte, microturbulencia y tiempo de mezclado empleados para el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana*

Biorreactor	Velocidad del impulsor (rpm)	Volumen de operación (L)	Potencia suministrada (W/L)	Velocidad de corte ( $s^{-1}$ )	Microturbulencia ( $\mu m$ )	Tiempo de mezclado (s)
Tanque agitado 0.5L	400	0.4	0.215	274	46	16.5
Tanque agitado 6.0L	257	4.0	0.079	275	52	9.4

### 5.2.2. Velocidad de transferencia y consumo de oxígeno

La velocidad de transferencia y consumo de oxígeno de las células de *J. mexicana* se determinó como se describe en el apartado de materiales y métodos. La Figura 5 muestra los resultados de la concentración de oxígeno con respecto del tiempo, donde se puede observar que el descenso en la concentración de oxígeno se comporta de forma lineal durante el periodo de tiempo de la prueba.



**Figura 5.** Cambio de la concentración de oxígeno disuelto durante la realización del método dinámico para determinar el consumo de oxígeno del cultivo de *J. mexicana*.

La velocidad del consumo de oxígeno fue de  $9.4 \times 10^{-4}$  g/Lh, siendo la velocidad específica de consumo de oxígeno de  $0.3 \times 10^{-3}$  g/g. El valor de la velocidad específica de consumo de oxígeno para las células de *J. mexicana* en cultivos en suspensión, es dieciséis veces menor a la reportada para el cultivo de hibridomas  $4.8 \times 10^{-3}$  g/g y de un orden menor al del hongo *Penicillium chrysogenum*, que corresponde a  $5.12 \times 10^{-2}$  g/g. Con respecto a organismos unicelulares como las levaduras y las bacterias, se tiene una diferencia de uno y de dos a nueve órdenes respectivamente, es decir, de  $3.2 \times 10^{-2}$  g/g para *Candida bombicola* NRL Y-17069 y de  $6.08 \times 10^{-2}$  g/g para *Phaffia rhodozyma* ENMS 1100; de  $9.92 \times 10^{-2}$  g/g para *Bacillus acidocaldarius* NRC-207 F y de  $7.36 \times 10^{-1}$  g/g para *Escherichia coli* K10a. La velocidad específica de consumo de oxígeno del cultivo celular de *J. mexicana* es comparable con la reportada por Kieran, *et al.* (1997) para cultivos de células vegetales que se encuentra en el orden de  $10^{-3}$  g/g. Sin embargo, es menor de dos a tres órdenes con respecto a la velocidad de consumo de oxígeno por litro de medio de cultivo reportado por Hellwig, *et al.* (2004) para cultivo de células vegetales en suspensión ( $3.2 \times 10^{-2}$  -  $1.12 \times 10^{-1}$  (g/Lh)).



**Figura 10.** Determinación de la velocidad de transferencia y consumo de oxígeno en el cultivo en suspensión de *J. mexicana*

### **5.3. Cultivo en suspensión de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L**

Se inició el cultivo en el biorreactor de tanque agitado con volumen nominal de 6 L New Brunswick Scientific Co Inc<sup>®</sup> con un volumen de operación de 4L, el cual se inoculó con 190.5 g de biomasa en peso fresco (5.0% de inóculo). El medio utilizado fue el MS-B5+P (0.50 mg/L de 2,4-D + 0.25 mg/L de BAP) y con 4% de sacarosa ajustado a pH 5.7, el biorreactor se mantuvo bajo fotoperiodo de 16 horas de luz natural y se mantuvo a 27 °C usando una chaqueta de calentamiento. Iniciado el cultivo, se muestreó a tiempo cero y cada semana asimismo se adicionó sacarosa estéril para mantener la concentración de sacarosa constante cada semana. A las muestras se les determinó viabilidad celular, biomasa, actividad proteolítica, proteína y sacarosa residual, por la metodología anteriormente descrita.

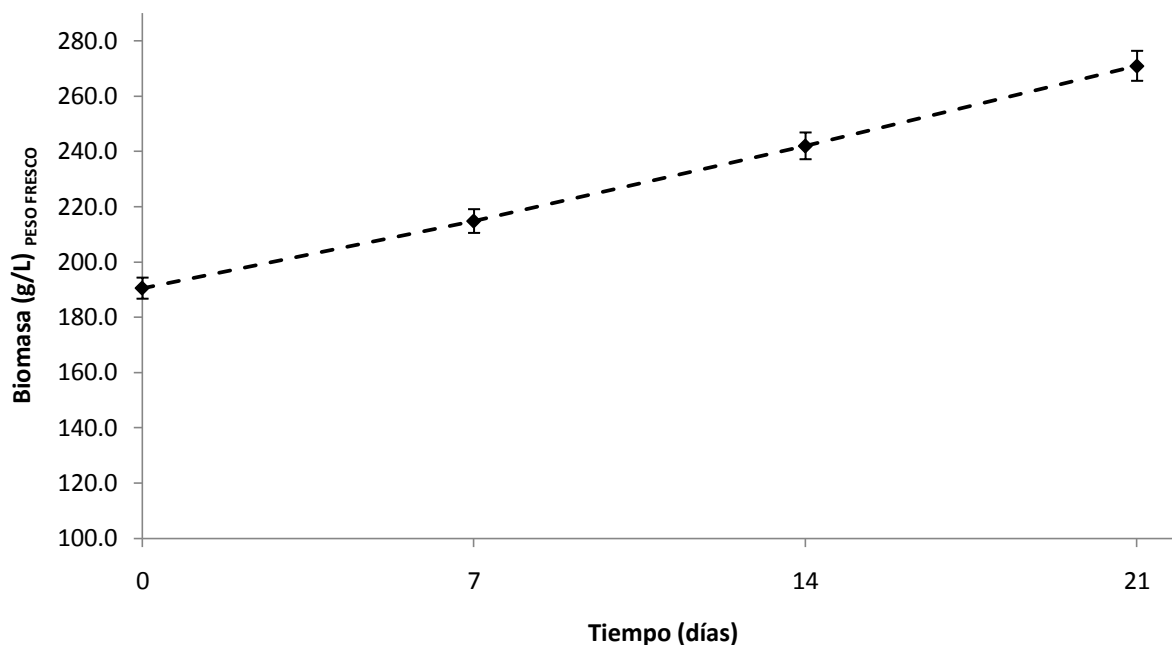


**Figura 11.** Biorreactor de tanque agitado de 6 L, New Brunswick Scientific Co Inc<sup>®</sup> con cultivo de células de *J. mexicana*.

#### **5.3.1. Producción de biomasa del cultivo celular de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L**

Con la finalidad de comparar el desempeño hidrodinámico del biorreactor de tanque agitado de 6 L con el de 0.5L (Morales 2009) en la producción de biomasa y de enzimas proteolíticas por

cultivos celulares de *J. mexicana*, se realizó el cultivo en suspensión como se describe en el apartado 4.9.2 de materiales y métodos. El cultivo se inicio con una biomasa de 190.5 g/L (5%) y el incremento en la biomasa se determinó como se describe en el apartado 4.5 de materiales y métodos.

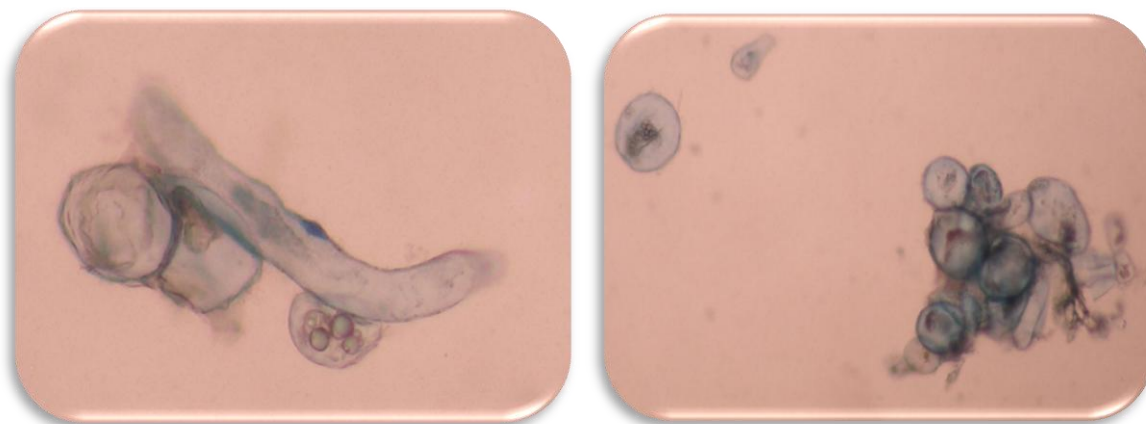


**Figura 12.** Cinética de biomasa del cultivo celular en suspensión de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

En la Figura 12 se puede observar un aumento ascendente del crecimiento celular determinado en peso fresco durante los 21 días de cultivo, obteniéndose aproximadamente un incremento de 1.5 veces en la biomasa a los 21 días de cultivo con respecto del tiempo cero. Bajo condiciones de microturbulencia de  $52 \mu\text{m}$  y esfuerzo de corte de  $275 \text{ s}^{-1}$  se obtuvo un incremento de biomasa de 2.4 veces con respecto a condiciones similares al mismo cultivo en un biorreactor de 0.5L a los 28 días de cultivo reportado por Garnica *et, al* (2009). Aunque las condiciones de operación no son similares a las empleadas en este trabajo, se observa un incremento de la biomasa de 4.2 veces con respecto al cultivo celular en suspensión de *J. mexicana* en un biorreactor de tanque agitado de 3L (volumen de operación 0.8L) a 400 rpm con una velocidad de corte de  $315 \text{ s}^{-1}$  y 20 días de cultivo; (Morales, 2008).

También se evaluó la viabilidad de dicho cultivo celular encontrándose que se mantiene de 85 a 90% la viabilidad durante los 21 días de cultivo, estos resultados son similares a los obtenidos en cultivos celulares de *J. mexicana* por Morales (2008) y Garnica (2009) 80 a 85%. Con lo cual se puede decir que las células son capaces de resistir condiciones de microturbulencia de  $52 \mu\text{m}$  y velocidades de corte de  $275 \text{ s}^{-1}$  con crecimiento celular (figura 12)

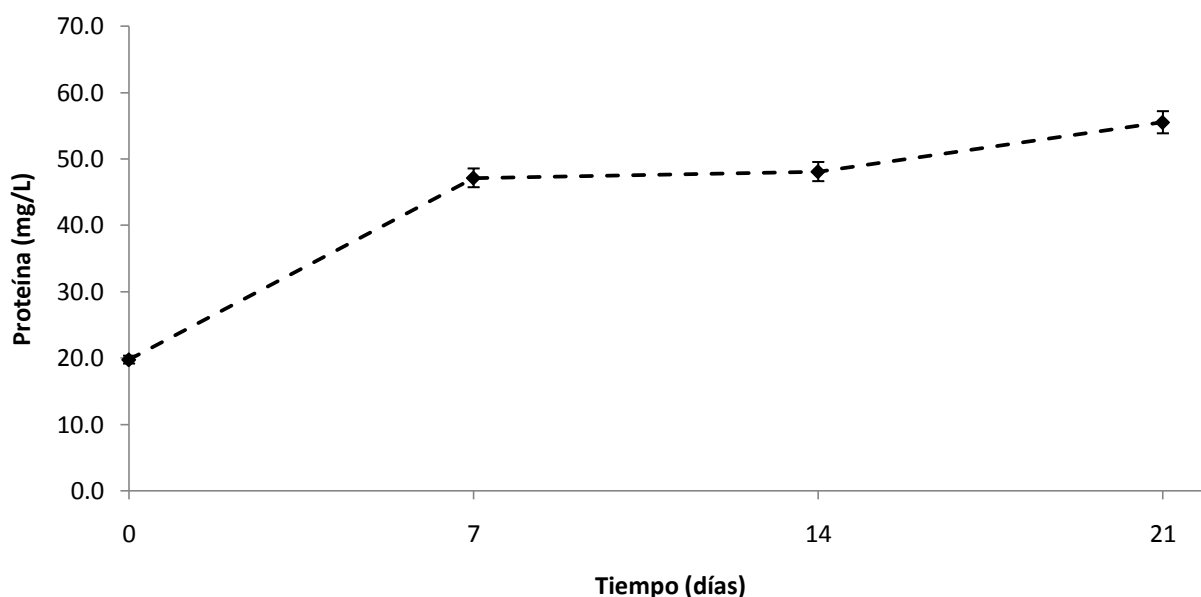
y producción de enzimas proteolíticas (figura 13). Además se observó que no hubo modificaciones morfológicas de las células (Figura 13) resultado que está de acuerdo a lo reportado por Garnica *et. al* (2009) en un biorreactor de tanque agitado de 0.5L a 400 rpm.



**Figura 13.** Imágenes de células de *J. mexicana* por microscopio optico 10X

### 5.3.2. Síntesis de proteína durante el cultivo en suspensión de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

Con la finalidad de realizar la cinética de producción de enzimas por cultivos celulares de *J. mexicana*, se realizó el cultivo en suspensión como se describe en el apartado 4.9.2 de materiales y métodos. El incremento en la concentración de proteína se determinó como se describe en el apartado 4.7 de materiales y métodos.



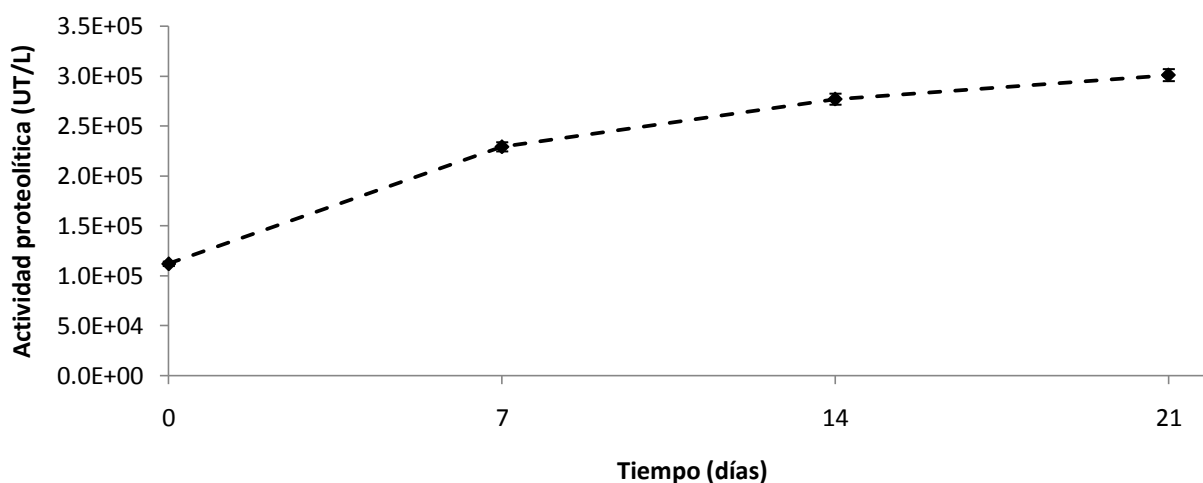
**Figura 14.** Cinética de la síntesis de proteína por cultivos celulares en suspensión de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

Con el biorreactor de 6 L se obtuvieron valores muy similares de proteína, a lo reportado por Garnica *et, al* (2009) a los 21 días del cultivo celular en un biorreactor de 0.5L bajo condiciones de microturbulencia de 52  $\mu\text{m}$  y esfuerzo de corte de 275  $\text{s}^{-1}$ .

Aunque las condiciones de operación no son similares con las empleadas en este trabajo, se observa un decremento de la proteína de aproximadamente 2.6 veces con respecto al cultivo en suspensión de *J. mexicana* en un biorreactor de tanque agitado de 3L (volumen de operación 0.8L) a 400 rpm y velocidad de corte de 315  $\text{s}^{-1}$  a 20 días de cultivo (Morales, 2008). Cabe hacer notar que aunque en la presente investigación se obtuvo una concentración menor de proteína la actividad proteolítica fue mayor 19 veces.

### 5.3.3. Actividad proteolítica durante el cultivo en suspensión de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

El cultivo en suspensión de *J. mexicana* se realizó como se describe en el apartado 4.9.2 de materiales y métodos. Con la finalidad de realizar la cinética de la actividad proteolítica de las enzimas presentes el medio de cultivo, la actividad proteolítica se determinó como se describe en el apartado 4.6 de materiales y métodos.



**Figura 15.** Cinética de la actividad proteolítica de las enzimas sintetizadas a partir del cultivo en suspensión de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

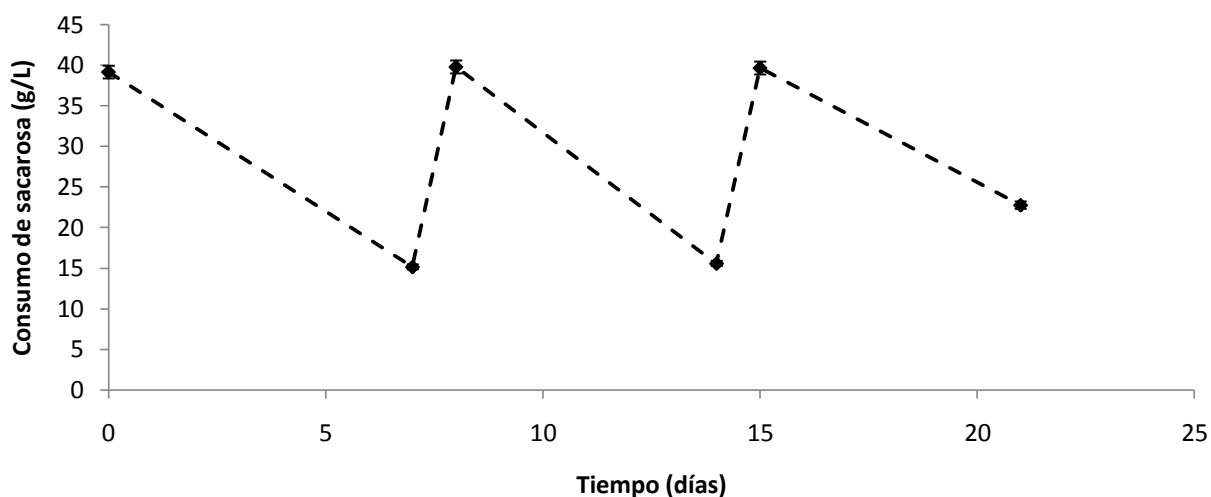
Bajo en condiciones de microturbulencia de 52  $\mu\text{m}$  y esfuerzo de corte de 275  $\text{s}^{-1}$  similares al biorreactor de 0.5L se obtuvo un incremento en la actividad proteolítica de 3.9 veces con respecto a lo reportado por Garnica *et, al* (2009) a los 28 días de cultivo.

Aunque las condiciones de operación no son similares con las empleadas en este trabajo, se observa un incremento de la actividad proteolítica de aproximadamente 19 veces con respecto

al cultivo en suspensión de *J. mexicana* en un biorreactor de tanque agitado de 3L (vol de operación 0.8L) a 400 rpm y velocidad de corte de  $315 \text{ s}^{-1}$  a 20 días de cultivo (Morales, 2008).

#### 5.3.4. Consumo de sacarosa durante el cultivo en suspensión de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

El cultivo de células en suspensión de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L se realizó como se describe en la sección 4.9.2, el consumo sacarosa (como fuente de carbono) se realizó como se describe en la sección 4.8 de materiales y métodos, posterior a esta medición cada siete días se procedió a adicionar la sacarosa consumida para mantener una concentración de 40 g/L de sacarosa.4.9.1



**Figura 16.** Consumo de sacarosa en durante el cultivo en suspension de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

#### 5.4. Consumo de Oxígeno en el cultivo celular de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

El consumo de oxígeno se determinó como se describe en la sección 18 de materiales y métodos. Observándose que no varió significativamente durante el cultivo manteniéndose prácticamente constante ( $9.4 \times 10^{-4} \pm 2.0 \times 10^{-4} \text{ g/Lh}$ ) durante los 21 días de cultivo.

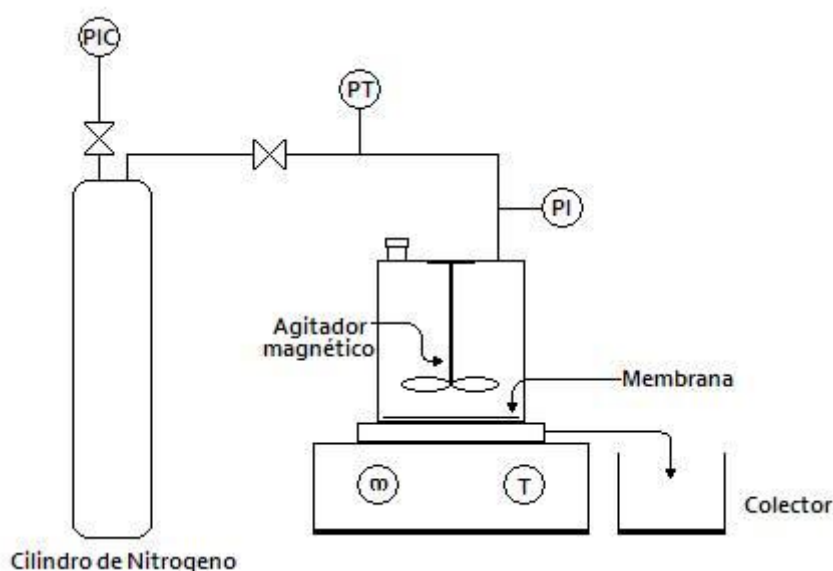
#### 5.5. Determinación del pH del cultivo celular de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L

Se determinó el pH del cultivo celular de *J. mexicana* durante 21 días observándose que no varió significativamente durante el cultivo y el pH se mantuvo prácticamente constante a  $5.70 \pm 1.0$ .

## 5.6. Recuperación y caracterización de las enzimas producidas en cultivos en suspensión

### 5.6.1. Recuperación de las proteasas de los medios de cultivo en suspensión de *J. mexicana*

La recuperación de las enzimas proteolíticas de *J. mexicana* a partir de los cultivos en suspensión se realizó como se describe en el apartado 4.10 de materiales y métodos. En la figura 3 se observa un esquema del proceso de recuperación de las enzimas producidas por cultivos en suspensión de *J. mexicana*.



**Figura 17.** Diagrama del proceso de recuperación de las enzimas proteolíticas del medio de los cultivos en suspensión de *J. mexicana*.

En el Cuadro 15 se puede observar los datos de proteína y de la actividad proteolítica al inicio y al final del proceso de recuperación.

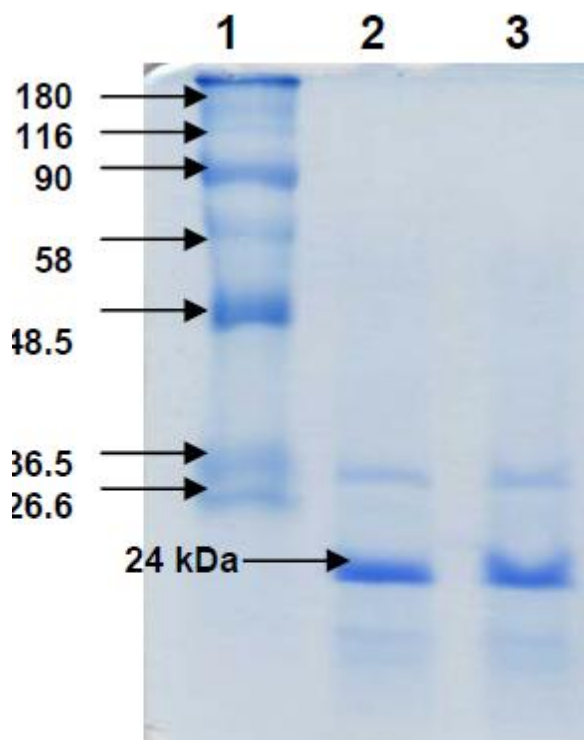
**Cuadro 10.** Valores de volumen, proteína y actividad proteolítica de los medios de cultivo recuperados y concentrados por ultrafiltración

Volumen (mL)		Proteína ( $\mu\text{g/mL}$ )		Actividad proteolítica (UT/L)	
Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
610	13	25.3	189.5	130,794.70	119,220.20
500	14.5	112.2	802.1	45,433.10	122,113.80
500	13.5	45.5	303.3	190,113.80	253,773.30



### 5.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS

Con la finalidad de conocer la composición de proteínas en el medio del cultivo de células en suspensión de *J. mexicana* así como el PM de las enzimas producidas y recuperadas de dichos medios, se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS como se describe en el apartado 4.12 de materiales y métodos. En la Figura 18 se muestra el gel de electroforesis de las muestras de las enzimas recuperadas de los medios de cultivo en suspensión de *J. mexicana*.



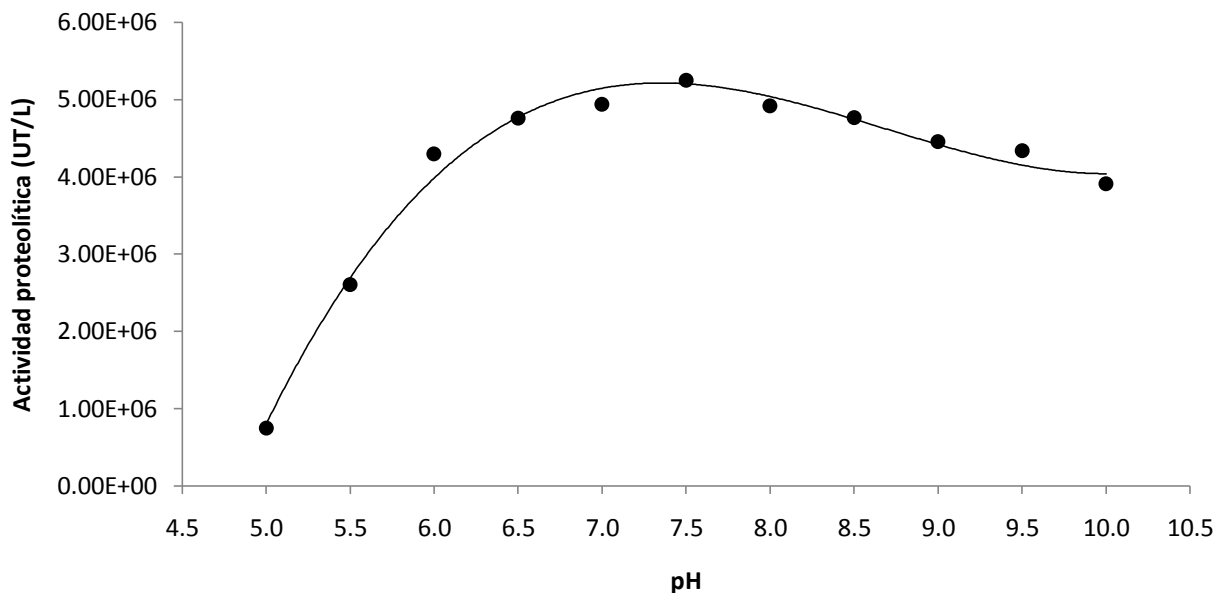
**Figura 18.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS. **Carril 1)** Marcador de peso molecular de 26.6 a 180 kDa. **Carriles 2 y 3)** Medio de cultivo en donde crecieron las células de *J. mexicana*.

### 5.6.3. Caracterización bioquímica de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de *J. mexicana*

#### 5.6.3.1. Efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica

Con el propósito de conocer el efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de las enzimas recuperadas de los medios de los cultivos en suspensión de *J. mexicana*, se realizó la determinación del pH y temperatura óptima como se describe en la sección de materiales y métodos, en la Figura 3 se muestra la actividad proteolíticas en unidades de tirosina por litro, producidas por la hidrólisis de las enzimas proteolíticas sobre el sustrato (caseína). Se puede observar que la actividad proteolítica aumenta hasta alcanzar un máximo hasta pH de 7.5 y posteriormente se observa un descenso gradual de la actividad proteolítica. A pH 10 se

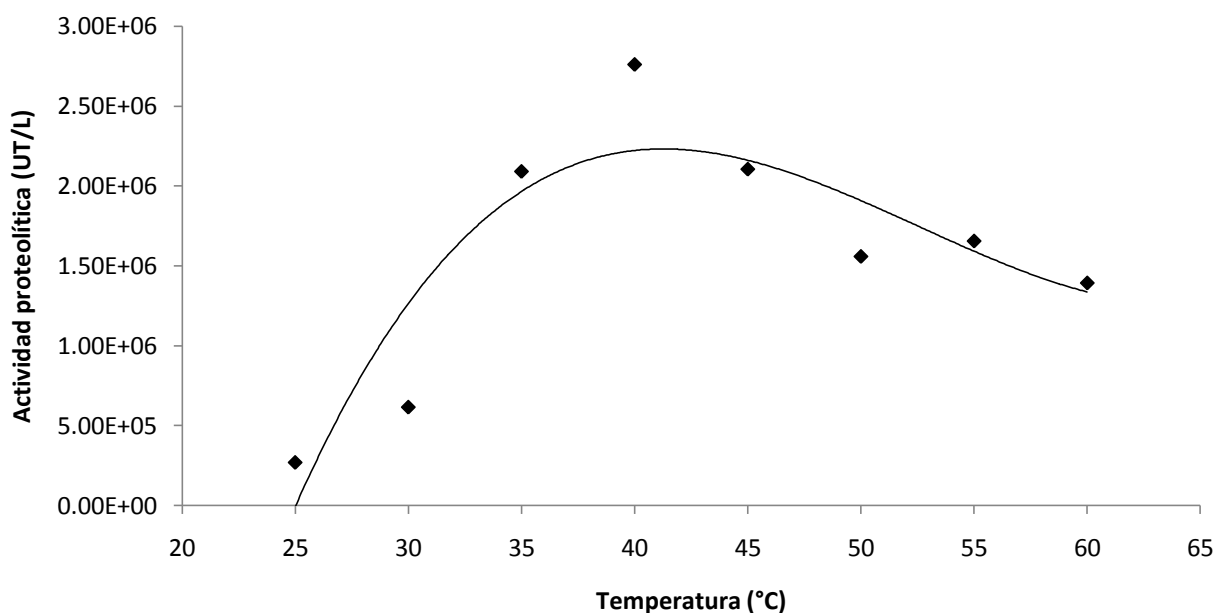
conserva un 74% y a pH de 5.5 se conserva un 50% de la actividad proteolítica con respecto al pH óptimo de esta enzima (pH 7.5).



**Figura 19.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de *J. mexicana*.

Los datos obtenidos en este trabajo de pH óptimo para las proteasas recuperadas del cultivo de células en suspensión de *J. mexicana* son muy similares a los obtenidos por Feijoo-Siota y Villa (2010) reportando un pH óptimo para papaína y bromelaína de 7.0 y 7.5 respectivamente empleando como sustrato caseína; del mismo modo Cormier *et al.* (1989) reporta un pH óptimo para ficina de 7.0 sobre el mismo sustrato mencionado anteriormente.

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de las enzimas de *J. mexicana* en la Figura 4 se presentan los resultados de las unidades de tirosina por litro obtenidos a diferentes temperaturas, donde se puede observar que a una temperatura de 25 y 60 °C se conserva un 10 y 50% de la actividad proteolítica, con respecto a la temperatura óptima de 40 °C.



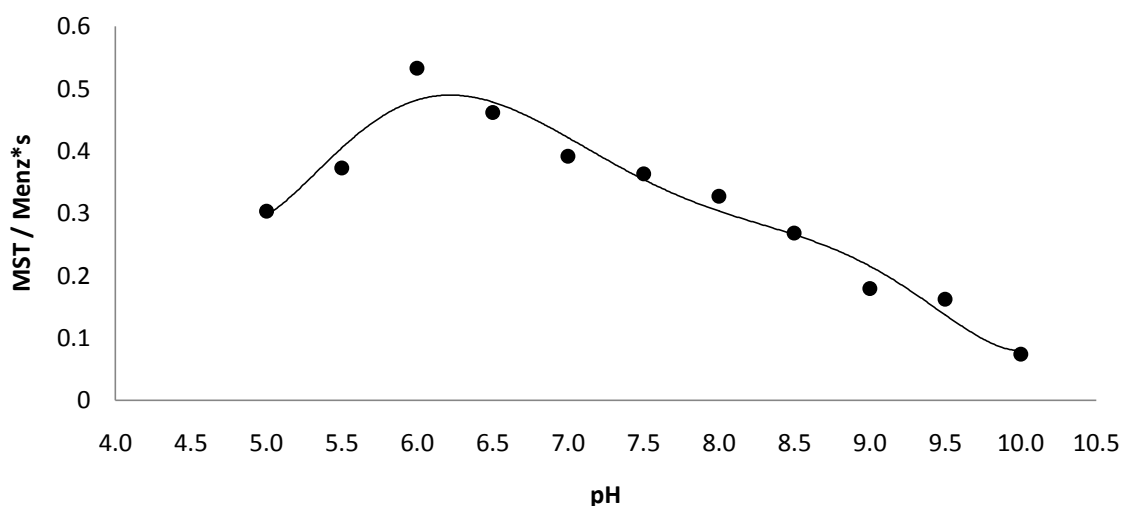
**Figura 20.** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de *J. mexicana*.

Los datos obtenidos en este trabajo de temperatura óptima para las proteasas recuperadas del cultivo de células en suspensión de *J. mexicana* son muy similares a los obtenidos por Feijoo-Siota y Villa (2010) reportando una temperatura óptima para papaína y bromelaína de 60 y 65°C respectivamente empleando como sustrato caseína; del mismo modo Cormier *et al.* (1989) reporta un pH óptimo para ficina de 25 sobre el mismo sustrato mencionado anteriormente.

La similitud en estos parámetros (pH y temperatura) se debe a que todas las enzimas proteolíticas mencionadas anteriormente son proteasas cisteínicas obtenidas ya sea de látex y/o de cultivos de callos y células en suspensión de plantas pertenecientes a la familia de las caricáceas.

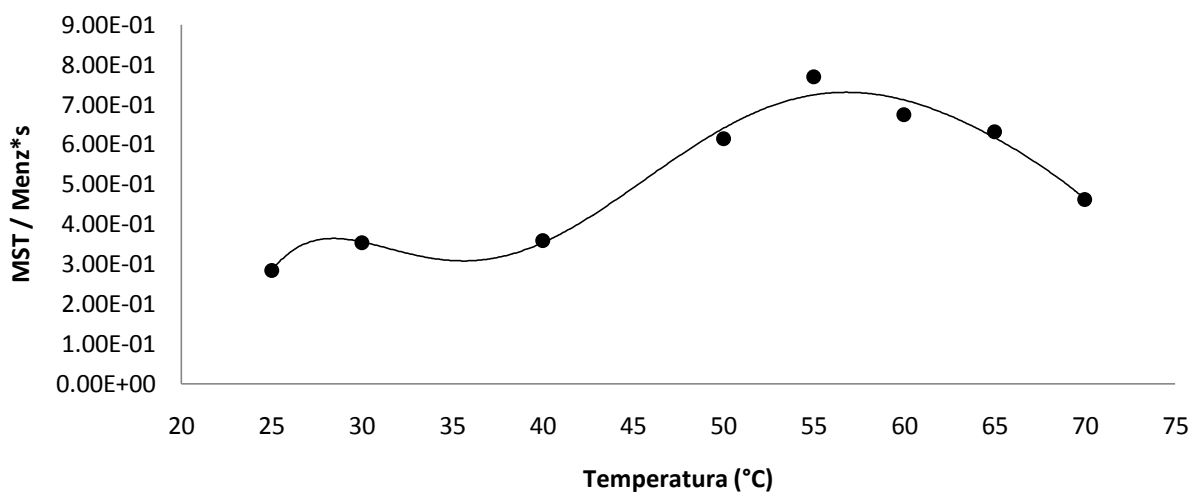
### 5.6.3.2. Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática sobre BAPNA

El efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática de los cultivos en suspensión de *J. mexicana* se realizó como se describe en la sección 4.13.1. En las figuras se muestran los resultados de los moles de sustrato transformados por moles de enzima por segundo a diferente pH y temperatura, respectivamente. Se puede observar que la actividad proteolítica aumenta conforme aumenta el pH hasta el valor de 6.0 donde se presenta la mayor actividad enzimática, posteriormente se observa un descenso en este parámetro. A pH 5.0 y 10.0 se observó que se conserva el 57% y 14% de la actividad enzimática, respectivamente.



**Figura 21.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de *J. mexicana*.

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, en la figura 21 Se puede observar que la actividad enzimática aumenta proporcionalmente al incremento de la temperatura hasta 55 °C, posteriormente se observa un descenso inversamente proporcional al aumento de la temperatura. A 25 y 70 °C se conserva un 37 y 70% de la actividad enzimática, respectivamente.



**Figura 22.** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las proteasas recuperadas de los medios de cultivos en suspensión de *J. mexicana*.

## 6. CONCLUSIONES

El medio de cultivo que presento mayor porcentaje de germinación de las semillas de *J. mexicana* fue el MS¼ en sales y pretratamiento con acido sulfúrico.

El medio MS-B5+P presentó las mayores tasas de crecimiento y de actividad proteolítica en los cultivos de callos de *J. mexicana*, con respecto a los demás medios probados.

El medio MS-B5+P presentó incremento en biomasa, proteína y actividad proteolítica en los cultivos en suspensión de *J. mexicana*, con respecto a los demás medios probados.

Se observo una correlación directa con incremento en biomasa, síntesis de proteína y en la actividad proteolítica de los cultivos celulares de *J. mexicana* al incrementar la concentración de fosforo (de 0.5, 1.0, 1.5 y 2 veces) en el medio de cultivo MS.

Aparentemente no se observa una influencia determinante en la tasas de crecimiento y en la actividad proteolítica de los cultivos de callos y de células en suspensión de *J. mexicana* con respecto al tipo vitaminas B5 o MS usadas en el medio de cultivo.

La velocidad de transferencia de oxígeno con y sin aireación ( $1.3 \times 10^{-1}$  g/Lh y  $0.7 \times 10^{-1}$  g/Lh) es mayor a la velocidad de consumo de oxígeno de las células en suspensión de *J. mexicana* ( $9.4 \times 10^{-4}$  g/Lh)

El cultivo celular de *J. mexicana* en biorreactor de tanque agitado de 6 L se mantuvo durante 21 días, con desarrollo celular y síntesis de enzimas proteolíticas en condiciones de microturbulencia de 52  $\mu\text{m}$  y esfuerzo de corte de  $275 \text{ s}^{-1}$ .

La caracterización bioquímica de las enzimas proteolíticas producidas en cultivos celulares de *J. mexicana* y recuperadas del medio de cultivo mostro lo siguiente:

El pH y temperatura óptimos de actividad proteolítica sobre caseína fueron de 7.5 y 40 °C respectivamente.

El pH y temperatura óptimos de actividad enzimática sobre BAPNA fueron de 6.0 y 40 °C respectivamente.

El PM estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida de la proteasa(s) fue de aprox 24 kDa similar al de proteasas mexicana y quimomexicana purificadas del látex del fruto de *J. mexicana*

## 7. PERSPECTIVAS

Optimizar la producción de biomasa y de enzimas proteolíticas en el biorreactor de 6 L, mediante la modificación de parámetros hidrodinámicos en el biorreactor de 6 L.

Diseñar un sistema de recuperación de las enzimas proteolíticas acoplado al biorreactor de producción.

Investigar la inmovilización celular con alginato de sodio como soporte, con el objetivo de incrementar la producción de enzimas proteolíticas en biorreactor.

Diseñar un sistema de recuperación más eficiente de las enzimas proteolíticas producidas *in vitro*.

Recuperación de las enzimas proteolíticas intracelulares.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

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

Barrera, M. I. C. (2007). Cultivo de células de *Jacaratia mexicana* en un biorreactor *airlift*. efecto de un inductor y un elicitor en la producción de enzimas proteolíticas. Tesis de maestría. UPIBI-IPN. México.

Barrera, B. G. y Oliver S. M. C. (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.

Barret, A. J., Rawlings, N. D. y Woessner, F. (1994). Handbook of Proteolytic Enzymes. Ed. Academic Press.

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

Briones M. R., Cruz y Victoria M. T., Cortés V. M. I. y Oliver S. M. C. (1994). Preparaciones Enzimáticas de Interés Industrial. Información Tecnológica (Chile), 5(1), 57-62.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry, 72:248-254.

Calva, C. G., Esparza G. F., Pérez V. J., Martínez J. V. M., Silva C. S., López S. C. (2002) Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos. Avance y perspectiva. 21: 27-29.

Castañeda, A. M. (1942) 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. ENCBIPN. México.

Dixon R. A. y Gonzales R. A. (1994) "Plant Cell Culture". Oxford University Press. New York. 230 p.

Garcia-Ochoa, F., Gómez E., Santos V. E., Merchuk J. C. (2010) Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*. 49:289-307.

Gomes R., Mello J., Rodríguez, L., Bemquerer, P., Lopes P., Faça, M., Salas, E. (2005). Isolation of two plant proteinases of latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. *Planta Medica* 71: 244-248.

Hurtado V., D. y Merino M., M. E. (1987). Cultivo de tejidos vegetales. México. Primera edición. Ed. Trillas, pp. 15-30, 122-130.

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

Lee, J. M. (1992). *Biochemical Engineering*. First edition. Prentice Hall Inc., pp. 146-148, 170-174.

MacDonald, A. K., Jackman P. A., Thorup E. J., Dandekar M. A. (1995). Plant callus as a source of biochemicals. *Applied biochemistry and biotechnology*. 54:93

Liu, S. Zhong J. (1998). Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. *Process. Biochemistry*, 33:69-74.

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

Mello, V., Gomes, M., Lemos, F., Delfino, J., Andrade, S., Lopes, M., Salas, C. (2007). The gastric ulcer protective and healing role os cysteine porteases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*. Disponible en: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).

Montaño, H. L. (2007). Producción de enzimas proteolíticas y compuestos antioxidantes en cultivos celulares de *Jacaratiá mexicana* con un inductor. Reporte de proyecto Terminal. UPIBI-IPN. México.



Morales, L. E. (2008). Cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en tres tipos de biorreactores para la producción de enzimas proteolíticas. Tesis de maestría. UPIBI-IPN. México.

Mulabagal, V., Chen-Yue, L., Shu-Fun, L., Satish, M. N., Chien, Y. L. & Hsin-Shen, T. (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures (review paper). Botanical bulletin of academia Sinica. Vol. 45: 1-22.

Muruganantham, M., Amutha S., Ganapathi A. (2010) Somatic embryo productions by liquid shake culture of embryogenic calluses in *Vigna mungo* (L.) Hepper. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 46:34-40.

Nielsen, J. & Villadsen, J. (1994). Bioreaction Engineering Principles. Ed. Plenum Press, p. 456

Ochieng, A., Onyango, M.S., Kumar, A., Kiriamiti, K. y Musonge, P. (2007). Mixing in a tank stirred by a Rushton turbina at a low clearance. Chemical Engineering and Processing. Disponible en: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).

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

Oliver S. M. C., Badillo C. J. A., Cruz M. A., Garibay O. C. (2002). Enzimas Proteolíticas de Cultivo de Callos de *Jacaratia mexicana*. III Encuentro Internacional de Biotecnología UPIBI 2002, del 6-9 de nov. Querétaro, Qro. Pp. 118-121 de las Memorias del evento.

Oliver, S. M. C., Barrera B. G., Martínez G. J.B., Briones M. R. Cortes V. 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.

Ortega, M. L. Y del Castillo, L. M. (1966). Actividad de la mexicaína en presencia de altas concentraciones de urea. Ciencia Méx. 24: 247-251.

Ozyigit, I. I., Gozukirmizi N. Semiz B. D. (2006). Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryos of Sunflower. Russian Journal of Plant Physiology, Vol. 53, 4:556-559.

Pérez, A. Nápoles L. Carvajal C. Hernández M. Lorenzo J. C. (2004). Effect of sucrose, inorganics salts, inositol, and thiamine on protease excretion during pineapple culture in

temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 40:311-316.

Pérez, M. E. M., Ramírez, M. R., Núñez, P. H. G., Ochoa, A. N. (1999). *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Rodríguez M. M. y Galindo, E., (1999). Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspensión culture; a comparative study between cultures growth in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme Microbiology Technology* 24: 687-693

Romero C. J., Oliver M. C. Cruz M. T., Castañeda A. M. y Del Castillo L. M. (1976). Proteinasas de plantas mexicanas VI. Efecto del pH, la temperatura y reductores en la estabilidad de la mexicaína. *Revista Latinoamericana. Química*. 7: 137-141.

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

Sánchez, P. J. A., Rodríguez, P. E. M., Casas, L. J. L., Fernández, S. J. M., Chisti, Y. (2006). Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chemical Engineering Journal*. 124:1-5.

Smith, S. M. y H. E. Street (2002). The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Annals of Botany*. 38:223-241.

Shagger., H. Von. J. G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166:368-379.

Shih, C. Y. Kao C.H. (1996). Growth inhibition in suspension cultured rice cells under phosphate deprivation is mediated through putrescine accumulation. *Plant Physiology*. 111:721-724.

Shuler, M. L. y Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering, Basic Concepts*. Second Edition, Prentice Hall, USA. pp. 405-413.

Trejo-Tapia, G., Cerda, C. M., Rodríguez-Monroy, M. y Ramos-Valdivia, A. C. (2005). Monoterpenoid oxindole production by *Uncaria tomentosa* (willd) D. C. cell suspension cultures in a stirred tank bioreactor. *Biotechnology Progress*. 21:786-792.

Villalobos, V. M. (1990). Historia del cultivo de tejidos vegetales. En: Fundamentos Teórico Práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales. FAO. pp. 3-7.

Van Handel. (1968). Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry*. 22:280-283

Van't Riet, K. y Tramper, J. (1991). *Basic bioreactor design*. First edition. Marcel Dekker, Inc., pp. 114, 196-204.

Whitaker, J. R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. Second edition. Marcel Dekker, Inc.

Zhang, Y. Zhong J. (1997). Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Enzyme Microbiology Technology*. 21:59-63.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1. Resultados de la tasa de crecimiento para los otros experimentos realizados en el cultivo de callos de *J. mexicana*

**Cuadro 15.** Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en la tasa de crecimiento de callos de *J. mexicana*

Medio de cultivo	*Tasa de crecimiento	**Tasa de crecimiento
MS - B5	6.2	17.4
MS - MS	5.8	17.6
MS -B5 + P	8.4	28.1
MS - MS + P	6.0	22.7
MS 1/2 - B5	4.4	17.7
MS 1/2 - MS	4.9	14.1
MS 1/2 -B5 + P	8.3	18.2
MS 1/2 - MS + P	7.1	18.8

Resultados del experimento uno, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Ocho semanas de cultivo,  $\sigma \leq 5\%$

**Cuadro 16.** Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en la tasa de crecimiento de callos de *J. mexicana*

Medio de cultivo	*Tasa de crecimiento	**Tasa de crecimiento
MS - B5	3.3	7.4
MS - MS	3.1	6.6
MS -B5 + P	7.1	18.3
MS - MS + P	6.9	13.0
MS 1/2 - B5	3.3	9.0
MS 1/2 - MS	3.3	8.3
MS 1/2 -B5 + P	4.4	8.3
MS 1/2 - MS + P	4.5	9.2

Resultados del experimento tres, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Ocho semanas de cultivo,  $\sigma \leq 5\%$

**Resultados de la actividad proteolítica para los otros experimentos  
realizados en el cultivo de callos de *J. mexicana***

**Cuadro 17.** Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica de las enzimas de *J. mexicana* liberadas al medio de cultivo

<b>Medio de cultivo</b>	<b>*Actividad proteolítica (UT/L)</b>	<b>**Actividad proteolítica (UT/L)</b>
<b>MS - B5</b>	10,871.14	42,176.61
<b>MS - MS</b>	20,328.82	46,528.01
<b>MS -B5 + P</b>	43,705.85	61,377.46
<b>MS - MS + P</b>	28,920.42	59,607.70
<b>MS 1/2 - B5</b>	16,611.42	48,627.04
<b>MS 1/2 - MS</b>	6,738.51	46,631.92
<b>MS 1/2 -B5 + P</b>	25,617.47	54,819.55
<b>MS 1/2 - MS + P</b>	29,098.36	56,723.61

Resultados del experimento uno, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Ocho semanas de cultivo,  $\sigma \leq 5\%$

**Cuadro 18.** Efecto de la composición del medio MS en la actividad proteolítica de las enzimas de *J. mexicana* liberadas al medio de cultivo

<b>Medio de cultivo</b>	<b>*Actividad proteolítica (UT/L)</b>	<b>**Actividad proteolítica (UT/L)</b>
<b>MS - B5</b>	14,143.17	25,651.76
<b>MS - MS</b>	14,605.19	24,405.46
<b>MS -B5 + P</b>	20,300.22	42,872.10
<b>MS - MS + P</b>	16,473.23	34,956.54
<b>MS 1/2 - B5</b>	13,181.08	25,030.25
<b>MS 1/2 - MS</b>	11,920.32	27,110.37
<b>MS 1/2 -B5 + P</b>	14,802.27	28,231.36
<b>MS 1/2 - MS + P</b>	11,709.08	28,954.04

Resultados del experimento tres, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Ocho semanas de cultivo,  $\sigma \leq 5\%$

**Resultados de biomasa para los otros experimentos realizados  
en el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana***

**Cuadro 19.** Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana*

<b>Medio de cultivo</b>	<b>*Biomasa (g/L)<sub>PS</sub></b>	<b>**Biomasa (g/L)<sub>PS</sub></b>
MS - B5	2.5	4.0
MS - MS	2.0	4.2
MS - B5 + P	2.9	7.0
MS - MS + P	3.0	5.8
MS 1/2 - B5	2.6	3.6
MS 1/2 - MS	2.2	3.7
MS 1/2 - B5 + P	2.6	4.4
MS 1/2 - MS + P	2.7	4.6

Resultados del experimento uno, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Siete semanas de cultivo, PS: Peso seco,  $\sigma \leq 5\%$

**Cuadro 20.** Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana*

<b>Medio de cultivo</b>	<b>*Biomasa (g/L)<sub>PS</sub></b>	<b>**Biomasa (g/L)<sub>PS</sub></b>
MS - B5	1.9	1.7
MS - MS	1.0	2.7
MS - B5 + P	5.1	7.4
MS - MS + P	3.7	6.1
MS 1/2 - B5	0.6	4.3
MS 1/2 - MS	1.2	1.4
MS 1/2 - B5 + P	3.0	5.1
MS 1/2 - MS + P	3.0	4.7

Resultados del experimento tres, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Siete semanas de cultivo, PS: Peso seco,  $\sigma \leq 5\%$

**Resultados de actividad proteolítica para los otros experimentos  
realizados en el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana***

**Cuadro 21.** Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana*

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Actividad proteolítica(UT/L)</b>	<b>Actividad proteolítica(UT/L)</b>
MS - B5	49,844.04	111,899.61
MS - MS	104,920.91	206,533.41
MS - B5 + P	134,872.00	283,186.79
MS - MS + P	120,038.66	278,928.27
MS 1/2 - B5	41,327.00	105,275.25
MS 1/2 - MS	46,721.12	88,714.33
MS 1/2 - B5 + P	128,484.73	207,952.92
MS 1/2 - MS + P	126,994.24	199,435.88

Resultados del experimento uno, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Siete semanas de cultivo, PS: Peso seco,  $\sigma \leq 5\%$

**Cuadro 22.** Efecto de las diferentes formulaciones del medio MS en el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana*

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Actividad proteolítica(UT/L)</b>	<b>Actividad proteolítica(UT/L)</b>
MS - B5	85,933.42	142,748.91
MS - MS	26,080.60	123,651.05
MS - B5 + P	178,593.40	335,897.72
MS - MS + P	161,296.01	313,761.56
MS 1/2 - B5	81,303.63	129,293.60
MS 1/2 - MS	60,340.99	150,561.67
MS 1/2 - B5 + P	118,213.30	245,616.93
MS 1/2 - MS + P	137,761.28	252,561.60

Resultados del experimento tres, \* Tres semanas de cultivo, \*\* Siete semanas de cultivo, PS: Peso seco,  $\sigma \leq 5\%$

## ANEXO 2. Composición de medios de cultivos

### Medio Knop

Reactivo	g/L
Mg SO <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
CaNO <sub>3</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.8
Agar	5.0
pH	5.5

### Composición del medio Murashige & Skoog (MS)

<i>Macronutrientes</i>		<sup>++</sup> <i>Micronutrientes</i>	
Reactivos	(mg/L)	Reactivos	(mg/L)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	KI	0.83
KNO <sub>3</sub>	1900	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	440	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3
MgSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	370	ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	8.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	NaMoO <sub>5</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	85	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

## ANEXO 2. Preparación de reactivos

### Solución de Azul de Tripano

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

### Reactivo de Antrona

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

Se disolvió la antrona en ácido sulfúrico diluido (70 mL de ácido sulfúrico y 36 mL de agua).



### Reactivo de Bradford

Azul brillante de Coomassie G-250.....	100 mg
Etanol al 95%.....	50 mL
Ácido fosfórico al 85% (p/v).....	100 mL

Los 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 se disolvieron en 50mL de etanol al 95%. A esta solución se le añadirán 100 mL de ácido fosfórico al 85% (w/v). La solución resultante se aforara a un volumen final de 1 L. Las concentraciones finales en el reactivo son 0.01% (p/v) del colorante, 4.7% (p/v) de etanol y 8.5% (p/v) de ácido fosfórico.

### Albúmina bovina (200 µg/mL)

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

### ANEXO 3. Curvas tipo

#### Curva tipo para la determinación de actividad enzimática por el método de Ortega y Del Castillo

A partir de una solución 500 M de tirosina (la solución contiene 2 partes de regulador de fosfatos pH 7.6 y 3 partes de ATC 5%). Se hará 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, adicionando la mezcla de regulador-ATC para llevar a un volumen final de 3.0 mL, y se efectuará la lectura de absorbancia a 280 nm. Se elaborara la curva por triplicado.

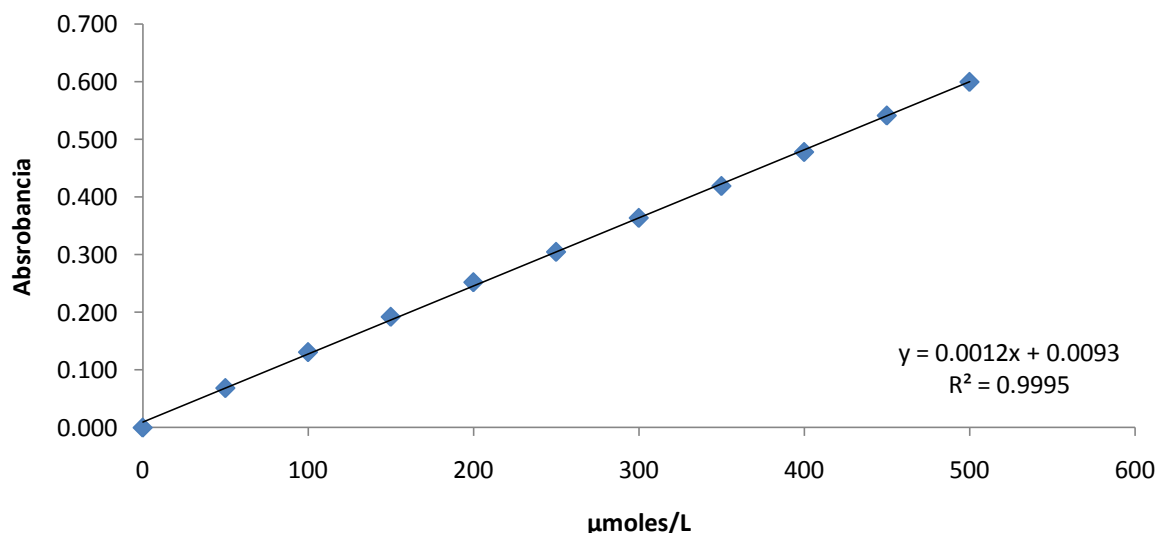


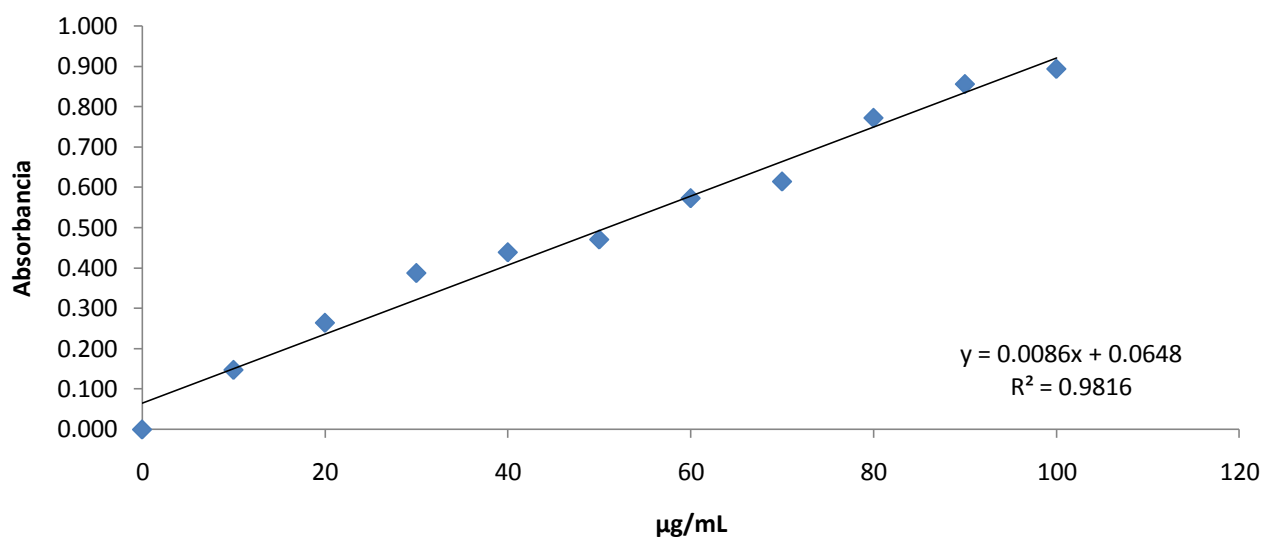
Figura 6. Curva tipo tirosina por el método de Ortega y Del Castillo

### 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 23.** 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	10	20	30	40	50



**Figura 7.** Curva tipo de proteína por el método de Bradford

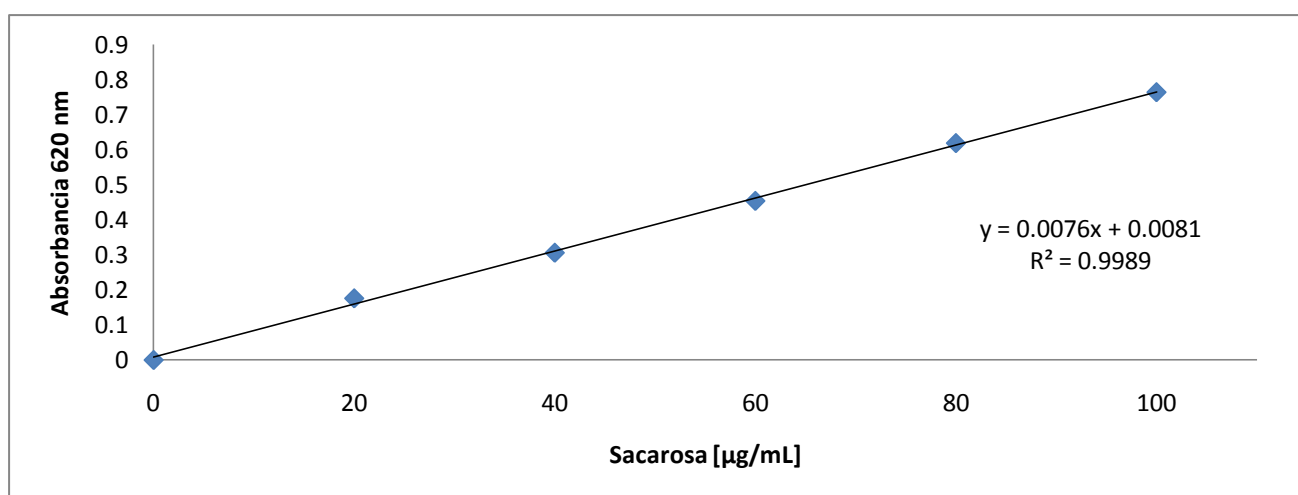
### Curva tipo para la determinación de sacarosa por el método de la antrona

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

**Cuadro 24.** 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				

Se realizara la curva tipo usando cada una de las diluciones indicadas en el cuadro ¿??? por triplicado. Se agregara KOH e incubar durante de 10 minutos a ebullición. Se dejara enfriar a temperatura ambiente y se adicionara el reactivo de la antrona, incubar a 40° C durante 10 minutos. Se dejara enfriar a temperatura ambiente y se leerá la absorbancia a 620 nm. Se calcular la ecuación de la recta.



**Figura 8.** Curva tipo sacarosa por el método de Van Handel