



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**CULTIVOS CELULARES DE *Jacaratia mexicana* EN
TRES TIPOS DE BIORREACTORES PARA LA
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOPROCESOS

PRESENTA:

IBQ. ELISA MORALES LÓPEZ

DIRECTORES:

DRA. MARÍA DEL CARMEN OLIVER SALVADOR

DR. SERGIO GARCÍA SALAS

México, D.F., Abril de 2008



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 16 del mes Abril del año 2008, el (la) que suscribe Elisa Morales López alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A060427, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Oliver Salvador y el Dr. Sergio García Salas y cede los derechos del trabajo intitulado “Cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en tres tipos de biorreactores para la producción de enzimas proteolíticas”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ml_elisa@yahoo.com.mx, oliveripn@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Elisa Morales López

Nombre y firma

Agradecimientos

A Alejandro por su comprensión y apoyo incondicional.

A mi familia por su confianza, cariño y buenos consejos.

A la Dra. Ma. Del Carmen Oliver Salvador y al Dr. Sergio García Salas, por los conocimientos compartidos y el tiempo dedicado a este trabajo.

A Liliana y Gerardo por su ayuda y, principalmente, por su amistad.

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

Este trabajo se realizó con el apoyo del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI), proyectos registro SIP 20060333 y SIP 20070156.

Contenido

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Cultivo de células vegetales	3
1.1.1 Cultivo de callos	7
1.1.2 Cultivo de células en suspensión	8
1.2 Las enzimas y su importancia	9
1.2.1 Las enzimas proteolíticas.....	10
1.3 Enzimas proteolíticas de <i>Jacaratia mexicana</i>	12
1.4 Cultivo de células vegetales en biorreactor.....	13
1.4.1 Biorreactor <i>airlift</i>	15
1.4.2 Biorreactor de tanque agitado	16
1.4.3 Biorreactor de columna de burbujeo	18
2 ANTECEDENTES	20
3 JUSTIFICACIÓN	22
4 OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
5 METODOLOGÍA.....	24
5.1 Protocolo experimental.....	24
5.2 Descripción de los tres tipos de biorreactores utilizados: una columna de burbujeo, un <i>airlift</i> y dos de tanque agitado	26
5.3 Condiciones de operación para el cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en biorreactores	27
5.4 Evaluación del desempeño hidrodinámico de los biorreactores.....	28
5.4.1 Determinación del tiempo de mezclado por el método de adición de pulsos	28
5.4.2 Determinación de las velocidades de corte.....	28
5.5 Preparación de inóculos para el cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en biorreactores	30
5.5.1 Desinfección de semillas de <i>Jacaratia mexicana</i>	30
5.5.2 Germinación de semillas de <i>Jacaratia mexicana</i>	30
5.5.3 Obtención de callos de <i>Jacaratia mexicana</i>	30
5.5.4 Preparación de medios de cultivo en suspensión	31
5.5.5 Preparación del inóculo para el cultivo en biorreactores.....	31
5.6 Técnicas analíticas.....	31
5.6.1 Determinación de actividad proteolítica del cultivo de callos de <i>Jacaratia mexicana</i> en medio semisólido	31
5.6.2 Determinación de actividad proteolítica del cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i> en medio en suspensión	32
5.6.3 Determinación de biomasa en los cultivos celulares de <i>Jacaratia mexicana</i> en suspensión	32

5.6.4	Determinación de viabilidad celular de los cultivos celulares de <i>Jacaratia mexicana</i>	33
5.6.5	Determinación de morfología celular.....	33
5.6.6	Determinación del consumo de sacarosa en los medios en suspensión .	33
5.6.7	Determinación de proteína en los medios en suspensión	34
5.6.8	Determinación de viscosidad en los medios en suspensión	34
5.6.9	Recuperación de las proteasas de los medios de cultivo celular de <i>Jacaratia mexicana</i>	35
5.6.10	Purificación por cromatografía de intercambio catiónico	36
5.6.11	Electroforesis en gel de poliacrilamida	36
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
6.1	Evaluación del desempeño hidrodinámico de los biorreactores.....	37
6.1.1	Biorreactor de columna de burbujeo	37
6.1.2	Biorreactor <i>airlift</i>	37
6.1.3	Biorreactor de tanque agitado	38
6.1.4	Viscosidad.....	39
6.2	Cultivos celulares de <i>Jacaratia mexicana</i> en biorreactores.....	40
6.2.1	Viabilidad celular y velocidad de corte	41
6.2.2	Morfología celular.....	43
6.2.3	Crecimiento celular y consumo de sacarosa.....	44
6.2.4	Actividad proteolítica y proteína	48
6.3	Recuperación y purificación de proteasas de cultivos celulares de <i>Jacaratia mexicana</i>	52
6.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida	53
7	CONCLUSIONES.....	55
8	PERSPECTIVAS	56
9	REFERENCIAS	57
10	ANEXOS.....	64

Índice de Figuras

Figura 1. Planta de <i>J. mexicana</i> con frutos.....	13
Figura 2. Representación esquemática del desarrollo experimental del trabajo de tesis	25
Figura 3. Biorreactor <i>airlift</i>	26
Figura 4. Tanque agitado magnéticamente	26
Figura 5. Tanque agitado mecánicamente	27
Figura 6. Biorreactor de columna de burbujeo.....	27
Figura 7. Tiempo de mezclado del biorreactor de columna de burbujeo	38
Figura 8. Tiempo de mezclado del biorreactor <i>airlift</i>	39
Figura 9. Tiempo de mezclado del biorreactor de tanque agitado	40
Figura 10. Fotografías de células de <i>J. mexicana</i> a los 28 días de cultivo.....	43
Figura 11. Crecimiento celular de <i>J. mexicana</i> en tanque agitado mecánicamente.	46
Figura 12. Consumo de sacarosa del cultivo celular de <i>J. mexicana</i> en tanque agitado mecánicamente.	47
Figura 13. Crecimiento celular de <i>J. mexicana</i> en tres tipos de biorreactores.....	48
Figura 14. Consumo de sacarosa de las células de <i>J. mexicana</i> en tres biorreactores	49
Figura 15. Actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo en tanque agitado mecánicamente	50
Figura 16. Proteína total determinada en el medio de cultivo en tanque agitado mecánicamente	50
Figura 17. Actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo en tres tipos de biorreactores.....	51
Figura 18. Proteína total determinada en el medio de cultivo en tres biorreactores	53
Figura 19. Perfil de elución de la cromatografía de intercambio catiónico.....	54
Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS.	55
Figura 21. Curva tipo de proteína por el método de Bradford.....	68
Figura 22. Curva tipo de tirosina.....	69
Figura 23. Curva tipo de sacarosa por el método de la antrona	70

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Productos de especies vegetales con aplicación industrial obtenidos por cultivos <i>in vitro</i>	4
Cuadro 2. Viabilidad celular, consumo de potencia, tiempos de mezclado y velocidades de corte determinadas durante el cultivo celular de <i>J. mexicana</i>	41
Cuadro 3. Factor elíptico promedio y relación de áreas promedio calculada para las células de <i>J. mexicana</i> en tres tipos de biorreactores	45
Cuadro 4. Elaboración de la curva tipo de proteína por el método de Bradford	68
Cuadro 5. Elaboración de la curva tipo de sacarosa por el método de la antrona.....	70

RESUMEN

La *Jacaratia mexicana* es una planta de la familia de las Caricáceas, la cual produce enzimas proteolíticas capaces de competir favorablemente en procesos industriales donde se utiliza la papaína. Además, estas proteínas presentan otras actividades como la acción mitogénica y angiogénica en mamíferos. Dada su importancia científica e industrial, es de interés la producción de dichas enzimas. Debido a que esta planta silvestre produce frutos sólo una temporada al año, una alternativa para disponer de una producción constante de estas enzimas es el cultivo de células en suspensión de *J. mexicana*.

En este trabajo se realizó el cultivo de células de *J. mexicana* en tres tipos de biorreactores de 0.5 L: *airlift*, columna de burbujeo y tanque agitado magnéticamente. Además se usó un tanque con agitación mecánica de 3.0 L. Se estudió el efecto del desempeño hidrodinámico de éstos en la producción de enzimas proteolíticas, en el crecimiento celular, consumo de sacarosa, viabilidad y la morfología celular de los cultivos de *J. mexicana*.

El crecimiento de biomasa de los cultivos celulares de *J. mexicana* fue 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 (1.2×10^4 UT/L), en cambio en el biorreactor de tanque agitado la actividad fue mayor (1.7×10^4 UT/L). La viabilidad de cultivos celulares de *J. mexicana* fue similar (aproximadamente 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 estuvieron en el intervalo de 13 a 400 s^{-1} ; estas velocidades 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 dentro de las condiciones estudiadas.

ABSTRACT

Jacaratia mexicana belongs to the family *Caricaceae*, which produces proteolytic enzymes capable to compete with papain in industrial processes. In addition, these proteases have another properties such as mitogenic and angiogenic activities in mammals. Because of its scientific and industrial importance, the production of such enzymes is important. This wild plant produces fruits only one season a year, therefore an alternative to have a constant production of these enzymes is the cell suspension culture of *J. mexicana*.

In this work the cell culture of *J. mexicana* was carried out in three types of bioreactors of 0.5 L: airlift, bubble column and magnetically stirred tank. Besides, it was used a 3.0 L stirred tank with mechanical agitation. The effect of their hydrodynamic behavior on the production of proteolytic enzymes, cell growth, sucrose consumption and cell morphology of *J. mexicana* cell cultures was studied.

The biomass production was similar (17%) in airlift and bubble column bioreactors, whereas it increased (21%) in the mechanically stirred tank. The proteolytic activity obtained in airlift and bubble column bioreactors was in the same order (1.2×10^4 UT/L) and it was higher in the mechanically stirred tank (1.7×10^4 UT/L) and the viability of the *J. mexicana* cell cultures was similar (about 84%) in the three types of bioreactor under hydrodynamic conditions studied. The shear rates generated under the operation conditions of the three bioreactors were in the range of 13 to 400 s^{-1} . Proteases production, cell viability and cell morphology were not affected by this range of shear rates. These experimental evidences suggest that cells of *J. mexicana* are resistant to the hydrodynamic stress generated under the conditions studied.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Cultivo de células vegetales

A lo largo del tiempo las plantas han sido de gran importancia, debido a que representan una fuente de alimentos y de compuestos medicinales. Las plantas son todavía la fuente principal de una gran cantidad de compuestos químicos, incluyendo fármacos, insecticidas, saborizantes, colorantes, fragancias y proteínas. La mayoría de estos compuestos se obtienen de plantas cultivadas en grandes extensiones de terreno, aunque el cultivo de células vegetales es considerado como una alternativa para la producción de dichos compuestos (Dixon y Gonzales, 1994; Kieran *et al.*, 1997).

Los antecedentes del cultivo de tejidos vegetales se remontan a los años 1838 y 1839, en que los biólogos alemanes Schleiden y Schwann sugirieron el concepto de totipotencialidad de las células, según el cuál cada célula es una unidad independiente capaz de formar un organismo completo si se le pone en condiciones favorables (Smith y Street, 1992). 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.

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 (Pierik, 1990). 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*) (Villalobos, 1990)

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permite el cultivo *in vitro* de cualquier parte de una planta (tallo, hoja, raíz, meristemo) desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones asépticas y controladas. Los cinco tipos de cultivos de tejidos vegetales más importantes son: cultivo de la planta completa, cultivo de embriones, cultivo de órganos, cultivo de callos y cultivo de células en suspensión (células aisladas o pequeños agregados).

El cultivo de células vegetales fue desarrollado como una herramienta útil para estudiar el metabolismo, la fisiología y el desarrollo de las plantas. Sin embargo, también es una fuente de productos naturales tales como fragancias, saborizantes y enzimas, así como de productos químicos (Cuadro 1). Algunos de estos compuestos presentan una gran complejidad química, lo cual hace que su producción por síntesis química sea incosteable. Cada año se agregan aproximadamente 1600 compuestos químicos nuevos a los más de 20000 compuestos químicos diferentes que son producidos por plantas (Sajc *et al.*, 2000).

De acuerdo a un reporte de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, por sus siglas en inglés), las ventas de fármacos y compuestos intermediarios derivados de plantas representan aproximadamente 9-11 mil millones de dólares anuales, tan sólo en Estados Unidos (Sajc *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Productos de especies vegetales con aplicación industrial obtenidos por cultivos *in vitro*.

Industria	Producto	Planta	Aplicación
Química	Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Síntesis de anticonceptivos
	Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> <i>Solanum chrysotrichum</i>	Precursor de antraquinonas
	Solasodina		Síntesis de esteroides
Farmacéutica	Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
	Quinina	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Antimalárico
	Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico

	Escopolamina	<i>Datura stramonium</i>	Antihipertensivo
	Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	Anticancerígeno
	Trigonelina	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Anticancerígeno
	Taxol	<i>Taxos cudpidata</i>	Anticancerígeno
Alimentaria	Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Pigmento
	Ginsenósido	<i>Panax ginseng</i>	Saborizante
	Capsaicina	<i>Capsicum</i> sp.	Saborizante
Agrícola	Capsaicina	<i>Capsicum</i> sp.	Insecticida

Fuente: Calva-Calva *et al.* (2002)

Las ventajas que presenta el cultivo de células vegetales con respecto al cultivo tradicional de la planta completa son (Topete *et al.*, 1991):

- 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.

Debido a lo anterior, el cultivo de estas células representa una alternativa biotecnológica para la producción *in vitro* de metabolitos primarios y secundarios.

En el cultivo de células vegetales son fundamentales los reguladores del crecimiento vegetal (RCV), los cuales son compuestos orgánicos, distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico en las plantas.

Se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos reguladores del crecimiento vegetal, divididos en tres grupos principales (Hurtado y Merino, 1987):

- a) Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas.
- b) Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- c) Promotor de la maduración de los frutos y senescencia de las hojas: etileno.

Existen otros compuestos que regulan el crecimiento vegetal, tales como las poliaminas, las cuales están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos que van desde el crecimiento y desarrollo vegetal hasta la protección contra el estrés biótico y abiótico (Faust y Wang, 1992; Bais y Ravishankar, 2002). Las principales poliaminas son putrescina, espermidina y espermina (Evans y Malmberg, 1989)

Los RCV más utilizados en los cultivos *in vitro* son las auxinas y las citocininas, pues son los que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo organizado en los cultivos de tejidos vegetales.

Las auxinas (del griego *auxein*, crecer) son un grupo de compuestos, derivados del triptófano, que controlan el crecimiento de las plantas. Se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo, aunque las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas. Afectan el crecimiento del tallo, las hojas y las raíces, así como el desarrollo de ramas laterales y frutos. Las auxinas influyen en el crecimiento de estos órganos vegetales estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución (Palme y Galweiler, 1999).

Las citocininas son purinas sustituidas; son derivados de la adenina con un sustituyente, el cual puede ser isoprenoide (citocininas isoprenoidicas) o aromático (citocininas aromáticas), en el nitrógeno amínico de la posición 6. Las citocininas se sintetizan en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en los frutos. En las plantas, promueven el crecimiento debido a que estimulan la división celular, lo cual las hacen muy útiles para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Sylvester, 2000).

La mayoría de las auxinas y citocininas que se usan con más frecuencia en el cultivo de células vegetales son sintéticas. Los inhibidores de crecimiento y el etileno son poco utilizados en el cultivo de tejidos vegetales. Las giberelinas se emplean en algunas especies para obtener plantas libres de virus, sin embargo su adición en el medio de cultivo no es crítica (Dixon y Gonzales, 1994).

1.2 Cultivo de callos

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 cultivo de callos se utiliza en la investigación en fisiología vegetal, organogénesis, embriogénesis, genética, fitotoxicología y propagación de plantas, aunque se le da énfasis al área de síntesis y extracción de productos naturales, como fármacos y enzimas (Hurtado y Merino, 1987).

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

- a) Inducción. Las células del inóculo inicial comienzan su crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- b) Proliferación celular. El tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.

- c) Inducción de la diferenciación. Se obtienen meristemos, embrioides, tejido vascular, etc., a partir de la masa celular del callo.
- d) 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).

1.3 Cultivo de células en suspensión

El cultivo de células en suspensión consiste en un conjunto de células aisladas, así como pequeños racimos celulares distribuidos en un medio de cultivo líquido en movimiento constante.

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.

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión puede lograrse directamente a partir de un inóculo, o bien transfiriendo un fragmento de callo al medio líquido, el cual se mantiene en agitación durante el periodo de cultivo.

Después de la inoculación del tejido calloso en el medio líquido agitado, se inicia un período de fragmentación en pequeños agregados que producen células libres y nuevos grupos de células. El crecimiento del cultivo suele presentar un comportamiento sigmoideo, mostrando las fases características del crecimiento de microorganismos.

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión a partir de un fragmento de callo es más rápido, aunque depende de la friabilidad del tejido calloso, es decir de la capacidad de las células para disgregarse fácilmente después de una división celular (Hurtado y Merino, 1987).

1.4 Las enzimas y su importancia

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos. Las enzimas son catalizadores, es decir, sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad, disminuyendo la energía de activación. Ello hace posible que en condiciones fisiológicas tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH.

El uso industrial de las enzimas se conoce como tecnología enzimática. El principio de la tecnología enzimática se remonta a 1874, con la obtención, mediante extracción con soluciones salinas, de la enzima quimosina a partir de estómagos de terneros. En los años 1960s y 1970s proliferó el uso de las enzimas inmovilizadas. En la década de 1970s se empezaron a utilizar las enzimas a gran escala para la producción de aminoácidos y azúcares usando glucosa isomerasa (García-Garibay *et al.*, 1993).

Hasta 1996, el mercado mundial de las enzimas industriales tenía un valor estimado de 1300 millones de dólares anuales, el cual continuará incrementándose. Aproximadamente el 62% de las enzimas producidas se usan en aplicaciones comerciales, 33% en detergentes y 5% en textiles y curtidos. De esta producción total, un 80% son enzimas hidrolíticas y se utilizan para despolimerizar lípidos, proteínas y almidones. De éstas, se estima que el 60% son proteinasas, 30% amilasas, y 3% lipasas; el resto son enzimas para usos especiales (Briones, 1996).

1.4.1 Las enzimas proteolíticas

En la industria alimentaria la principal aplicación de las enzimas es para el procesamiento del almidón, seguida por la producción de quesos, el procesamiento de jugos obtenidos de frutas y vegetales, producción de jarabes de fructosa, el horneado y en la cervecería. En particular, las proteasas constituyen uno de los grupos más importantes de las enzimas industriales y representan aproximadamente el 25% de las ventas totales de enzimas. En 1998 las proteasas representaban el 60% del mercado mundial, con aproximadamente de 1500 millones de dólares (Haard, 1998).

Las proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. 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, con base en ésta, la relación evolutiva entre ellas.

En relación a la naturaleza del sitio catalítico se encuentran los seis grupos siguientes (Barret, 1994):

- Proteasas serínicas: tienen un residuo de serina en el sitio activo. Algunos ejemplos de este grupo son la tripsina, quimotripsina y elastasa alcalina.
- Proteasas cisteínicas: tienen un residuo de cisteína en el sitio activo. Ejemplos: papaína, ficina, mexicaína.
- 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.
- Proteasas aspárticas: Presentan dos residuos de ácido aspártico en el sitio activo y presentan su máxima actividad catalítica a pH ácido. Ejemplo: quimosina, pepsina.

- 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. Ejemplo: termolisina, colagenasa, carboxipeptidasas.
- Proteasas no clasificadas.

Las proteasas cisteínicas se clasifican en base a sus secuencias y/o estructura terciaria, agrupándose en superfamilias o clanes. Las familias de la papaína (C1), calpaína (C2) y estreptopapaína (C10) se encuentran estrechamente relacionadas evolutivamente y son comúnmente descritas como proteasas similares a la papaína o Clan CA (Barret y Rawlings, 1996, Barret *et al.*, 1998).

La familia de la papaína (C1) es la mejor estudiada, y las enzimas de esta familia se encuentran distribuidas en una amplia variedad de formas de vida, tales como baculovirus, eubacterias, levaduras, probablemente todos los protozoarios, plantas y mamíferos (Barret y Rawlings, 1996; Barret *et al.*, 1998).

Muchas proteasas obtenidas de las plantas han sido aisladas de sus látex, frutos y semillas, y la mayoría de ellas pertenecen a las proteasas cisteínicas (Boller, 1986). En este grupo de proteasas encontramos a la papaína, ficina, bromelaína, mexicaína, etcétera (Cruz y Victoria, 1993; Whitaker, 1994; Sheokand *et al.*, 2005).

Las proteasas cisteínicas participan en etapas del desarrollo de la planta tales como germinación, morfogénesis, senescencia y muerte celular programada (Solomon *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2002). Además, están involucradas en la degradación de las proteínas en respuesta a diferentes estímulos externos y tienen la función de remover proteínas anormales y mal plegadas. En ambos casos, la proteólisis realizada por estas enzimas es un proceso altamente regulado (Wisniewski y Zagdanska, 2001). Así mismo, las proteasas cisteínicas están involucradas en la respuesta de la planta al estrés biótico y abiótico (Grudkowska y Zagdanska, 2004).

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 papaina tiene un efecto protector sobre las úlceras gástricas en ratas (Mello *et al.*, 2007). Así mismo, se comprobó que las proteasas de *C. candamarcensis* tienen también potencial angiogénico, es decir, intervienen en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes (Mello *et al.*, 2007).

Las proteasas de origen vegetal son utilizadas en diversos procesos industriales: en la fabricación de cerveza, la elaboración de ablandadores de carne, en la producción de hidrolizados de proteínas, en la formulación de productos farmacéuticos, etc. En la modificación de proteínas donde el control del tamaño de los péptidos es esencial para obtener cambios reproducibles en las propiedades funcionales. Este control puede lograrse mediante el uso de proteasas específicas y selectivas (Briones, 1996).

1.5 Enzimas proteolíticas de *Jacaratia mexicana*

La *Jacaratia mexicana* A. DC., antes denominada *Pileus mexicanus*, es una planta que pertenece a la familia de las Caricáceas, la cual se caracteriza por producir grandes cantidades de proteasas. Esta planta silvestre crece en las regiones subtropicales de la República Mexicana (Morelos, Puebla, Guerrero, Campeche y Yucatán), llegando a medir hasta 15 metros; recibe los nombres comunes de bonete, cuaguayote, papaya orejona y papayón (Figura 1).



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

Esta planta mexicana produce frutos, de los cuales fue aislada la proteasa “mexicana” en 1942 por Castañeda-Agulló *et al.* Esta enzima fue caracterizada como una proteasa cisteínica, monomérica de gran estabilidad al pH y a la temperatura (Romero-Castilla *et al.*, 1976), con mayor actividad proteolítica específica que la papaína, y se ha demostrado que puede competir favorablemente en los procesos donde se utiliza dicha proteasa (Briones *et al.*, 1994).

Por mucho tiempo se pensó que la mexicana era una sola enzima, sin embargo, en estudios bioquímicos se ha demostrado la existencia de cinco proteasas presentes en el látex. De acuerdo con el orden de elución de las proteasas del extracto del látex en la cromatografía de intercambio iónico fuerte, se les nombró proteasas P-I, P-II, P-III, P-IV y P-V, siendo esta última la que presenta mayor actividad específica. A la proteasa P-IV por ser la más abundante se le denominó mexicana (Oliver, 1999).

1.6 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-Tapia *et al.*, 2005). En los últimos 30 años se han evaluado diferentes configuraciones de biorreactores para el cultivo de células vegetales (Rodríguez-Monroy 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-Tapia *et al.*, 2005, Rodríguez-Monroy y Galindo, 2003). 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-Pérez *et al.*, 2006).

A continuación se presentan las descripciones de varios biorreactores, su funcionamiento y algunas aplicaciones que han tenido en el cultivo de células vegetales.

1.6.1 Biorreactor *airlift*

El diseño básico de un biorreactor *airlift* consta de un recipiente cilíndrico que tiene generalmente una relación de altura a diámetro entre tres y diez, está equipado con un difusor de aire en el fondo y tiene partes que forman una zona de flujo ascendente y una zona de flujo descendente, conectadas en sus partes superior e inferior (Lee, 1992). En este tipo de biorreactor al introducir aire en el fondo de la zona de flujo ascendente, el líquido es arrastrado por el movimiento ascendente de aire. En la parte superior, el aire se separa del líquido que pasa a la zona de flujo descendente. En consecuencia, la densidad de la dispersión gas-líquido en la zona de flujo descendente es mayor que la densidad en la zona de flujo ascendente. Esta diferencia de densidades es la que ocasiona el movimiento circulatorio del líquido (Shuler y Kargi, 2002).

En el biorreactor *airlift*, dependiendo de la velocidad de flujo del gas, se pueden distinguir dos tipos de regímenes de flujo: homogéneo y heterogéneo. El flujo homogéneo se caracteriza por tener un tamaño casi uniforme de burbujas, además, la unión de burbujas para formar una más grande, que es el fenómeno conocido como coalescencia, prácticamente no se presenta y el perfil de la fracción de gas retenido es uniforme, especialmente en la dirección radial. Este flujo ocurre sólo a bajas velocidades superficiales del gas y cuando el difusor tiene orificios uniformemente distribuidos. En este caso todas las burbujas se elevan con la misma velocidad de

ascenso y el mezclado se origina del líquido arrastrado en la estela de cada burbuja. No se presentan flujos de líquido circulatorios y la fase gaseosa se puede considerar como de flujo pistón (Kulkarni *et al.*, 2007; van't Riet y Tramper, 1991).

El flujo heterogéneo es aquél que ocurre con un difusor de gas cuyos orificios no estén uniformemente distribuidos. Sin embargo, incluso habiendo una distribución uniforme, al aumentar la velocidad del gas, empieza a ocurrir una distribución desigual de las burbujas de manera aleatoria ocasionando flujos circulatorios de líquido (van't Riet y Tramper, 1991).

Entre los cultivos de células vegetales que se han llevado a cabo en este tipo de biorreactor se encuentran *Beta vulgaris* (Juárez-Sánchez *et al.*, 2002), *Mentha piperita* (Chung *et al.*, 1994) y *Picea sitchensis* (Ingram y Mavituna, 2000). En el cultivo en suspensión de *Taxus chinensis* en un biorreactor *airlift* fue reportada una velocidad de corte promedio de 7.05 s^{-1} , utilizando un biorreactor de 2.5 L y una velocidad superficial del gas de 0.47 cm/s (Pan *et al.*, 2000). Juárez-Sánchez *et al.* (2002) reportaron una velocidad de corte de 77 s^{-1} para el cultivo de *Beta vulgaris* en el mismo tipo de biorreactor.

1.6.2 Biorreactor de tanque agitado

Usualmente, son recipientes cilíndricos cuya relación de altura a diámetro es de uno a tres. 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, N_A). 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).

Los biorreactores de tanque agitado son ampliamente utilizados en la industria química, farmacéutica y de alimentos, así como en el tratamiento de aguas residuales (Ochieng *et al.*, 2007).

Los biorreactores agitados se han empleado en el cultivo de *Nicotiana tabacum* (Ho *et al.*, 1995), donde se encontró que el incremento de la velocidad del impulsor disminuyó el crecimiento de la biomasa, habiendo un mayor número de células rotas y residuos celulares en comparación con cultivos en matraz. En el cultivo de *Solanum chysotrichum* (Trejo-Tapia *et al.*, 2001) se reportó que el medio de cultivo se comportó como un fluido no newtoniano y que la forma de los agregados celulares cambió de elongada a redonda como función de la concentración de biomasa. En cuanto al cultivo de *Uncaria tomentosa* en tanque agitado, se encontró que la máxima concentración de biomasa, así como la viabilidad, fueron similares en el biorreactor y en matraz. Sin embargo, la producción de alcaloides fue mayor en el tanque agitado que en el matraz (Trejo-Tapia *et al.*, 2005).

En cuanto a las velocidades de corte que se presentan en los cultivos de células vegetales en este tipo de reactores, Pan *et al.* (2000) reportaron una velocidad de corte promedio de 55 s^{-1} al cultivar *Taxus chinensis* en un tanque agitado de 1.5 L, con una agitación de 300 rpm. En el cultivo de *Beta vulgaris* realizado en un tanque agitado de

2.0 L y una agitación de 400 rpm, se estimó una velocidad de corte promedio de 77 s^{-1} (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999). En el cultivo de *Catharantus roseus*, el valor promedio fue de 167 s^{-1} , utilizando un tanque agitado de 3 L y una agitación de 400 rpm (Scragg *et al.*, 1988).

1.6.3 Biorreactor de columna de burbujeo

En general, los biorreactores de columna de burbujeo son los biorreactores más simples con respecto a su configuración. El diseño básico consta de un recipiente cilíndrico con una relación altura a diámetro entre 3 y 10 y está equipado con un difusor de aire en el fondo. El líquido contenido en el biorreactor es mezclado debido al movimiento ascendente de las burbujas de aire, las cuales proporcionan también el oxígeno necesario para las células (Lee, 1992).

Los regímenes de operación en una columna de burbujeo son homogéneos, heterogéneos y de transición. Estos regímenes dependen de la velocidad superficial del gas, las propiedades fisicoquímicas del sistema gas-líquido, el diseño del difusor (principalmente el diámetro del orificio) y el diámetro de la columna (Wild *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2007).

Para los biorreactores de columna de burbujeo de diámetro pequeño y gran altura, se puede considerar que la fase gaseosa presenta un flujo tipo pistón. En contraste, las columnas de diámetro grande y no tan altas tienen una fase gaseosa que se considera como idealmente mezclada (van't Riet y Tramper, 1991).

Los biorreactores de columna de burbujeo tienen una amplia gama de aplicaciones en la industria química, petroquímica, bioquímica y en la remediación ambiental, siendo preferidos algunas veces sobre otro tipo de biorreactores debido a su simplicidad y bajo costo de operación, así como a la buena transferencia de masa y de calor que presentan.

La columna de burbujeo se usa preferentemente cuando las reacciones que se llevan a cabo son lentas y la resistencia al transporte de masa se localiza en la fase líquida, debido a la posibilidad de obtener un buen mezclado de la fase líquida (Wild *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2007).

Un ejemplo de células vegetales cultivadas en columna de burbujeo son *Cichorium intybus*, empleando un volumen de operación de 1.75 L y una velocidad de gas de 33.4 cm³/s, aunque en este trabajo no se reportó la velocidad de corte (Bais *et al.*, 2002).

2 ANTECEDENTES

Debido a la importancia industrial de las proteasas de *Jacaratia mexicana* y, por otra parte, debido a que es una planta silvestre, una fuente alterna de obtención de dichas enzimas es por medio del cultivo de células de *Jacaratia mexicana*.

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se estableció la formulación más adecuada del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) para la inducción de callos, usando 12 formulaciones de medios 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 (2,4-D), MS5 (2,4-D + cinetina) y MS9 (2,4-D + BAP) (Badillo *et al.*, 2002)

También fue demostrada la producción de enzimas proteolíticas en cultivo de callos y en células en suspensión de *Jacaratia mexicana*, observándose que las proteasas son liberadas al medio de cultivo y que la producción de estas enzimas está asociada al crecimiento celular del cultivo. (Badillo *et al.*, 2002; Barrera y Oliver, 2004; Oliver *et al.*, 2005). Las tres formulaciones corresponden a los medios denominados MS1 (2,4-D), MS5 (2,4-D + cinetina) y MS9 (2,4-D + BAP).

También se estudió el efecto de la concentración de la auxina 2,4-D usando tres formulaciones del medio MS completo y con 25% de sales, demostrándose que la concentración de la auxina 2,4-D, influye en la inducción y desarrollo de los callos (Martínez-Guillén, 2006).

El medio de cultivo que resultó ser el mejor para la producción de las proteasas fue el MS con 0.5 mg/L de bencilaminopurina (BAP) y de 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). Con los callos inducidos en el medio antes mencionado se estableció el cultivo de células de *J. mexicana* en suspensión a nivel matraz (Martínez-Guillén, 2006).

Por otro lado, se realizó un estudio en cultivos de células de *J. mexicana* en suspensión del efecto de la concentración de sacarosa, observándose la formulación más adecuada del medio de cultivo fue el MS completo en sales, con 0.5 mg/L de auxinas y 4% de sacarosa (Martínez-Guillén, 2006).

Además se ha estudiado el efecto de inductores y elicitores con el propósito de incrementar la producción de enzimas proteolíticas en cultivos celulares de *J. mexicana*. Resultados preliminares muestran que hay un incremento en la síntesis de proteasas con la adición de hidrolizado de caseína como inductor y de un extracto de *Aspergillus niger* como elicitor en dicho cultivo de células (Barrera-Martínez, 2007).

3 JUSTIFICACIÓN

El uso del cultivo de células vegetales para la producción de una gran variedad de metabolitos, ha tomado gran importancia debido a las ventajas que presentan sobre los cultivos tradicionales de las plantas completas.

La *J. mexicana* es una planta silvestre de la familia de las Caricáceas que produce enzimas proteolíticas capaces de competir en usos industriales con la papaína. Por otro lado, la industria alimentaria prefiere el uso de proteasas de origen vegetal debido a la regulación de la FDA, la cual las considera sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS) porque provienen de frutos comestibles. Además, estas proteinasas de Caricáceas presentan otras actividades como la acción mitogénica y la angiogénica en mamíferos. Sin embargo, esta planta silvestre da frutos sólo una temporada al año.

Una alternativa para disponer de una producción constante de estas enzimas es el cultivo de células en suspensión. Este cultivo puede llevarse a cabo en cualquier tipo de biorreactor, con tal de que los esfuerzos de corte prevalecientes en él no dañen a las células de tal forma que disminuyan o nulifiquen la producción de enzimas. Es por ello que la determinación del esfuerzo de corte, así como el impacto que tiene en la producción de biomasa y de enzimas proteolíticas, es de gran importancia para el diseño y operación de biorreactores empleados para el cultivo de células vegetales.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar el efecto del desempeño hidrodinámico de tres tipos de biorreactor en el crecimiento y en la producción de enzimas proteolíticas de cultivos celulares de *J. mexicana*.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener cultivo de callos para el cultivo celular de *J. mexicana* en suspensión en matraz.
- Evaluar el desempeño hidrodinámico de los tres tipos de biorreactores.
- Establecer cultivos celulares de *J. mexicana* en tres tipos de biorreactores: tanque agitado, columna de burbujeo y *airlift*.
- Determinar las cinéticas de los cultivos celulares de *J. mexicana*: determinación de actividad proteolítica, biomasa, viabilidad celular, proteína y consumo de sacarosa en los tres tipos de biorreactores.
- Comparar la morfología celular de los cultivos de *J. mexicana* en los tres tipos de biorreactores.
- Recuperar y purificar parcialmente las enzimas proteolíticas de los cultivos celulares de *J. mexicana*.

- ✦ Caracterizar bioquímicamente las enzimas proteolíticas de los cultivos celulares de *J. mexicana*.

5 METODOLOGÍA

5.1 Protocolo experimental

En la Figura 2 se presenta el diagrama de bloques del desarrollo experimental. Por un lado se llevó a cabo la caracterización hidrodinámica de los biorreactores utilizados para el cultivo de *J. mexicana*. Por otro lado para obtener el inóculo de los biorreactores se realizó el siguiente procedimiento.

A partir de semillas desinfectadas de *J. mexicana* se obtuvieron plántulas de aproximadamente 12 cm de altura. Cuando alcanzaron esta altura se hicieron cortes de los tallos de aproximadamente 1 cm, los cuales fueron colocados en frascos tipo gerber con medio MS (medio MS completo en sales con 2,4-D 2.26 μM , BAP 2.19 μM , 2% de sacarosa y 0.6 % de agar) para inducir callos. Los callos se sembraron en medio fresco tres veces, y después se utilizaron para obtener el cultivo en suspensión a nivel matraz (medio MS completo en sales con 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) 2.26 μM , BAP (6-bencilaminopurina) 2.19 μM , 4% de sacarosa y caseína al 0.005%). Dichos cultivos fueron los inóculos para los experimentos de los cultivos en biorreactores.

Las determinaciones analíticas realizadas durante el desarrollo experimental fueron actividad proteolítica, biomasa, viabilidad celular, consumo de sacarosa, proteína y viscosidad

Al terminar los cultivos en los biorreactores, el medio agotado fue cosechado y la(s) enzima(s) proteolítica(s) se recuperaron e identificaron.

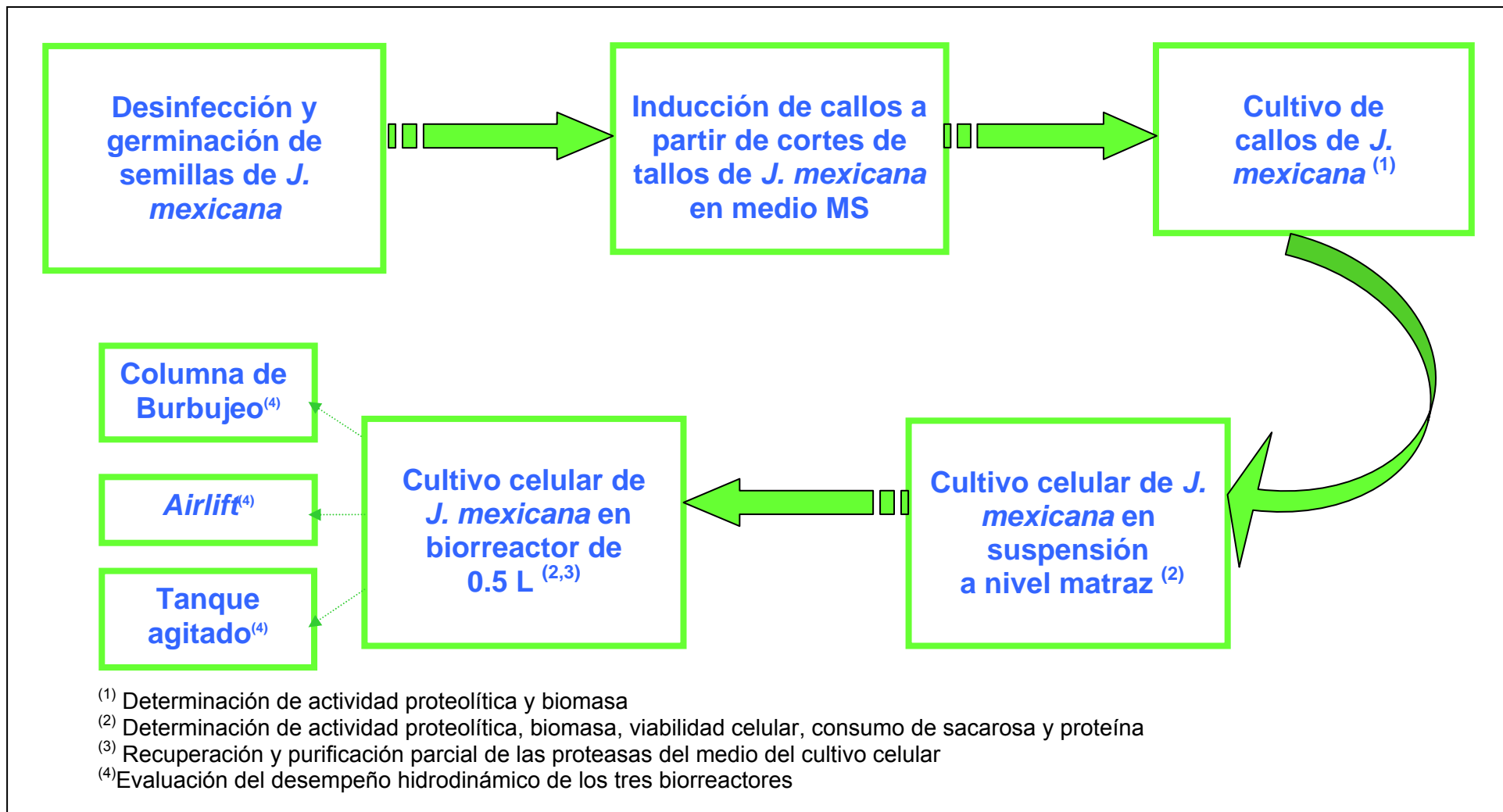


Figura 2. Representación esquemática del desarrollo experimental del trabajo de tesis.

5.2 Descripción de los tres tipos de biorreactores utilizados: una columna de burbujeo, un *airlift* y dos de tanque agitado

El biorreactor de columna de burbujeo utilizado (Figura 3) fue de diseño estándar, con una relación altura a diámetro de 10 y un volumen nominal de 600 mL. El difusor es de vidrio sintetizado de 2.7 cm de diámetro, con diámetros de poro de 100 a 160 μm (Schott, Alemania).



Figura 3. Biorreactor de columna de burbujeo

El biorreactor *airlift* es idéntico al de columna de burbujeo, excepto por el tubo de arrastre (Figura 4).



Figura 4. Biorreactor *airlift*

El tanque agitado magnéticamente fue de diseño estándar, con un volumen nominal de 500 mL; el sistema de agitación consistió dos turbinas Rushton de seis paletas (Figura 5). La flecha se montó sobre un imán ubicado en el fondo del recipiente.



Figura 5. Tanque agitado magnéticamente

Se utilizó un segundo biorreactor de tanque agitado, marca Applikon, agitado mecánicamente y con la flecha montada en la tapa del recipiente (Figura 6). Este biorreactor tuvo un volumen nominal de 3 L y el impulsor fue una turbina Rushton de seis paletas.



Figura 6. Tanque agitado mecánicamente

5.3 Condiciones de operación para el cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en los biorreactores

Los cultivos celulares se llevaron a cabo en cuatro biorreactores: dos de tanque agitado, *airlift* y columna de burbujeo, utilizando el medio descrito en el apartado 5.3.4. Cada biorreactor fue inoculado con una concentración de 5% de biomasa en peso fresco. El volumen de operación fue de 400 mL y la aireación de 0.5 vvm; en el

caso del tanque agitado, la agitación fue de 300 rpm. Al igual que para el inóculo, la toma de muestra se realizó cada siete días. Los biorreactores fueron alimentados con medio fresco para mantener la concentración de sacarosa en 40 g/L, aproximadamente cada siete días.

5.4 Evaluación del desempeño hidrodinámico de los biorreactores

5.4.1 Determinación del tiempo de mezclado por el método de adición de pulsos

El tiempo de mezclado en los biorreactores se determinó conteniendo agua destilada como líquido de prueba. Las velocidades de aireación empleadas fueron de 0.03 a 3.3 cm/s. El pH se midió cada 0.16 s con un medidor de pH (DEIC, México) conectado a una computadora. El flujo de aire se midió con un rotámetro (Cole Parmer, USA). 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 (Nielsen y Villadsen, 1994).

5.4.2 Determinación de las velocidades de corte

a) Biorreactor de columna de burbujeo

La velocidad de corte γ (en s^{-1}) para este biorreactor fue calculada de acuerdo a la ecuación reportada por Chisti y Moo-Young en 1989:

$$\gamma = \frac{5000 P_G}{\rho_{LG} V_L}$$

donde U_G es la velocidad superficial del gas (m/s) y P_G/V_L (W/m^3) es la potencia por unidad de volumen, calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{P_G}{V_L} = \rho_L g U_G$$

b) Biorreactor *airlift*

La ecuación utilizada para determinar la velocidad de corte en el biorreactor anterior no puede ser empleada en un biorreactor *airlift* debido a que, aunque U_G sea igual a U_{GR} (velocidad superficial del gas en la zona ascendente del biorreactor *airlift*), el consumo de potencia es diferente en estos dos sistemas. Por esta razón, la expresión para la velocidad de corte γ en el biorreactor *airlift* es (Chisti y Moo-Young, 1989):

$$\gamma = \frac{5000}{\rho_L g} \frac{A_r + A_d}{A_r} \frac{P_G}{V_L}$$

donde A_d es el área transversal de la zona descendente (m^2), A_r el área transversal de la zona ascendente (m^2), g es la gravedad (m/s^2), ρ_L la densidad del líquido (kg/m^3) y P_G/V_L se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\frac{P_G}{V_L} = \rho_L g U_{GR} \frac{A_r}{A_r + A_d}$$

c) Biorreactor de tanque agitado

Existen diversas ecuaciones que sugieren que, en fluidos Newtonianos, la velocidad de corte promedio depende de la velocidad de agitación N y $N^{1.5}$ en flujos laminares y turbulentos, respectivamente. Sánchez-Pérez *et al.* (2006) correlacionaron valores de la velocidad de corte promedio del impulsor con la velocidad rotacional de éste, obteniendo la siguiente relación:

$$\gamma = 33.1 N^{1.4}$$

donde N es la velocidad del impulsor (rpm).

La velocidad de corte en el tanque agitado fue estimada de acuerdo a dicha ecuación.

5.5 Preparación de inóculos para el cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en biorreactores

5.5.1 Desinfección de semillas de *Jacaratia mexicana*

Las semillas (obtenidas de frutos cosechados durante los meses de abril a mayo en el campo experimental San Isidro, en Yautepec, Morelos) se colocaron en detergente extrán al 2 % (v/v) durante 40 minutos, posteriormente se enjuagaron con suficiente agua destilada estéril para eliminar el detergente y se pasaron a un vaso estéril con etanol al 70% por un minuto. Después de esto, se enjuagaron varias veces con agua estéril para eliminar el etanol y se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 25%, durante 15 minutos. Se enjuagaron nuevamente varias veces con agua estéril para eliminar el hipoclorito de sodio. Las semillas se dejaron hidratando en un vaso con agua estéril durante aproximadamente 24 horas (en condiciones de asepsia) (Barrera-Martínez, 2007).

5.5.2 Germinación de semillas de *Jacaratia mexicana*

Con ayuda de una espátula estéril, las semillas desinfectadas se tomaron una a una y se transfirieron a tubos con medio Knop (tres semillas en cada tubo), los cuales 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 cm (Barrera-Martínez, 2007).

5.5.3 Obtención de callos de *Jacaratia mexicana*

El cultivo de callos se inició a partir de cortes de tallo de plántulas de *J. mexicana* germinadas en condiciones de asepsia. Los cortes se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) con 2,4-D 2.26 μM , BAP 2.19 μM y 2% de sacarosa,

completo en sales, con 0.6 % de agar. Los cultivos se mantuvieron en fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 27°C; la transferencia de los callos a medio fresco se realizó cada 15 días. En cada resiembra se determinó la actividad proteolítica en los medios donde crecieron los callos por el método de Kunitz modificado (Ortega y del Castillo, 1966).

5.5.4 Preparación de medios de cultivo en suspensión

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 mL, a los cuales se les agregó aproximadamente 25 mL de medio MS completo en sales con 2,4-D 2.26 μ M, BAP 2.19 μ M, 4% de sacarosa y caseína al 0.005%. El medio se esterilizó a 121° C, 20 minutos (Barrera-Martínez, 2007).

5.5.5 Preparación del inóculo para el cultivo en biorreactores

Los matraces mencionados en la sección anterior se inocularon con aproximadamente 5% (p/v) de callos. Se mantuvieron en agitación a 100 rpm a una temperatura de 25 \pm 3° C, con un fotoperiodo de iluminación natural; cada 14 días se cambió el medio agotado por medio fresco (Barrera-Martínez, 2007).

5.6 Técnicas analíticas

5.6.1 Determinación de actividad proteolítica del cultivo de callos de *Jacaratia mexicana* en medio semisólido

La actividad enzimática en el medio MS donde crecieron los callos, se determinó por el método de Kunitz modificado (Ortega y del Castillo, 1966); la actividad enzimática se realizó por triplicado. El medio se disgregó con una espátula estéril, se agregaron 500 μ L de cisteína 0.8 M en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.6. Los frascos se incubaron a 37°C durante 15 minutos, a cada uno de los frascos se agregó 9.5 mL de caseína al 1 % en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.6. La reacción ocurrió

durante tres horas a 37°C, después de lo cual se tomaron alícuotas de 500 µL de la mezcla y se colocaron en 750 µL de ATC al 5%; se dejaron en reposo durante una hora, se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 minutos y se determinó la absorbancia a 280 nm contra un blanco de reactivos (750 µL de ATC al 5% y 500 µL de regulador de fosfatos, 0.05 M, pH 7.6) (Barrera-Martínez, 2007).

La actividad proteolítica se expresó en UT (unidad de tirosina) y se definió como los µg de tirosina liberados por hora, usando la ecuación de la curva tipo de tirosina:

$$y = 1.1595x + 0.0053, R^2=0.9995 \quad (\text{ver anexo 3})$$

5.6.2 Determinación de actividad proteolítica del cultivo celular de *Jacaratia mexicana* en medio en suspensión

Se tomaron 90 µL del medio de cultivo y se adicionaron 30 µL de cisteína 0.2 M en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.6; las muestras se incubaron a 37°C durante 10 minutos para activar la enzima.

Se colocaron, en tubos de polipropileno de 1.5 mL, 475 µL de caseína al 1% como sustrato y se agregaron 25 µL de la enzima activada. La actividad enzimática se realizó por triplicado durante tres horas a 37°C, deteniendo la reacción con 750 µL de ATC al 5%. El testigo sólo contenía 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 determinó la absorbancia a 280 nm contra un blanco de reactivos (750 µL de ATC al 5% y 500 µL de regulador de fosfatos, 0.05 M, pH 7.6). Se calculó la actividad proteolítica de la misma forma que en la sección 5.6.1.

5.6.3 Determinación de biomasa en los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en suspensión

Membranas de 0.45 μm se pesaron, posteriormente se filtró a través de ellas 1 mL de cultivo en suspensión. Las membranas se colocaron en una estufa a 60° C, hasta que alcanzaron un peso constante, y por diferencia de peso se calculó el peso seco de las células presentes por mL de medio de cultivo en suspensión (Barrera-Martínez, 2007).

5.6.4 Determinación de viabilidad celular de los cultivos celulares de *Jacaratia mexicana*

Se mezcló azul de tripano y muestra en proporción 1:1, posteriormente se colocó una alícuota conocida en la cámara de Neubauer y se observó al microscopio. Se contaron las células de los cuatro cuadros ubicados en las esquinas de la cámara, se dividieron entre cuatro y se multiplicaron por 10000 (si se hizo una dilución, se multiplica también por ésta); el valor resultante es el número de células por mililitro (Barrera-Martínez, 2007).

5.6.5 Determinación de morfología celular

Las imágenes de las células fueron obtenidas utilizando un microscopio marca Olympus con una cámara fotográfica acoplada; la amplificación de la imagen fue de 10x. El software utilizado para el análisis de las imágenes fue Autocad®; se midió la longitud y el ancho de 400 células, con lo cual se obtuvo el factor de forma elíptica (f_e), el cuál se define como la relación longitud/anchura (Trejo-Tapia *et al.*, 2001) de las células. También se determinó el área de cada célula y se dividió entre el área de una elipse (calculada con la longitud y anchura de cada célula), expresándose como A/A_e .

5.6.6 Determinación del consumo de sacarosa en los medios en suspensión

El consumo de sacarosa se determinó por el método de la antrona (Van Handel, 1967). Se colocaron 25 μL del sobrenadante filtrado del medio de cultivo en un tubo

Eppendorf y se adicionaron 25 μL de una solución de KOH al 30%. Se colocaron 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 preparado en el momento y se colocaron en un baño a 40° C por 10 minutos, leyendo la absorbancia a 620 nm.

La concentración de sacarosa se determinó usando la ecuación de la curva tipo de sacarosa:

$$y = 0.0076x + 0.0081, R^2=0.9989 \quad (\text{ver anexo 3})$$

5.6.7 Determinación de proteína en los medios en suspensión

La cantidad de proteína presente en los medios de cultivo en suspensión se determinó mediante el método de Bradford, 1976. Se tomaron 250 μL del medio de cultivo y se adicionaron 750 μL del reactivo de Bradford; 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 la curva tipo de Bradford:

$$y = 0.0045x + 0.0578, R^2=0.9752 \quad (\text{ver anexo 3})$$

5.6.8 Determinación de viscosidad en los medios en suspensión

La viscosidad del medio de cultivo en suspensión (con células) fue determinada en un viscosímetro marca Haake, modelo RV20 Rotovisco. Se tomó una muestra de 10 mL y se colocó en un cilindro rotatorio. Se ajustó la temperatura a 25° C y se realizó un barrido de velocidades de corte de 10 a 100 s^{-1} , midiéndose el esfuerzo de corte correspondiente a cada velocidad. Para estimar la viscosidad del medio se aplicó la Ley de la potencia:

$$\mu = \frac{k\gamma^n}{\gamma} = k\gamma^{n-1}$$

donde μ es la viscosidad aparente, γ es la velocidad de corte, k es el índice de consistencia y n el índice de comportamiento del fluido.

Esta ecuación es para fluidos no newtonianos, sin embargo, cuando el valor de n es igual a uno esta ley se convierte en la ley de Newton (Bird *et al.*, 2001).

El cálculo de la viscosidad se hizo a partir de una gráfica de \ln de la velocidad de corte contra el \ln de la viscosidad aparente, con lo que se obtuvo una línea recta donde la ordenada al origen es igual al \ln de la viscosidad, de acuerdo a la linearización de la ecuación anterior:

$$\ln \mu = \ln k + (n - 1) \ln \gamma$$

5.6.9 Recuperación de las proteasas de los medios de cultivo celular de *Jacaratia mexicana*

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. Primero se concentró por medio de liofilización en una liofilizadora marca Labconco, modelo Freezone 4.5, hasta tener aproximadamente una décima parte del volumen original, se dializó por ultrafiltración en una celda Amicon con una membrana de 3 kDa de corte molecular, usando Nitrógeno de alta pureza a 2.8 kg/cm². Posteriormente las proteasas recuperadas fueron purificadas por cromatografía de intercambio catiónico.

Las muestras purificadas, el extracto del látex de *J. mexicana* y el marcador de peso molecular se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

5.6.10 Purificación por cromatografía de intercambio catiónico

El medio de cultivo sometido a los procesos mencionados en la sección anterior fue purificado por cromatografía de intercambio catiónico en un equipo Äkta PRIME usando una columna HiTrap SP de 5 mL. Se inyectaron 1.5 mg/mL de proteína; para la elución se utilizó como fase móvil regulador de fosfatos de sodio 0.05 M (fase A) y un gradiente de NaCl: regulador de fosfatos de sodio 0.05 M con cloruro de sodio 1 M (fase B), ambas fases a pH 6.3.

5.6.11 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para preparar un volumen de 5 mL de gel de poliacrilamida se utilizaron 1.7 mL de agua, 2 mL de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 1.25 mL de tris 2 M pH 8.8, 25 µL de PSA (persulfato de amonio), 2.5 µL de TEMED (N,N,N,N'-tetrametiléndiamina), 50 µL SDS al 10%). Se vació la acrilamida en el molde para el gel y se dejó polimerizar 20 minutos. Se preparó el gel concentrador de acrilamida al 4% (para un volumen de 2 mL: 1.25 mL de agua, 275 µL de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 525 µL de tris 2 M pH 6.8, 10 µL de PSA, 2 µL de TEMED. Se vació la acrilamida, se colocó el peine y se dejó polimerizar 20 minutos. Después, se sacó el peine, se limpiaron los pozos y se colocaron 30 µL de muestra preparada [40 µL de muestra y 10 µL de regulador de muestra (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.4 % azul de bromofenol y 40% glicerol)].

Las muestras se corrieron a 80 mV durante la etapa de concentración y a 120 mV durante la etapa de separación (durante 20 y 60 minutos, respectivamente) utilizando Tris-Glicina con SDS como amortiguador de corrida.

Para visualizar las proteínas el gel se tiñó azul Coomassie R-250 y se eliminó después el exceso de colorante con una solución de ácido acético y se tomó la fotografía del gel.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación del desempeño hidrodinámico de los biorreactores

6.1.1 Biorreactor de columna de burbujeo

En la figura 7 se presenta el tiempo de mezclado en el biorreactor de columna de burbujeo conteniendo agua destilada en función de la velocidad superficial de aire. Al aumentar el flujo de aire disminuye el tiempo de mezclado. Este comportamiento es el esperado, debido a que al aumentar la velocidad de aireación, aumenta el número de burbujas que al ascender causan mayor movimiento del líquido y con ello se alcanzan tiempos de mezclado más cortos (Camacho-Rubio *et al.*, 2004).

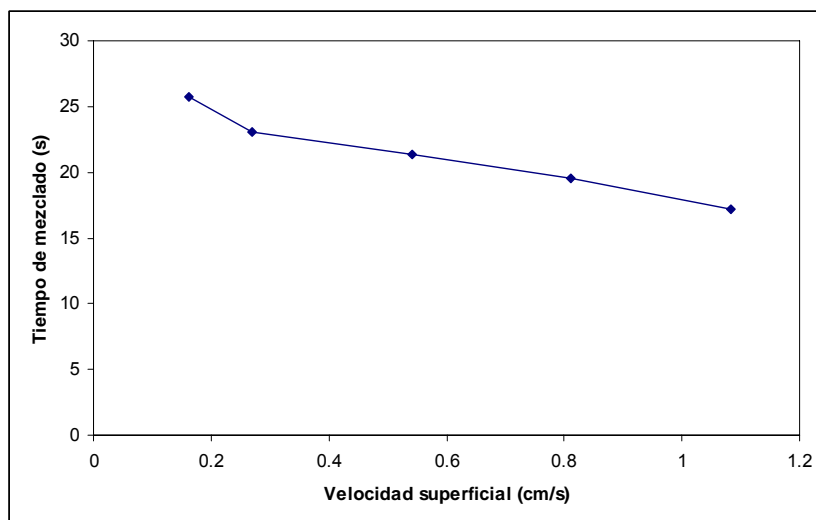


Figura 7. Tiempo de mezclado del biorreactor de columna de burbujeo determinado para un volumen de 480 mL de agua destilada

6.1.2 Biorreactor *airlift*

En el biorreactor *airlift*, el tiempo de mezclado se determinó para tres flujos de aire y a tres alturas del líquido sobre el tubo de arrastre, utilizando agua destilada. Los resultados del tiempo de mezclado en función de la velocidad superficial de aire se muestran en la Figura 8. Al aumentar el flujo de aire, el tiempo de mezclado

disminuye; lo mismo ocurre al aumentar la altura del líquido, aunque la disminución es menor; dicho comportamiento concuerda con lo reportado por Camacho-Rubio *et al.* (2004). Para una velocidad superficial de aire de 1.65 cm/s (utilizada en el cultivo de células de *J. mexicana*), el tiempo de mezclado en el biorreactor *airlift* fue de 29.3 s.

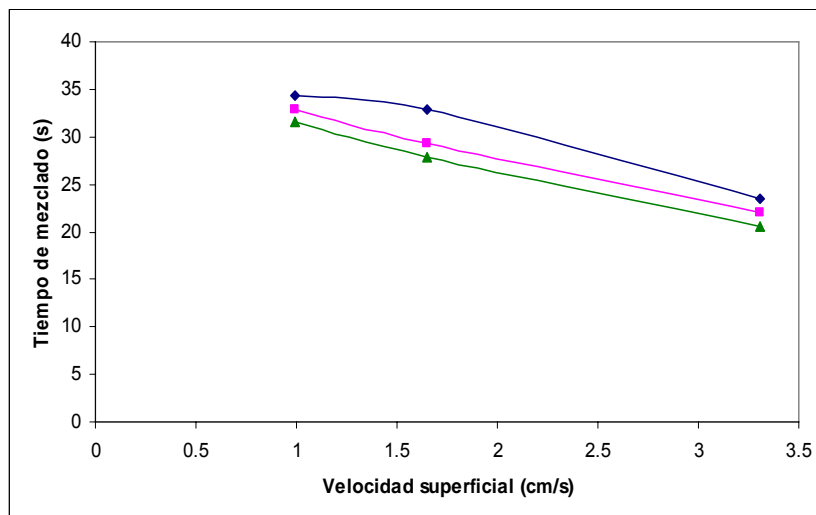


Figura 8. Tiempo de mezclado del biorreactor *airlift* determinado para un volumen de 500 mL de agua destilada, utilizando las siguientes alturas del líquido sobre el tubo de arrastre: 1 cm (◆), 3 cm (■) y 5 cm (▲).

6.1.3 Biorreactor de tanque agitado

En el biorreactor de tanque agitado, el tiempo de mezclado también fue determinado para cinco flujos de aire, utilizando agua destilada. En la figura 9 se puede observar que al aumentar el flujo de aire, el tiempo de mezclado disminuye. Para la velocidad superficial de aire utilizada en el cultivo de células de *J. mexicana* (0.05 cm/s) se determinó un tiempo de mezclado de 21 s.

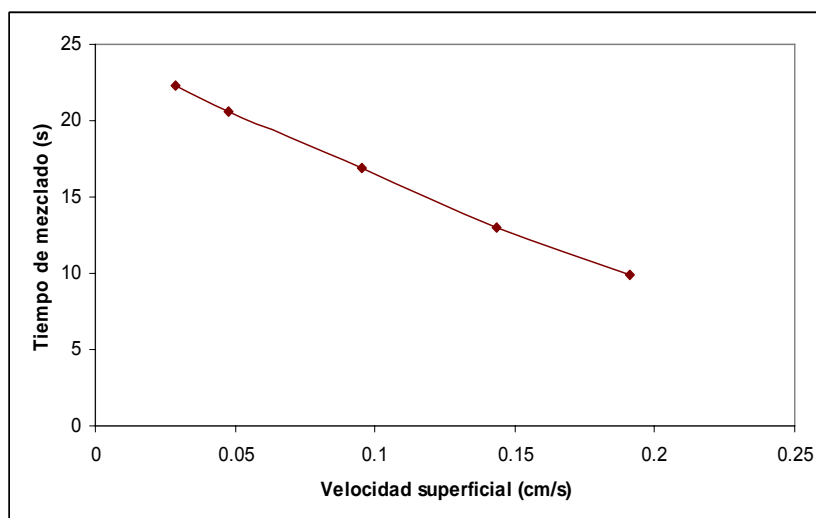


Figura 9. Tiempo de mezclado del biorreactor de tanque agitado determinado para un volumen de 500 mL de agua destilada

El tiempo de mezclado fue menor en la columna de burbujeo (23.1 s) que en el biorreactor *airlift* (29.3 s), tal como se encuentra reportado en la literatura (Sánchez-Mirón *et al.*, 2004). Sin embargo, el biorreactor que presentó un mejor tiempo de mezclado fue el tanque agitado.

6.1.4 Viscosidad

También se midió la viscosidad del medio de cultivo con células de *J. mexicana*, cuya concentración de biomasa era de 83 g/L en peso fresco después de 28 días de cultivo, encontrándose que ésta es similar (1.03 mPa·s) a la del agua destilada y que dicho medio presenta el comportamiento de un fluido newtoniano; esto coincide con lo reportado por Martínez-Guillén en 2006. Debido a que las viscosidades del agua destilada y del medio de cultivo (con 8.3% de células) son semejantes, se espera que los tiempos de mezclado sean similares para ambos fluidos

El Cuadro 2 muestra el consumo de potencia, los tiempos de mezclado y las velocidades de corte correspondientes a las condiciones de operación usadas durante el cultivo celular de *J. mexicana*, así como la viabilidad celular de los

cultivos. En la siguiente sección se analiza el efecto del desempeño hidrodinámico sobre el cultivo celular de *J. mexicana*.

Cuadro 2. Consumos de potencia, tiempos de mezclado, velocidades de corte y viabilidad celular determinadas durante el cultivo celular de *J. mexicana*.

Biorreactor	Volumen Nominal (L)	Volumen de operación (L)	Viabilidad a 28 días (%)	Tiempo de mezclado (s)	P/V (W/L)	γ (s^{-1})
Matraz	0.5	0.15	No determinada	No determinado	0.18	<50 ^(a)
Columna de burbujeo	0.6	0.5	81	23.1	0.26	13 ^(b)
<i>Airlift</i>	0.6	0.5	88	29.3	0.29	36 ^(c)
Tanque agitado magnéticamente	0.5	0.35	1	20.6	0.031	315 ^(d)
Tanque agitado mecánicamente	3	0.8	82	21.2	0.101	400 ^(d)

Velocidad de corte calculada de acuerdo a: a) Büchs *et al.*, 2000; b) Chisti y Moo-Young, 1989; c) Chisti y Moo-Young, 1989; d) Sánchez *et al.*, 2006.

6.2 Cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en biorreactores

Los cultivos celulares de *J. mexicana* se realizaron en tres series de experimentos; la primera serie se llevó a cabo en el biorreactor *airlift*, de columna de burbujeo y de tanque agitado magnéticamente.

Posteriormente se realizó un segundo experimento utilizando únicamente el tanque agitado mecánicamente.

En la tercera serie de experimentos, se sustituyó el tanque agitado magnéticamente por el de agitación mecánica, utilizando nuevamente los biorreactores *airlift* y de columna de burbujeo.

6.2.1 Viabilidad celular y velocidad de corte

En la primera serie de experimentos, como puede observarse en el Cuadro 2, la viabilidad celular al término del cultivo es similar para los biorreactores de columna de burbujeo y *airlift*, sin embargo en el tanque agitado magnéticamente sólo se conserva el 1% de viabilidad, lo cual puede deberse a que la velocidad de corte es mayor en este reactor (315 s^{-1}). La velocidad de corte calculada para el biorreactor *airlift* (36 s^{-1}) fue mayor a la reportada por Pan *et al.* (2000), la cual fue de 7.05 s^{-1} . Por el contrario, Juárez-Sánchez *et al.* (2002) reportaron una velocidad de corte de 77 s^{-1} , lo cual indica que las velocidades de corte en el biorreactor *airlift* utilizado en este trabajo se encuentra dentro del intervalo reportado en la literatura para este tipo de biorreactores. En 1999, Rodríguez-Monroy y Galindo reportaron una velocidad de corte promedio de 77 s^{-1} en un cultivo de *Beta vulgaris* realizado en un tanque agitado; igualmente, Pan *et al.* (2000) calcularon una velocidad de corte de 55 s^{-1} al cultivar *Taxus chinensis* en el mismo tipo de biorreactor. La velocidad de corte calculada para el tanque agitado utilizado en este trabajo fue mayor, lo cual puede causar, como se mencionó arriba, la pérdida de viabilidad.

Otra posible explicación a esta pérdida de viabilidad es que el sistema de agitación magnética de este tanque agitado, que consiste de una flecha montada sobre una placa magnética ubicada en el fondo del recipiente, por defecto de diseño, no sellaba bien en la base del biorreactor y esto causó que las células pasaran a la parte inferior de dicha placa; debido a la agitación, este sistema actuó como un molino ocasionando el rompimiento de células.

La figura 10 muestra observaciones al microscopio de las células de *J. mexicana* a los 24 días de cultivo en los biorreactores de tanque agitado magnéticamente, de columna de burbujeo y *airlift*. En el biorreactor de tanque agitado la viabilidad de las

células fue de 1%, mucho menor a la observada en los biorreactores *airlift* (88%) y de columna de burbujeo (81%).

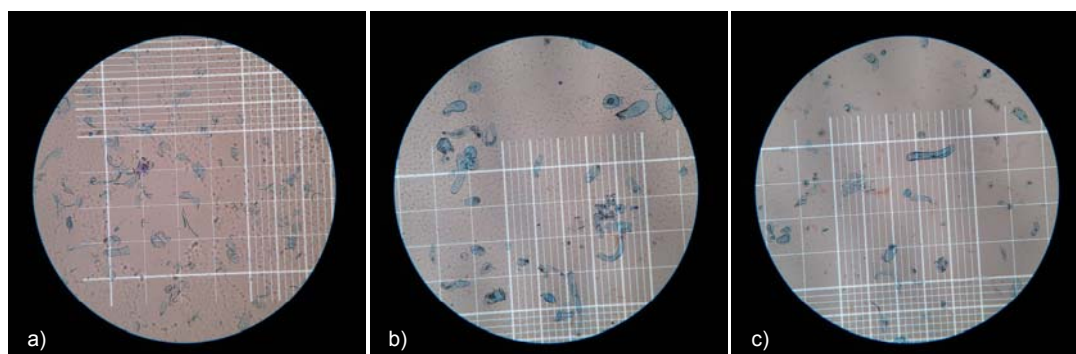


Figura 10. Fotografías de células de *J. mexicana* a los 28 días de cultivo en tres biorreactores: a) tanque agitado magnéticamente, b) columna de burbujeo, c) *airlift*. Volumen de operación= 400 mL, aireación= 0.5 vvm; en el tanque agitado, la agitación de 300 rpm.

Para investigar si la ruptura de las células se debió al diseño del reactor o a la relativamente alta velocidad de corte en el tanque agitado magnéticamente, se hizo un cultivo celular usando el tanque agitado de diseño estándar (marca Applikon de 3L) que tiene la flecha de agitación montada en la tapa del biorreactor. El volumen de operación del biorreactor fue de 1.2 L, con la misma aireación y agitación que el utilizado anteriormente (0.5 vvm y 300 rpm, respectivamente). La toma de muestra se realizó cada cuatro días.

Al igual que en los tres biorreactores anteriores, fue determinada la velocidad de corte para el tanque agitado mecánicamente, la cual fue mayor (400 s^{-1}) que aquella calculada para el tanque con agitación magnética (315 s^{-1}), con lo cual se puede concluir que el rompimiento de las células (y por lo tanto la pérdida de viabilidad del 99%) en el tanque agitado utilizado en el primer experimento se debe al diseño de éste y no a la velocidad de corte. Asimismo, se fotografiaron las células a los 20 días del cultivo y fue posible observar que la viabilidad es similar al de los biorreactores de columna de burbujeo y *airlift* (87% de células viables)

Posteriormente, se realizó la tercera serie de experimentos. Al término del cultivo (28 días) se conservaron viables aproximadamente el 82% de las células; estos resultados fueron similares en los tres biorreactores. De acuerdo a Barrera-Martínez

(2007), la viabilidad de las células de *J. mexicana* cultivadas en un biorreactor *airlift* de 2 L fue de 80% a los 35 días, lo cual concuerda con la viabilidad obtenida en el presente trabajo. También se determinó el crecimiento celular, consumo de sacarosa, actividad proteolítica y proteína; dichos resultados se presentan en las siguientes secciones.

6.2.2 Morfología celular

Con el propósito de observar si las condiciones hidrodinámicas presentes en los biorreactores influyeron sobre la morfología celular, se tomaron fotografías de las células de *J. mexicana* del inóculo, así como al final del cultivo en los tres tipos de biorreactores (*airlift*, columna de burbujeo y tanque agitado mecánicamente), y se midieron como se indica en la metodología.

Los cultivos de células vegetales en suspensión son heterogéneos en cuanto a su tamaño, forma y agregación celular (Trejo-Tapia *et al.*, 2001). En los cultivos de *J. mexicana* en tres tipos de biorreactores realizados en este trabajo, las células tenían diferentes formas: alargadas, redondas y elípticas. En cuanto al tamaño de las células, fue de 35 hasta 600 μm de longitud, observándose la presencia tanto de células individuales como de agregados celulares.

Se determinó el factor elíptico promedio (f_e) y la relación entre el área de las células y el área de una elipse (A/A_e) para el inóculo, así como para cada biorreactor, tal como se indica en la metodología. Los resultados, con su respectiva desviación estándar, se muestran en el Cuadro 3; al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las células medido al inicio y al final de cada cultivo, lo cual indica que las condiciones a las que fueron sometidas las células no afectaron su tamaño ni su morfología celular. Este resultado difiere del encontrado en el cultivo de *U. tomentosa*, en el cual sí hubo un cambio en la forma y tamaño de las células al pasar de matraz a tanque agitado (Trejo-Tapia *et al.*, 2005).

Cuadro 3. Factor elíptico promedio y relación de áreas promedio calculada para las células de *J. mexicana* en tres biorreactores: *airlift*, columna de burbujeo y tanque agitado mecánicamente.

Biorreactor	f_e	A/A_e
Inóculo	3.0209 ± 2.3281	0.9972 ± 0.1101
<i>Airlift</i>	$3.0097 \pm 2.3198^{(a)}$	$1.0174 \pm 0.1052^{(a)}$
Columna de burbujeo	$3.0683 \pm 2.4024^{(a)}$	$0.9925 \pm 0.1140^{(a)}$
Tanque agitado	$3.1274 \pm 2.4308^{(a)}$	$1.0169 \pm 0.0934^{(a)}$

a) Valores determinados a los 28 días de cultivo, en 400 células.

6.2.3 Crecimiento celular y consumo de sacarosa

En la primera serie de experimentos, el crecimiento de la biomasa fue similar en los biorreactores *airlift* y de columna de burbujeo (17%), sin embargo, en el tanque agitado magnéticamente fue casi nulo (datos no mostrados); esto se debió al diseño del biorreactor, como se indicó en la sección anterior.

En el experimento realizado en el tanque agitado mecánicamente, la biomasa se incrementó un 23%, alcanzando una concentración de 64.5 g/L a los 20 días (Figura 11), con lo cual se comprobó que el tanque agitado mecánicamente no ocasionó ruptura a las células. Comparando estos resultados con los obtenidos en la primera serie de experimentos, se observó que el aumento de biomasa en este tanque agitado con respecto al biorreactor de columna de burbujeo fue de 4.6%, mientras que con respecto al biorreactor *airlift* fue de 20% (comparando los datos obtenidos en el día 20, para los tres biorreactores).

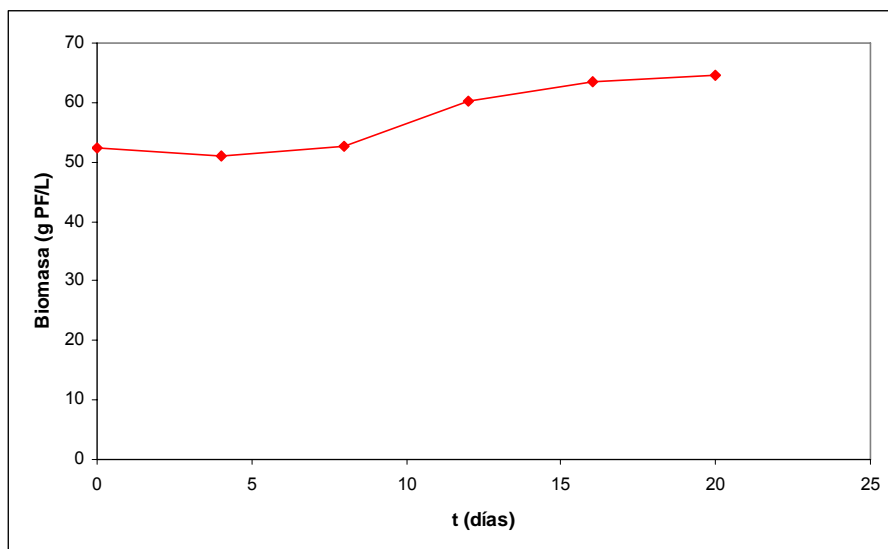


Figura 11. Crecimiento celular de *J. mexicana* en tanque agitado mecánicamente. Volumen de operación= 1.2 L, aireación= 0.5 vvm, agitación= 300 rpm.

Al haber un incremento en la biomasa, por consiguiente, también aumenta el consumo de sacarosa, tal como se muestra en la figura 12. Como puede observarse, la concentración de sacarosa disminuye de 46.1 a 26.5 g/L. Se calculó el rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato, encontrándose que éste es igual a 0.032 g biomasa/g sacarosa (en peso seco). No se encontraron datos de rendimiento en la literatura, ya que usualmente se reporta la cantidad de biomasa producida mas no la cantidad de sustrato consumida, por lo que no fue posible realizar una comparación del rendimiento.

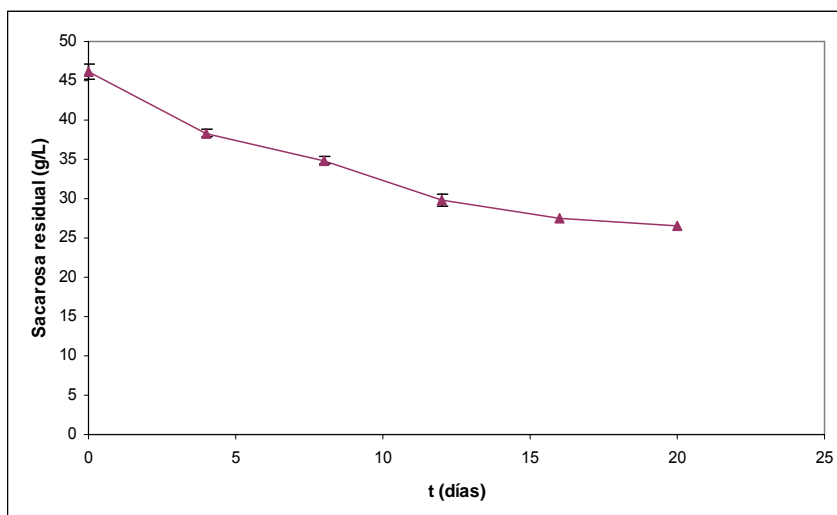


Figura 12. Consumo de sacarosa del cultivo celular de *J. mexicana* en tanque agitado mecánicamente. Volumen de operación= 1.2 L, aireación= 0.5 vvm, agitación= 300 rpm.

En la figura 13 se muestra el crecimiento celular para los cultivos celulares de *J. mexicana* en los tres tipos de biorreactores (en la tercera serie de experimentos). En los biorreactores de columna de burbujeo y *airlift* el crecimiento celular fue similar; la máxima concentración de biomasa, en el día 28, fue de 78.5 ± 4.885 y 79.4 ± 4.2922 g/L respectivamente, lo cual corresponde a un 16% de incremento de biomasa en la columna de burbujeo y a un 17% en el *airlift*. En el tanque agitado este aumento fue del 21%, alcanzándose una concentración de biomasa de 83.3 ± 6.195 g/L (peso fresco). El programa StatPlus 2007 fue utilizado para realizar el análisis estadístico de los valores presentados en esta tesis. Al realizarse el análisis de varianza (ANOVA) se encontró que no existe una diferencia estadística significativa entre los valores de biomasa en los tres tipos de biorreactores utilizados ($p < 0.05$).

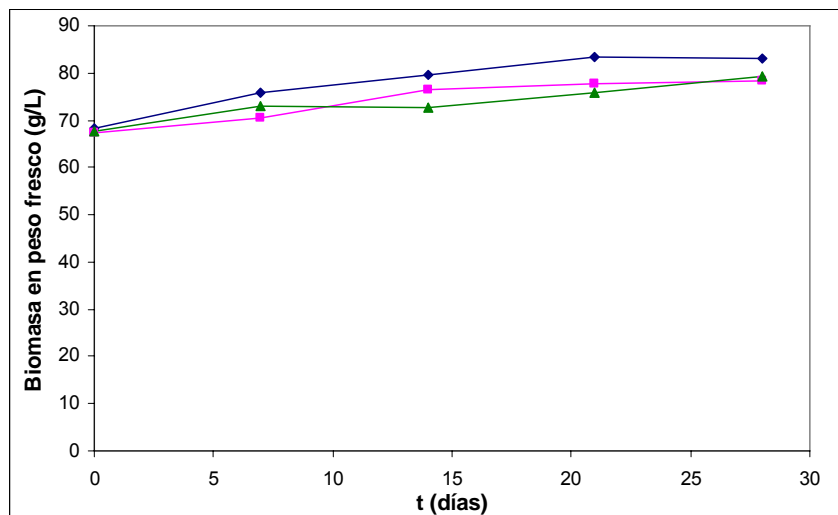


Figura 13. Crecimiento celular de *J. mexicana* en tres biorreactores: tanque agitado mecánicamente (◆), columna de burbujeo (■) y *airlift* (▲). Volumen de operación= 400 mL, aireación= 0.5 vvm; en el tanque agitado, volumen de operación= 800 mL y agitación= 300 rpm.

En el trabajo realizado por Barrera-Martínez (2007) fueron cultivadas células de *J. mexicana* en un biorreactor *airlift* de 2.0 L (volumen de operación de 0.8 L) adicionando hidrolizado de caseína como inductor, reportándose una concentración máxima de biomasa de 80 g/L (en peso fresco) a los 49 días; en este trabajo se alcanzó una concentración similar en sólo 28 días. En otro estudio realizado en el mismo biorreactor (volumen de operación de 1.2 L), la cantidad de biomasa alcanzada fue de 156 g/L (en peso fresco) a los 77 días (Martínez-Guillén, 2006); este resultado indica que es posible lograr un mayor incremento en la biomasa si se continúa el cultivo celular.

Como se observó en la figura 13, el crecimiento celular fue similar en los tres biorreactores. En el cultivo de *Taxus chinensis* realizado por Pan *et al.* (2000) utilizando un tanque agitado y un biorreactor *airlift*, también se observó que el incremento en la biomasa era similar para ambos biorreactores.

El consumo de sacarosa se presenta en la figura 14. Como puede observarse, dicho consumo fue similar en los biorreactores de columna de burbujeo y *airlift*, lo cual coincide con el incremento de la biomasa para los mismos biorreactores. En el tanque agitado, al haber un mayor crecimiento celular, el consumo de sacarosa es también mayor. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias

significativas entre los datos de consumo de sacarosa en los tres tipos de biorreactores ($p < 0.05$).

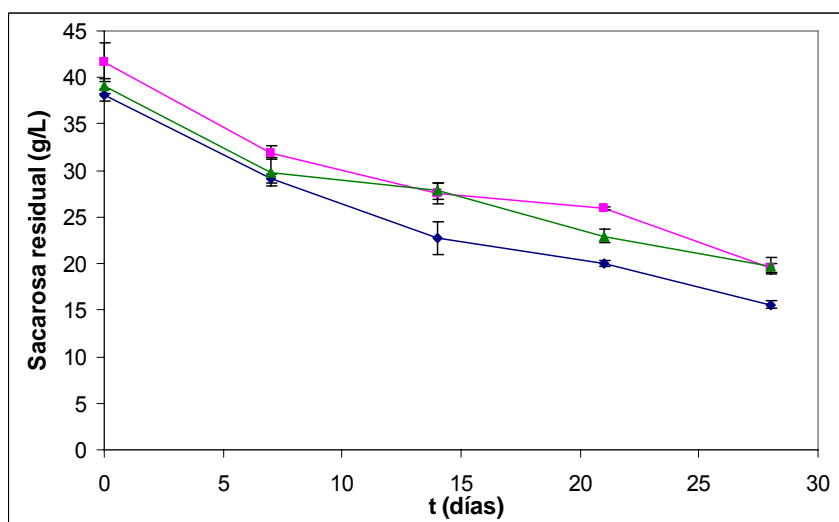


Figura 14. Consumo de sacarosa de las células de *J. mexicana* en tres biorreactores: tanque agitado mecánicamente (◆), columna de burbujeo (■) y *airlift* (▲). Volumen de operación= 400 mL, aireación= 0.5 vvm; en el tanque agitado, volumen de operación= 800 mL y agitación= 300 rpm.

También se calculó el rendimiento de biomasa en función del consumo de sustrato, encontrándose que éste fue de 0.041, 0.033 y 0.030 g biomasa en peso seco/g sustrato para el biorreactor de tanque agitado, columna de burbujeo y *airlift* respectivamente.

6.2.4 Actividad proteolítica y proteína

En la figura 15 se presenta la actividad proteolítica obtenida en el biorreactor de tanque agitado mecánicamente, la cual alcanza un valor máximo de 1.6×10^4 UT/L en el día 7, a partir del cual se presenta una ligera disminución en la actividad, la cual permanece casi constante hasta el día 20. Esto puede deberse a un error experimental.

Con respecto a la actividad proteolítica, ésta presentó un incremento de 23.9% en comparación con la obtenida en el biorreactor de columna de burbujeo; con respecto al biorreactor *airlift*, dicho incremento fue del 36.5% (datos obtenidos a los 20 días de cultivo, en la primera serie de experimentos).

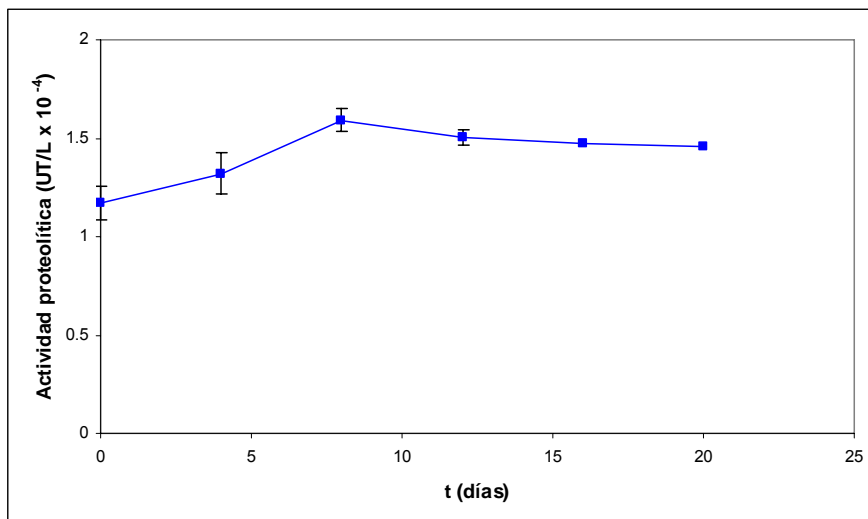


Figura 15. Actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo celular de *J. mexicana* en tanque agitado mecánicamente. Volumen de operación= 1.2 L, aireación= 0.5 vvm, agitación= 300 rpm.

En cuanto a la proteína, ésta fue aumentando hasta el día 12, sin embargo a partir de ese día la concentración permanece constante (aproximadamente 145.5 mg/L, esta cantidad de proteína es similar a la obtenida en los biorreactores de columna de burbujeo y *airlift*) (Figura 16), lo cual está de acuerdo con lo observado respecto a la actividad proteolítica.

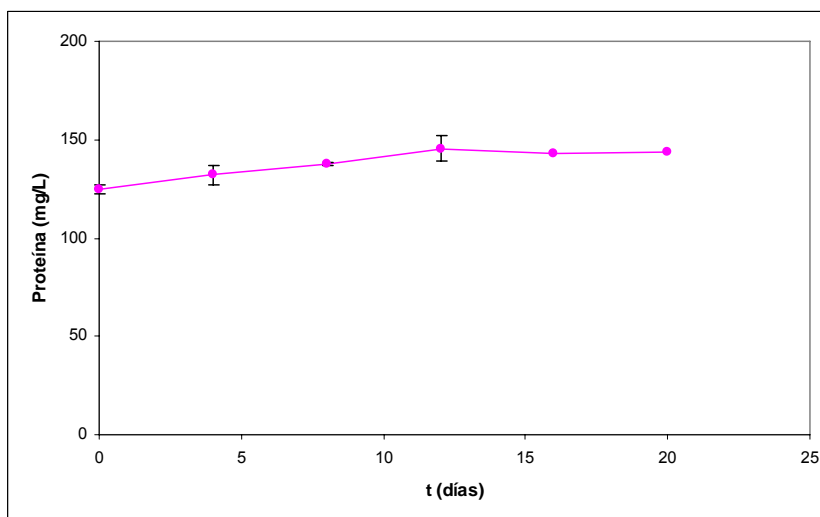


Figura 16. Proteína total determinada en el medio de cultivo celular de *J. mexicana* en tanque agitado mecánicamente. Volumen de operación= 1.2 L, aireación= 0.5 vvm, agitación= 300 rpm.

Los resultados obtenidos de la determinación de la actividad proteolítica en el medio de cultivo (en la tercera serie de experimentos) se muestran en la Figura 17. En los biorreactores de columna de burbujeo y *airlift* se obtuvieron actividades proteolíticas similares ($1.2 \times 10^4 \pm 0.031 \text{ UT/L}$), mientras que en el tanque agitado se obtuvo una mayor actividad proteolítica ($1.7 \times 10^4 \pm 0.198 \text{ UT/L}$). Dicho resultado es similar al obtenido en el experimento anterior donde se utilizó únicamente el tanque agitado mecánicamente. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas entre la actividad proteolítica obtenida en el biorreactor de columna de burbujeo y el *airlift*, sin embargo, sí existe diferencia estadística significativa entre los valores de actividad proteolítica en el tanque agitado con respecto a los otros dos biorreactores ($p < 0.05$).

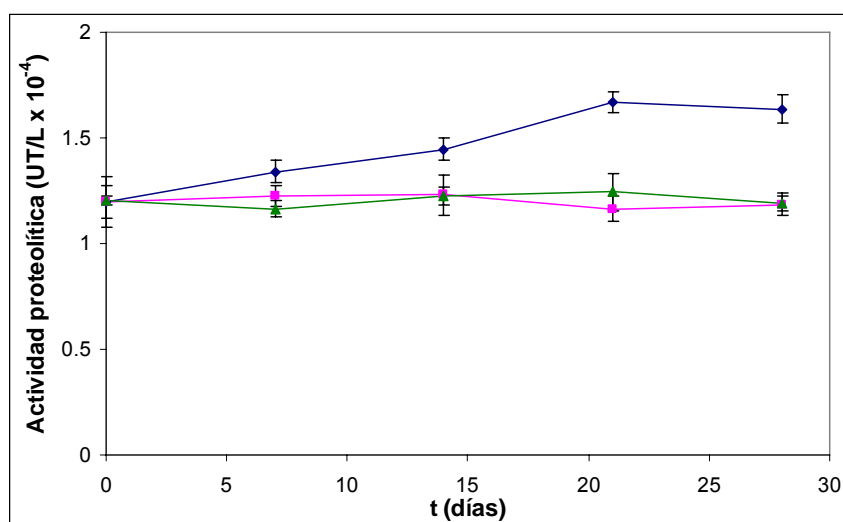


Figura 17. Actividad proteolítica determinada en el medio de cultivo celular de *J. mexicana* en tres biorreactores: tanque agitado mecánicamente (◆), columna de burbujeo (■) y *airlift* (▲). Volumen de operación= 400 mL, aireación= 0.5 vvm; en el tanque agitado, volumen de operación= 800 mL y agitación= 300 rpm.

Las actividades proteolíticas de los cultivos de células de *J. mexicana* obtenidas en los tres biorreactores concuerdan con la actividad proteolítica reportada en el trabajo de Montaña-Herrera (2007), la cual fue de $1.5 \times 10^4 \text{ UT/L}$, utilizando caseína como inductor en un biorreactor *airlift* de 500 mL.

Una posible explicación del incremento en la actividad proteolítica en el cultivo en tanque agitado mecánicamente con respecto a los otros dos biorreactores, es que

éste es el de mayor estrés hidrodinámico, lo cual podría tener un efecto elicitor sobre las células. No se encontraron referencias de que el estrés hidrodinámico incremente la producción de proteínas; sin embargo, se sabe que éste puede incrementar la producción de alcaloides de 5 a 10 veces en un cultivo de células de *Uncaria tomentosa* en tanque agitado (Trejo-Tapia *et al.*, 2005).

Se sabe que las proteasas cisteínicas participan en el recambio de proteínas de la célula, así como en la degradación de proteínas desnaturalizadas y mal plegadas, las que son reemplazadas por proteínas de nueva síntesis (Grudkowska y Zagdanska, 2004). Además, se conoce que estas enzimas actúan como mecanismo de defensa en las plantas. Por ejemplo, cuando una planta es sometida a factores ambientales bióticos o abióticos, como la deficiencia de agua, ésta induce la producción de proteasas cisteínicas como defensa, incrementándose la actividad proteolítica total (Zagdanska y Wisniewski, 1996).

Si la planta es atacada por insectos, las proteasas cisteínicas también actúan como defensa, induciéndose su producción y acumulación. Tal es el caso de diferentes genotipos de maíz resistentes a las especies de *Lepidoptera* (Grudkowska y Zagdanska, 2004). También se han realizado estudios con proteasas de la familia de las Caricáceas, encontrándose que las proteasas cisteínicas son tóxicas o disminuyen el crecimiento de diferentes especies de insectos. Estos estudios indican que es posible, mediante manipulación genética, utilizar estas proteasas para crear cultivos tolerantes a diversos insectos (Konno *et al.*, 2004).

En la figura 18 se presentan los resultados de determinación de proteína en el medio de cultivo. A los 28 días se observa la máxima concentración de proteína, la cual fue de 191.5 ± 13.316 y 196.6 ± 15.655 mg/L en los biorreactores de columna de burbujeo y *airlift*, respectivamente. Para el tanque agitado, esa concentración fue ligeramente mayor (208.7 ± 13.277 mg/L); lo cual concuerda con lo observado respecto a la actividad proteolítica. Sin embargo, la diferencia entre los valores de proteína en los tres biorreactores no es significativa ($p < 0.05$).

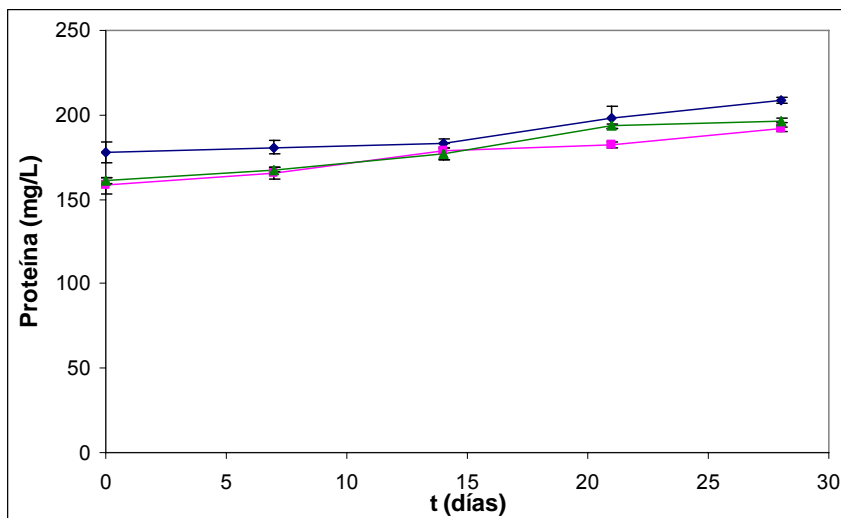


Figura 18. Proteína total determinada en el medio de cultivo donde crecieron las células de *J. mexicana* en tres biorreactores: tanque agitado mecánicamente (◆), columna de burbujeo (■) y airlift (▲). Volumen de operación= 400 mL, aireación= 0.5 vvm; en el tanque agitado, volumen de operación= 800 mL y agitación= 300 rpm.

En cuanto a la síntesis de proteína, Martínez-Guillén (2006) y Barrera-Martínez (2007) reportaron una concentración de proteína entre 30 y 40 mg/L; en cambio, en este estudio dicha cantidad fue aproximadamente cuatro veces mayor, aunque este incremento en la proteína no se reflejó en la actividad proteolítica.

6.3 Recuperación y purificación de proteasas de cultivos celulares de *Jacaratia mexicana*

Con la finalidad de comparar las proteasas sintetizadas en los cultivos celulares con las del látex de los frutos de *J. mexicana*, se realizó recuperación de las proteasas de cultivos celulares de *J. mexicana* y su purificación por cromatografía de intercambio catiónico en condiciones iguales a la purificación de una proteasa del látex de la planta, la mexicana.

En la figura 19a se presenta el perfil de elución de la fracción P-IV de las proteasas extraídas del látex de *J. mexicana*, mientras que en la figura 19b se muestra el perfil

de elución obtenido de la purificación de las proteasas recuperadas del cultivo de células en suspensión de *J. mexicana*. Se observa que ambas figuras presentan un perfil de elución similar, es decir dos picos, el primero corresponde a la fracción que no se unió a la columna, el otro corresponde a las fracciones de enzimas proteolíticas catiónicas. Con ello, se puede concluir que los cultivos celulares en suspensión de *J. mexicana* son capaces de sintetizar proteasas similares a las del látex de los frutos de dicha planta.

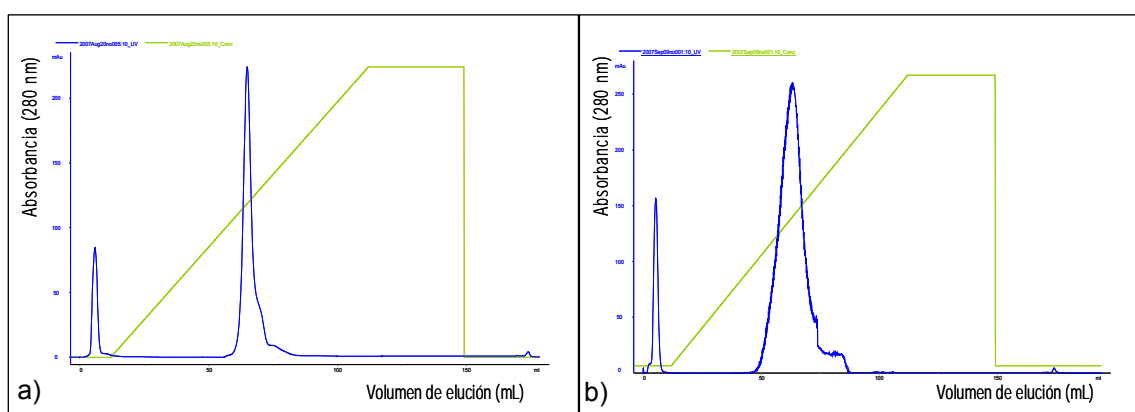


Figura 19. Perfil de elución de la cromatografía de intercambio catiónico de: a) mexicana (fracción IV) de las proteasas del látex de *J. mexicana*; b) proteasas obtenidas por el cultivo en suspensión de células de *J. mexicana*. Columna HiTrap SP 5 mL, condiciones de elución indicadas en metodología.

6.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras de proteasas recuperadas de los cultivos celulares también fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, con SDS. En la Figura 20 se muestra el patrón electroforético, en el cual se observa que el medio de cultivos celulares de *J. mexicana* concentrados mostraron una banda de aproximadamente 24 kDa (carril 4), la que corresponde con el peso molecular de una de las proteasas del látex de *J. mexicana*, la mexicana (Oliver, 1999), lo cual nos indica que las células de *J. mexicana* cultivadas *in vitro* son capaces de producir las mismas proteasas presentes en el látex de dicha planta. Como se puede observar en carriles 2 y 3, los cultivos celulares de *J. mexicana* producen otras proteínas

extracelulares, sin embargo, la banda de 24 kDa es la que se encuentra en mayor proporción.

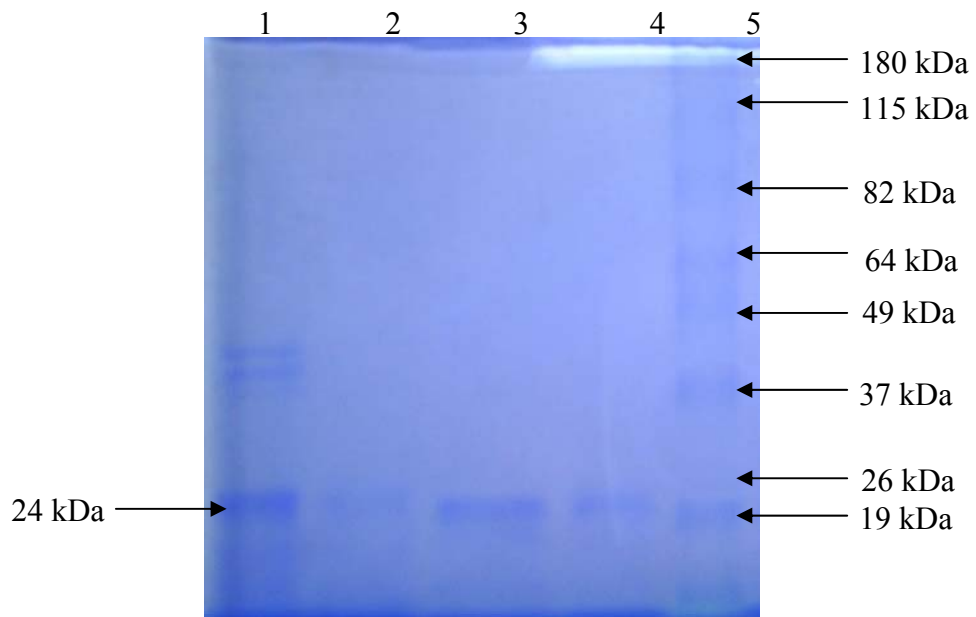


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS. Carril 1. Látex de *J. mexicana*. Carril 2. Extracto de proteasas de *J. mexicana*. Carril 3. Fracción PIV de las proteasas de *J. mexicana*. Carril 4. Medio de cultivo en donde crecieron las células de *J. mexicana*. Carril 5. Marcador de peso molecular.

7 CONCLUSIONES

- El crecimiento de biomasa fue 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 viabilidad de cultivos celulares de *J. mexicana* en el tanque agitado magnéticamente fue del 1% (a los 28 días de cultivo), debido a su efecto de molino.
- La viabilidad de cultivos celulares de *J. mexicana* fue similar (aproximadamente 84%) en los tres tipos de biorreactores bajo las condiciones hidrodinámicas estudiadas.
- La actividad proteolítica obtenida en los biorreactores de columna de burbujeo y *airlift* fue del mismo orden de magnitud (1.2×10^4 UT/L), en cambio en el biorreactor de tanque agitado la actividad fue mayor (1.7×10^4 UT/L).
- Las velocidades de corte generadas en las condiciones de operación de los tres biorreactores estuvieron en el intervalo de 13 a 400 s^{-1} ; estas velocidades 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 dentro de las condiciones estudiadas.

8 PERSPECTIVAS

Aunque en este trabajo se encontró que el estrés hidrodinámico (velocidades de corte en el intervalo de 13 a 400 s⁻¹) no afectó la viabilidad del cultivo celular de *J. mexicana*, en cambio se observó un incremento en la actividad proteolítica del cultivo en el biorreactor de tanque agitado (velocidad de corte de 400 s⁻¹), se sugiere realizar otro experimento sometiendo a las células a menores velocidades de corte, para verificar si este estrés tiene un efecto elicitor sobre las células.

Dado que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad proteolítica obtenida en el biorreactor de tanque agitado con respecto al biorreactor de columna de burbujeo y al *airlift*, se recomienda realizar experimentos de los cultivos celulares de *J. mexicana* en los tres tipos de biorreactores, con una agitación menor y una mayor a la utilizada en este estudio para tener mayor certeza en la elección del tipo de biorreactor más adecuado para la producción de estas enzimas. Siempre y cuando los resultados sean los mismos y si después de realizar un estudio económico se justifica el uso del tanque agitado, entonces se podría pensar en llevar a cabo el escalamiento de la producción de enzimas proteolíticas de *J. mexicana* en dicho biorreactor.

9 REFERENCIAS

- 1) Badillo, C. J. A., Cruz, M. A., Garibay, O. C. y Oliver S. M. 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.
- 2) Bais, H. P., Suresh, B., Raghavarao, K. S. M. S. y Ravishankar, G. A. (2002). Performance of hairy roots cultures of *Cichorium intybus* L. in bioreactors of different configurations. *In Vitro Cellular Development and Biology Plant*, 38:573–580.
- 3) Bais, H. P. y Ravishankar, G. A. (2002). Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69:1-34.
- 4) Barrera, G. y Oliver, 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
- 5) Barrera-Martínez, 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 en ciencias. UPIBI-IPN. México.
- 6) Barrett, A. J. (1994). Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, 244:1–15
- 7) Barrett, A. J. y Rawlings, N. D. (1996). Families and Clans of cysteine peptidase. *Perspectives in Drug Discovery*, 6:1-11
- 8) Barret, A. J., Rawlings, N. D. y Woessner, F. (1998). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Ed. Academic Press.
- 9) Bird, R.B., Stewart, W. E. y Lightfoot, E. N. (2001). *Fenómenos de transporte*. Ed. Reverte.
- 10) Boller, T. (1986). Roles of proteolytic enzymes in interaction of plant and other organisms. In: *Plant Proteolytic Enzymes Vol. 1*. CRC Press. pp. 67-96.
- 11) Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, 72: 248-254.

- 12) Briones, M. R., Cruz, M. T., Cortés, V. M. I. y Oliver, S. M. C. (1994). Preparaciones enzimáticas de interés industrial con proteínas de plantas mexicanas. *Información Tecnológica*, 5(1): 29-38 (Chile).
- 13) Briones, M. R. (1996). Proteinasas de plantas mexicanas potencialmente útiles en la industria alimentaria. Hidrólisis de proteínas vegetales. Tesis de maestría en ciencia (Alimentos) ENCB-IPN. México.
- 14) Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C. y Zoels, B. (2000). Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*, 68: 589-593.
- 15) Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C. y Zoels, B. (2000). Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*, 68: 594-601.
- 16) Calva-Calva, G. (2002). Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos. *Avance y perspectiva*, 21:27-29.
- 17) Camacho-Rubio, F., Sánchez-Mirón, A., Cerón-García, M. C., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. y Chisti, Y. (2004). Mixing in bubble columns: a new approach for characterizing dispersion coefficients. *Chemical Engineering Science*, 59: 4369-4376
- 18) Chisti, Y. y Moo-Young, M. (1989). On the calculation of shear rate and apparent viscosity in airlift and bubble column bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 34:1391-1392.
- 19) Chung, I. S., Kang, Y. M., Oh, J. H., Kim, T., Lee, H. J. y Chae, Y. A. (1994). Continuous suspended cell culture of *Mentha piperita* in cell-recycled air-lift bioreactor. *Biotechnology Techniques*, 8:789-792.
- 20) Cruz y Victoria, M. T., (1993) Aislamiento y caracterización parcial de la enzima proteolítica "hemisfericina" obtenida de *Bromelia hemisphaerica*. Tesis de Maestría. ENCB-IPN. México.
- 21) Dixon, R. A. y Gonzales, R. A. (1994). *Plant cell culture, a practical approach*. England. Second edition. Oxford University Press, pp. 199-214.
- 22) Evans, P. T. y Malmberg, R. (1989). Do polyamines have role in plant development? *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 87:519-522.

- 23) Faust, M. y Wang, S. (1992). Polyamines in horticulturally important plants. *Horticultural Reviews*, 14:333- 356.
- 24) García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R. y López-Munguía, A. (1993). *Biología alimentaria*. México. Primera edición. Ed. Limusa.
- 25) Gomes, R., Mello, J., Rodríguez, L., Bemquerer, P., Lopes, P., Faça, M. y Salas, E. (2005). Isolation of two plant proteinases of latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. *Planta Medica*, 71: 244-248.
- 26) Grudkowska, M. y Zagdanska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51:609-624.
- 27) Haard, N. F. (1998). Specialty enzymes from marine organism. *Food Biotechnology*, 52:7, 64-67.
- 28) Ho, C. H., Henderson, K. A. y Rorrer, G. (1995). Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnology Progress*, 11:140-145
- 29) Hurtado V., D. y Merino M., M. E. (1987). *Cultivo de tejidos vegetales*. México. Primera edición. Ed. Trillas, pp. 122-130.
- 30) Ingram, B. y Mavituna, F. (2000). Effect of bioreactor configuration on the growth and maturation of *Picea sitchensis* somatic embryo cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61:87-96.
- 31) Juárez Sánchez, M., Jiménez-Aparicio, A., Gutiérrez-López, G., Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. (2002). Broth rheology of *Beta vulgaris* cultures growing in an air lift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 12:37-41
- 32) Kieran, P., MacLoughlin P. y Malone, D. (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59:39-52.
- 33) Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M. Y Kohno, K. (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal*, 37:370-378.
- 34) Kulkarni, A., Ekambara, K. y Joshi, J. (2007). On the development of flow pattern in a bubble column reactor: Experiments and CFD. *Chemical Engineering Science*, 62:1049-1072.
- 35) Lee, J. M. (1992). *Biochemical Engineering*. First edition. Prentice Hall Inc., pp. 146-148, 170-174.

- 36) Martínez-Guillén, J. B., Oliver-Salvador, M. C. y García-Salas, S. (2006). Desempeño de un biorreactor neumático para producción de enzimas proteolíticas por cultivo de células vegetales. IV Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica.
- 37) Mello, V., Gomes, M., Lemos, F., Delfino, J., Andrade, S., Lopes, M. y Salas, C. (2007). The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*, 15:237-244.
- 38) Montaña-Herrera, L. (2007). Producción de enzimas proteolíticas y compuestos antioxidantes en cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* con un inductor. Reporte de proyecto Terminal. UPIBI-IPN. México.
- 39) Nielsen, J. y Villadsen, J. (1994). *Bioreaction Engineering Principles*. Ed. Plenum Press, p. 456
- 40) 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: Process Intensification*, 47:842-851.
- 41) Oliver, M. C. (1999). Purificación, caracterización y cristalización de la proteinasa cisteínica del látex del *Pileus mexicanus*: mexicanaína. Tesis de Doctorado. ENCB-IPN.
- 42) Oliver-Salvador, M. C., Barrera-Badillo, G., Martínez-Guillén, J. B., Briones-Martínez, R. y Cortes-Vázquez, M. I. (2005). Proteases from cell culture of *Jacaratia mexicana*. 30TH FEBS Congress and 9Th IUBMB Conference, Budapest, 2-7 July.
- 43) Ortega, M. L. y del Castillo, L. M. (1966). Actividad de la mexicanaína en presencia de altas concentraciones de urea. *Ciencia México*, 24:247-251.
- 44) Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. y del Río, L. A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8):521-530.
- 45) Palme, K. y Galweiler, L. (1999). PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:375-381.
- 46) Pan, Z. W., Wang, H. Q. y Zhong, J. J. (2000). Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:714-723.

- 47) Pérez, E. M., Ramírez, R. M. y Núñez, H. G. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Primera edición. Ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- 48) Pierik, R. (1990). Multiplicación *in vitro* de las plantas superiores. España. Ediciones Mundi-Prensa.
- 49) Rodríguez-Monroy, M. y Galindo, E. (1999). Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme and Microbial Technology*, 24:687-693.
- 50) Rodríguez-Monroy, M. y Galindo, E. (2003). Las células vegetales, ¿frágiles para crecer en biorreactores? *Biotecnología*, 8: 6-17.
- 51) Romero-Castilla, J., Oliver, M. C., Cruz, M. T., Castañeda-Agulló M. y del Castillo, L. M. (1976). Proteinases de plantas mexicanas VI. Efecto del pH, la temperatura y reductores en la estabilidad de la mexicana. *Revista Latinoamericana de Química*, 7:137-141.
- 52) Sajc, L., Grubisic, D. y Vunjak-Novakovic, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 4:89-99.
- 53) Sánchez-Mirón, A., Cerón-García, M. C., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. y Chisti, Y. (2004). Mixing in bubble column and airlift reactors. *Chemical Engineering Research and Design*, 82:1367-1374.
- 54) Sánchez-Pérez, J. A., Rodríguez-Porcel, E. M., Casas-López, J. L., Fernández-Sevilla, J. M. y Chisti, Y. (2006). Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 124:1-5.
- 55) Scragg, A. H., Allan, E. J. y Leckie, F. (1988) Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme Microbial and Technology*, 10:361-367.
- 56) Sheokand, S., Dahiya, P. y Brewin, N. J. (2005). Modified expression of cysteine protease affects seed germination, vegetative growth and nodule development in transgenic lines of *Medicago truncatula*. *Plant Science*, 169:966-975.
- 57) Shuler, M. L. y Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering, Basic Concepts*. Second Edition, Prentice Hall, USA. pp. 405-413.

- 58)Smith, S. M. y H. E. Street (1992). The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Annals of Botany*, 38:223-241.
- 59)Solomon, M., Belenghi, B., Delledone, M., Menachen, E., y Levine, A. (1999). The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 11:431-443.
- 60)Sylvester, W. A. (2000). Division decisions and the spatial regulation of cytokinesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 3:58-66.
- 61)Topete, M., Torres, L. G., Ramírez, M. E., Herrera, M. y Galindo, E. (1991). Avances en los sistemas de cultivo masivos de células vegetales. *Ciencia y Desarrollo*, Vol. XVIII. 99:73-96.
- 62)Trejo-Tapia, G., Jiménez-Aparicio, A., Villareal, L. y Rodríguez-Monroy, M. (2001). Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. *Biotechnology Letters*, 23:1943-1946.
- 63)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.
- 64)Van Handel, E. (1967). Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry*, 22:280-283
- 65)van't Riet, K. y Tramper, J. (1991). *Basic bioreactor design*. First edition. Marcel Dekker, Inc., pp. 114, 196-204.
- 66)Villalobos, V. M. (1990). Historia del cultivo de tejidos vegetales. En: *Fundamentos Teórico Práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales*. FAO. pp. 3-7.
- 67)Wisniewski, K. y Zagdanska, B. (2001). Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *Journal of Experimental Botany*, 52(360):1455-1463.
- 68)Whitaker, J. R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. Second edition. Marcel Dekker, Inc.
- 69)Wild, J., Poncin, S., Huai-Zhi, L. y Olmos, E. (2003). Some aspects of the hydrodynamics of bubble columns. *International Journal of Chemical Reaction Engineering*, 7:1-38.

70) Zagdanska, B. y Wisniewski, K. (1996). Endoproteinase activities in wheat leaves upon water deficit. *Acta Biochimica Polonica*; 43:515-519.

10 ANEXOS

Anexo 1. Composición de medios de cultivo

Medio de Knop

Reactivo	g/L
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	0.2
KNO ₃	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
CaNO ₃ · 4H ₂ O	0.8
Agar	6.0
pH	5.5

Medio de Murahige y Skoog

Reactivo	g/L	mL/L
Sacarosa	20	-
Mioinositol	0.1	-
Agar noble	6.0	-
Vitaminas	-	1.0
Micronutrientes ⁽¹⁾	-	100.0
Macronutrientes ⁽²⁾	-	100.0
pH	5.6	

1)Macronutrientes

Reactivos	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·H ₂ O	440
MgSO ₄ ·2H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	85

2)Micronutrientes

Reactivos	mg/L
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.6
NaMoO ₅ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2
FeSO ₂ ·7H ₂ 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: NaCl 8.75g/L, Na₂HPO₄ 2.25g/L, KH₂PO₄ 0.2g/L, KCl 0.2g/L a pH 7.2 - 7.3).

Reactivo de Bradford

Azul brillante de Coomassie G-25.....	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 disuelven en 50mL de etanol al 95%. A esta solución se le añaden 100 mL de ácido fosfórico al 85% (w/v). La solución resultante se afora 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

Reactivo de Antrona

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

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

Antibiótico

Claforan inyectable sin lidocaína.....120 µL/300 mL de medio de cultivo

Por cada litro de medio de cultivo adicionar 100 mg de antibiótico.

Antimicótico

Ácido bórico.....0.05 % (p/v)

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

Anexo 3. Curvas tipo

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

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

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

BSA 200 µg/mL (mL)	0	0.05	0.1	0.15	0.20	0.25
Agua destilada (mL)	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.0
Reactivo de Bradford (mL)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Concentración de BSA (µg/mL)	0	10	20	30	40	50

Después de cinco minutos de agregado el reactivo de Bradford, leer la absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteína contenida en las muestras es determinada interpolando la absorbancia en la curva tipo elaborada con la albúmina de suero bovino (BSA).

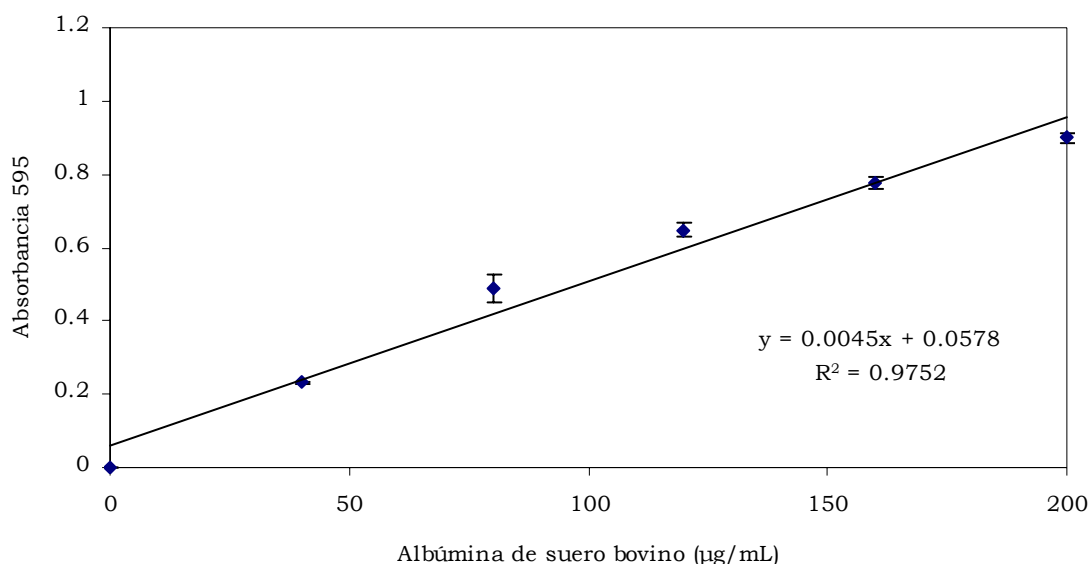


Figura 21. Curva tipo de proteína por el método de Bradford.

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

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

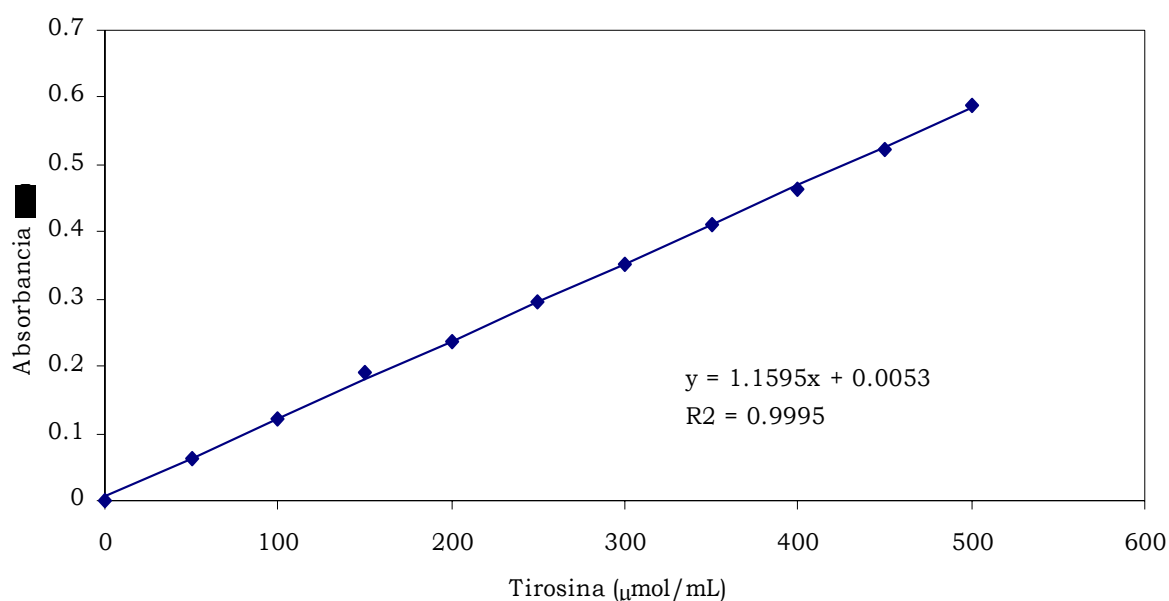


Figura 22. Curva tipo de tirosina.

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

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

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

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

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

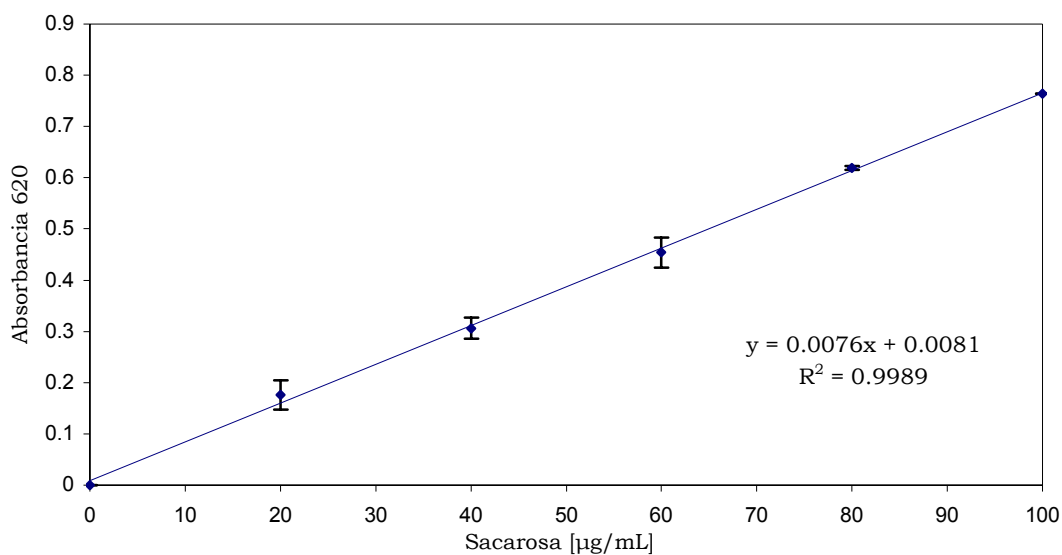


Figura 23. Curva tipo de sacarosa por el método de la antrona.