

PROTEASAS A PARTIR DE CULTIVOS *IN VITRO* DE *Jacaratia mexicana*

¹María del Carmen Oliver Salvador, Jesús A. Badillo Corona, Abimael Cruz Migoni y Claudio Garibay Orijel ²José Luis Muñoz Sánchez y Angélica Rodríguez.

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, ²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Av. Acueducto s/n, Ticomán. 07340 México, D.F. E-mail coliver@acei.upibi.ipn.mx

Palabras clave: Cultivo de células, *Jacaratia mexicana*, Proteasa cisteínica.

Introducción. Las enzimas proteolíticas o proteasas, presentan una gran diversidad de funciones fisiológicas en los organismos vivos, por lo cual tienen un gran interés científico e industrial. Ocupan un 60% del mercado mundial de las enzimas y sus aplicaciones son variadas. La industria alimentaria prefiere el uso de las proteasas de origen vegetal, por el hecho de obtenerse de fuentes vegetales comestibles, lo cual asegura que no presentan riesgos de toxicidad, como la papaína de *Carica papaya*. En general las plantas de la familia *Caricaceae* producen cantidades apreciables de enzimas proteolíticas, tal es el caso de la *J. mexicana* de cuyo látex fue aislada la mexicana, proteasa cisteínica, esta planta crece silvestre en las regiones subtropicales de nuestro país. Estudios comparativos sobre aplicaciones industriales de la denominada mexicana, donde es utilizada la papaína, demostraron que ésta puede competir favorablemente³. Dado que esta planta no ha sido domesticada completamente se propone como una fuente alternativa para la producción de proteasas el cultivo de células vegetales.

El objetivo de este trabajo es el establecer un protocolo para optimizar el cultivo de callos celulares de *J. mexicana*, utilizando diversas estrategias para este fin y se presentan resultados preliminares de la producción de proteasas en estos cultivos.

Metodología. Se germinaron semillas de *J. mexicana* en medio de Knop con 0.5% de agar. Se indujo indiferenciación celular en medio de Murashige & Skoog (MS)¹ solidificado con 0.8% de agar, con 2% de sacarosa, a un pH de 5.7 y con hormonas, se probaron varias combinaciones de auxinas y de citocininas y diferentes concentraciones de dichas hormonas: BAP (0.5 mg/l), cinetina (0.5 y 0.25 mg/l), la concentración de auxinas (1.0 mg/l) de 2,4-D, AIA y ANA y Picloram (1.0 y 5.0 mg/l) a partir de cortes del meristemo apical del tallo, hojas y raíz de la planta. Las condiciones del cultivo de callos fueron: 24–26°C, iluminación fluorescente constante o con fotoperíodo de 16 horas luz. La actividad proteolítica de los callos y del medio de cultivo donde crecieron los callos se determinó por el método de Kunitz modificado por Ortega y del Castillo³. Se determinó el porcentaje de germinación de las semillas.

Resultados y discusión. El estudio comparativo del efecto de las hormonas usando el medio de cultivo MS, en la formación de los callos, mostró que en aproximadamente 10 días hay la inducción de callos con BAP (0.5 mg/l) y 2,4-D (1.0 mg/l) lo mismo con cinética (0.5 mg/l) y 2,4-D (1.0 mg/l) en cortes de meristemo y de tallos, las hojas no presentaron formación de callo. Al determinar la producción de proteasas en los callos cultivados de 20 a 30 días de edad, se observó que los que presentaron mayor actividad proteolítica fueron los cultivados en medio MS adicionado con cinetina (0.1 mg/l) y picloram (0.5 mg/l) ver Tabla 1. Asimismo, también se encontró actividad proteolítica en los medios donde crecieron estos callos, lo que indica que las proteasas son excretadas al medio.

Tabla 1. Actividad proteolítica de callos de *J. mexicana*.

Medio	Hormonas mg/l	A280 nm/g* x h	UT
MS	P (1.0)	4.1 ± 0.61	646
MS	C (0.1) + P (5.0)	10.9 ± 0.30	1721

* peso fresco de células. C, cinetina; P, picloram; D, 2,4-D. UT= µg de tirosina liberados/ g de células x h.

Método de Kunitz mod: Caseína al 1% en fosfatos 50 mM pH 7.6, 35°C

Conclusiones. Se logró inducir la formación de callos de *J. mexicana*, los que producen proteasas extracelulares.

Agradecimientos. A los investigadores del CEPROBI-IPN Ma. Isabel Cortés V. y Roberto Briones M. por proporcionarnos las semillas de *J. mexicana*.

Referencias.

1. Murashige T. & Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth to bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **15**, 473-479.
2. Ortega M.L. del Castillo L.M. 1966. Actividad de la mexicana en presencia de urea. *Ciencia Mex.* **24**, 247-250.
3. Briones *et al.* (1994). Preparaciones enzimáticas de interés industrial. *Información Tecnológica* (Chile), **5(1)**, 57-62.