



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**INMOVILIZACION DE CELULAS DE Capsicum
chinense PARA LA PRODUCCION DE
CAPSAICINOIDES**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A N :
SANJUANA ARELLANO MARTINEZ
BERNARDA GARCIA OCON**

1 9 9 0



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MEDITA, RECAPACITA, PERO EN TUS
ANSIAS DE SABER CUIDATE DE LOS
ENMARANADOS BRENALES DE LAS
PALABRAS. (H. Hesse)

CUANDO TIENDAS LA VIDA A LOS DIVERSOS
RUMBOS DEL COSMOS, Y TU ESFUERZO PROPIO
SEA COMO POTENTE MICROSCOPIO
QUE VA HOLLANDO INVISIBLES UNIVERSOS,
ENTONCES SENTIRAS EN LA INMENSA
MUCHEDUMBRE DE SERES Y DE COSAS
A TU SER MISMO;
SERAS TODO PAVOR CON EL ABISMO Y SERAS
TODO ORGULLO CON LA CUMBRE
(E. González).

A MI MADRE

Con todo el respeto que me inspiran las personas que como tú, son capaces de enfrentar la vida con una sonrisa y que ante las adversidades muestran esa fortaleza que solo pocos seres humanos poseen. Gracias por el apoyo, la confianza y el amor que me has brindado, pero sobre todo por inculcarme la fe en los seres humanos y el amor a la vida.

A todos aquellos que no se conforman con vivir, sino que buscan una verdad capaz de satisfacer su espíritu.

SANJUANA

CON CARINO, AGRADECIMIENTO Y
PROFUNDO RESPETO POR LA CONFIANZA
Y APOYO QUE SIEMPRE ME HAN DADO

A MI MADRE

Sra. Manuela Ocón Vda. de Garcia

A MI HERMANA

Matilde Garcia Ocón

CON AMOR POR LAS ENSEÑANZAS
RECIBIDAS Y EL APOYO BRINDADO

A MIS HERMANOS

Jesus

Juan

Lidia

y

Gloria

A LA MEMORIA DE

MI PADRE

Juan Garcia Ocón

Y

MI TIO

Francisco Ocón Rabelo

BERNARDA

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del I.P.N. bajo la dirección de la M. C. Ma del Carmen Montes Horcasitas. De igual manera, agradezco al M. C. Carlos Arias y la M. C. Ana Carmela Ramos Valdivia por su asesoría e interés en el trabajo.

AGRADECIMIENTOS

- Al M. C. Carlos Arias Castro y la M. C. Martha Rodriguez, a quienes agradecemos sus enseñanzas, amistad y estímulo que nos brindaron siempre.
- A la M. C. Ana Carmela Ramos Valdivia por sus enseñanzas y valiosos consejos.
- A la Q.F.B. Elvira Rios Leal por su valiosa ayuda en la cuantificación de los capsaicinoides.
- Al M. C. Graciano Calva Calva por su valioso apoyo durante la realización de este trabajo.
- Al Dr. Ignacio Magaña Plaza por sus sugerencias y apoyo con el equipo de laboratorio.
- Al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, por su apoyo económico durante la realización del presente trabajo.
- A la Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV-IPN.
- A nuestros amigos, especialmente a aquellos que de alguna forma hicieron posible nuestra superación.

INDICE

	Pag.
I. RESUMEN.....	2
II. INTRODUCCION.....	3
III. OBJETIVO.....	5
IV. ANTECEDENTES.....	6
4.1. OBTENCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR CULTIVO DE CELULAS VEGETALES.....	6
4.2. EL GENERO <i>Capsicum</i>	11
4.2.1. USO DE LOS CAPSAICINOIDES.....	12
4.2.2. BIOSINTESIS DE CAPSAICINOIDES EN EL FRUTO....	15
4.2.3. OBTENCION DE LOS CAPSAICINOIDES.....	15
4.3. INMOVILIZACION DE CELULAS VEGETALES.....	17
4.4. METODOS DE INMOVILIZACION.....	19
4.5. SOPORTES UTILIZADOS EN LA INMOVILIZACION DE CELU- LAS VEGETALES.....	20
4.5.1. SOPORTES UTILIZADOS EN LA INMOVILIZACION DE CELULAS DE <i>C. chinense</i>	27
V. MATERIALES Y METODOS.....	29
5.1. CULTIVOS DE CELULAS.....	29
5.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	29
5.3. SOPORTES Y REACTIVOS.....	29
5.4. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO.....	31
5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
5.6. INMOVILIZACION DE CELULAS DE <i>C. chinense</i> EN LOS DIFERENTES SOPORTES.....	31
5.6.1. ESPUMA DE POLIURETANO.....	31
5.6.2. ALGINATO DE SODIO.....	33
5.6.3. ACIDO POLIGALACTURONICO.....	38

5.6.4. QUITOSANA.....	40
5.7. EFECTO DEL TIEMPO DE CURACION SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CELULAS INMOVILIZADAS.....	40
5.7.1. VIABILIDAD CELULAR.....	40
5.7.2. DISOLUCION DE ESFERULAS PARA LA OBTENCION DE CELULAS LIBRES.....	41
5.8. EVALUACION DE CAPSAICINOIDES.....	43
5.8.1. PESO DE LAS CELULAS.....	43
5.8.2. EFECTO DEL CaCl_2 Y LA CONCENTRACION DE CE- LULAS SOBRE LA PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES..	43
5.8.3. CULTIVO DE CELULAS INMOVILIZADAS.....	44
5.8.3.1. ALGINATO DE SODIO Y ACIDO POLIGALACTURONICO.....	44
5.8.3.2. ESPUMA DE POLIURETANO.....	44
5.8.4. EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE CAPSAICINOIDES.	44
VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....	46
6.1. INMOVILIZACION EN ESPUMA DE POLIURETANO.....	46
6.2. INMOVILIZACION EN ALGINATO DE SODIO Y ACIDO POLIGALACTURONICO.....	50
6.2.1. EFECTO DEL TIEMPO DE CURACION.....	52
6.2.2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CaCl_2	56
6.2.3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CELULAS.....	59
6.3. INMOVILIZACION EN QUITOSANA.....	65
6.4. ENSAYOS PRELIMINARES PARA LA PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES POR CELULAS INMOVILIZADAS DE <i>C. chinense</i>	69
VII. CONCLUSIONES.....	81
VIII. SUGERENCIAS.....	83
IX. APENDICE.....	84
X. BIBLIOGRAFIA.....	85

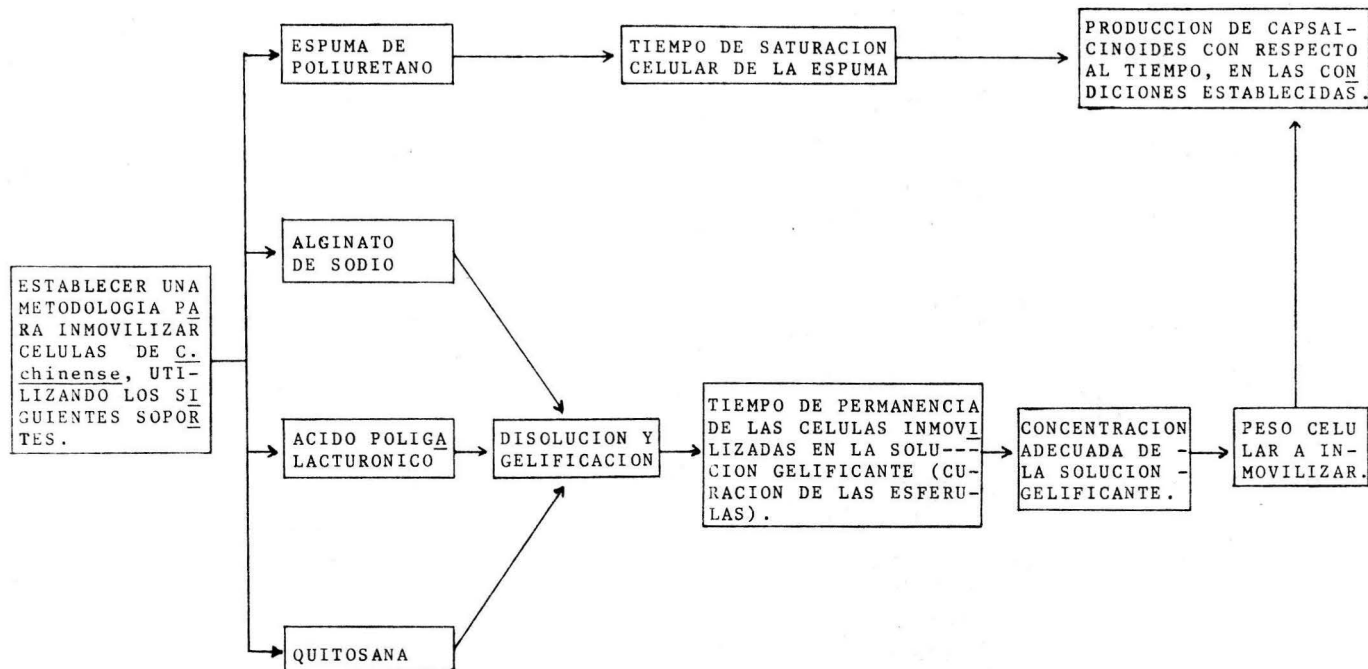


DIAGRAMA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL EN LA INMOVILIZACION DE CELULAS DE Capsicum chinense.

I. RESUMEN

Se estudiaron las condiciones de inmovilización de las células de Capsicum chinense, en espuma de poliuretano, alginato de sodio, ácido poligalacturónico (APG), y quitosana.

La inmovilización en espuma de poliuretano, se hizo utilizando cultivos homogéneos (células dispersas) y heterogéneos (agregados celulares de hasta 3 mm de diámetro). Estos últimos, mostraron un atrapamiento más rápido y estable dentro de la espuma.

Las condiciones más adecuadas de inmovilización en Alginato de sodio y APG (2% y 4% p/v, respectivamente), se obtuvieron empleando una concentración de CaCl_2 de 0.15 M como solución precipitante y utilizando 2.0 g y 1.0 g (peso fresco) de células.

Por otro lado, ensayos preliminares con Quitosana mostraron que este polímero, provocó la muerte celular, por lo que se descartó su uso en el proceso de inmovilización.

Una vez establecidas las condiciones de atrapamiento para cada polímero, las células inmovilizadas preservaron su viabilidad y fueron capaces de producir capsaicinoides, cuando se mantuvieron en medio MS1 adicionado con 2,4-D 12.5×10^{-3} M por un período de 28 a 30 días, obteniéndose la mayor cantidad de capsaicinoides en células inmovilizadas en APG, con respecto a los otros polímeros y células libres.

II. INTRODUCCION

Los vegetales contienen un grupo de compuestos complejos denominados metabolitos secundarios, que son utilizados con diversos fines en la industria farmacéutica, alimentaria y de agroquímicos, adquiriendo, por ello, gran relevancia e interés comercial en las últimas décadas (1).

Entre estos metabolitos se encuentran los capsaicinoides, formados por la capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina, nordihidrocapsaicina y homodihidrocapsaicina, sustancias responsables del picor del chile.

Los capsaicinoides son producidos en el fruto del género *Capsicum*, nombre que se deriva del griego "kapsa" que significa picor (2). El grado de picor de este fruto varía de una especie a otra, pudiéndose encontrar entre los más picosos a *Capsicum annuum* var *annuum* (piquines) y *Capsicum chinense* (habanero) (3).

Los frutos de *Capsicum* se emplean ampliamente en la industria alimentaria en forma de oleorresina, la cual contiene, además de los capsaicinoides, aceites, celulosas, pentosas, minerales, y carotenos (4). Su uso principal es como saborizante en la elaboración de geles y alimentos procesados como jamón y salchichas. También es usado en la industria farmacéutica como un relajante muscular y/o en casos de lumbago y neurálgia.

En México, a pesar de ser el principal país productor de Chile, la oleorresina es un producto de importación que está sujeta a problemas de enraciamiento, debido a la presencia de los aceites procedentes de semillas, que son molidas junto con los frutos; los problemas propios de la importación, como costos y permisos, así como dificultades en la cosecha por cambios

climáticos, plagas, sequías, etc.

Estas razones, llevaron a la exploración de algunas vías alternas, que permitieran la obtención de capsaicinoides en forma pura. Entre las vías exploradas se encuentran la síntesis química y la producción por cultivo de tejidos.

Respecto a la síntesis química, ésta no es de gran utilidad, debido a que se trata de un proceso muy costoso que involucra una serie de pasos, que dan como resultado la obtención de una mezcla de isómeros con propiedades de picor diferentes a la de los capsaicinoides naturales (5).

En la actualidad, mediante las técnicas de cultivo de células vegetales, los capsaicinoides pueden producirse a partir de callos y células en suspensión, en donde es posible aumentar la producción manipulando el medio de cultivo, usando biorreactores, o bien, utilizando sistemas de células inmovilizadas (6, 7).

A partir de 1979, los sistemas inmovilizados han recibido mayor atención debido a las ventajas que presentan, como el poder elevar los niveles de producción con respecto a las células en suspensión y la reutilización de la biomasa, sin que se presenten variaciones de tipo genético, ya que este proceso limita la división celular. Sin embargo, también se presentan algunos problemas debidos al tamaño de las células y a su sensibilidad a las fuerzas de corte, por lo que es necesario el estudio de soportes adecuados que permitan protegerlas de las condiciones adversas, a las que son expuestas en el medio de cultivo.

III. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es el de ESTABLECER UNA METODOLOGIA PARA INMOVILIZAR CELULAS DE *C. chinense*, QUE PERMITA PRESERVAR LA VIABILIDAD CELULAR Y LA OBTENCION DE CAPSAICINOIDES, UTILIZANDO DIFERENTES SOPORTES, ASI COMO CONTRIBUIR AL CONOCIMIENTO DE ESTAS NUEVAS TECNOLOGIAS.

IV. ANTECEDENTES

4.1. OBTENCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR CULTIVO DE CELULAS VEGETALES

Las plantas poseen una gran versatilidad en sus mecanismos biosintéticos, descubriéndose alrededor de 1500 compuestos nuevos por año, de los cuales, más del 30% presentan algún grado de actividad biológica, destacándose entre ellos los metabolitos secundarios, de los cuales los de mayor uso industrial son: aceites esenciales, glicósidos y alcaloides, (tabla 1). Aunque no se sabe el papel exacto de estos metabolitos, en los vegetales, se consideran como sustancias que cumplen una función ecológica, ya sea de adaptación, defensa y/o polinización (8, 9, 10, 11). Estos compuestos son acumulados en la planta en cantidades pequeñas, y tienden a ser sintetizados en grupos taxonómicos particulares (especies, géneros o familias), en tipos celulares especializados y en estados de desarrollo específicos de la planta. Estas, entre otras razones, han llevado al desarrollo de técnicas que facilitan la obtención de estos productos *in vitro*. Entre las alternativas usadas se encuentra la técnica de cultivo de tejidos vegetales, que se refiere al cultivo de cualquier órgano, tejido o célula de la planta, bajo condiciones asépticas y controladas. Este tipo de cultivo sigue una serie de principios básicos que consideran la característica totipotencial de la célula vegetal, de conservar todo su mensaje y estructura genética original (12).

El uso de estas células en la producción de metabolitos, se considera como una alternativa biotecnológica y de solución a los problemas que enfrenta la obtención de compuestos secundarios en

✓ Tabla 1. METABOLITOS SECUNDARIOS DE MAYOR USO INDUSTRIAL

METABOLITOS SECUNDARIOS	COMPOSICION	USOS
Aceites esenciales	Mezcla de terpenoides	Agentes saborizantes, - Perfumes y Solventes.
Glicósidos	Flavonoides, Saponinas, Fenoles, Taninos, Glicósidos cianogénicos y -- Aceites de mostaza.	Tintes. Colorantes para ali-- mentos. Medicamentos (hormonas esteroidales, antibi <u>o</u> tics, etc.)
Alcaloides	Formado por un diverso grupo de compuestos de más de 4000 estructu-- ras conocidas. La mayo <u>r</u> ía son compuestos muy activos fisiol <u>o</u> gicamen <u>t</u> e en el humano. Algun <u>o</u> s ejemplos son: morfina, nicotina, cocai <u>n</u> a y tropina.	Medicamentos y/o dro <u>g</u> as.

Shuler, M. L. (13).

plantas completas, ya que su uso viene a asegurar: a) el suministro continuo de material vegetal homogéneo (estado fisiológico uniforme), b) la independencia del cultivo de las variaciones estacionales, cambios climáticos, plagas y enfermedades que, en la mayoría de los casos, afectan el estado fisiológico óptimo que el material vegetal requiere, hasta el momento de su procesamiento, c) la producción mejorada, a través de la selección de variantes altamente productoras, que pueden llevar a cabo la formación de nuevos productos por medio de la biotransformación d) la reducción del tiempo de producción del metabolito y e) el mantenimiento de los cultivos por períodos largos de tiempo, en espacios pequeños y adecuados (13, 14, 15).

Entre los diferentes sistemas de producción de metabolitos secundarios por cultivo de células vegetales, se encuentran los cultivos con callos, cultivos en suspensión y los cultivos de células inmovilizadas (1).

El sistema de cultivo con callos empieza inoculando un trozo de tejido vegetal en un medio semisólido (agar), que contiene los nutrientes necesarios para la sobrevivencia del inóculo, y el balance hormonal específico (auxinas-citocininas), para lograr una dediferenciación celular (pérdida de la especialización bioquímica y fenotípica celular) (12).

En los inicios, el callo se consideró como una fuente importante de metabolitos secundarios, sin embargo, el cultivo en suspensión, que es el cultivo de células provenientes de callo en un medio líquido, en el cual también se obtienen metabolitos secundarios, ha recibido mayor atención debido a que facilita la manipulación del cultivo en general y a que existe la posibilidad

de llevarlo a una escala de mayor producción (14).

Si bien la posibilidad de producción de estos metabolitos a gran escala, ha sido considerada como una alternativa desde hace 3 décadas, solo en los últimos años, un proceso de cultivo de células se ha comercializado con buen éxito. Esto se logró cuando la corporación japonesa "Mitsui Petrochemical Industries Ltd", empezó a producir shikonina por cultivo de células de Lithospermum erythrorhizon. Este metabolito es usado como colorante y/o medicamento con actividad antiinflamatoria y antibacteriana. El hecho de que solo exista un proceso a nivel comercial, se debe a los diferentes problemas de obtención que presentan los sistemas de cultivo de tejidos y células vegetales en suspensión. Algunos de estos problemas son: a) La productividad volumétrica del cultivo, ya que se requieren biorreactores de grandes dimensiones. b) La inestabilidad genética de las células, que no permite conservar líneas altamente productoras por períodos largos de tiempo. c) La sensibilidad celular a las fuerzas de corte, impide la selección de biorreactores convencionales para la producción (15).

Si bien en la práctica se obtienen buenos rendimientos de producción de muchos metabolitos secundarios por cultivo de células vegetales, solo en pocos casos la producción de los compuestos deseados se compara a la obtenida en plantas completas (tabla 2) (1). En la literatura, existen varios informes sobre algunos aspectos relacionados con la producción de metabolitos secundarios. Lindsey y Yeoman (16) observaron, en varias especies de Solanáceas en cultivos in vitro, una correlación inversa entre la velocidad de crecimiento y el

Tabla 2. OBTENCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON CULTIVOS DE CELULAS Y CON PLANTAS COMPLETAS.

COMPUESTO	ESPECIE	PRODUCCION	
		Cultivos celulares	Plantas completas
Antraquinonas	<u>Morinda citrifolia</u>	900 nmol.g ⁻¹ p.s.	Raiz, 110 nmol.g ⁻¹ p.s.
Antraquinonas	<u>Cassia tora</u>	0.334%p.f.	0.209%p.s. (semilla)
Ajmalicina Serpentina	<u>Catharanthus roseus</u>	1.34%p.s.	0.26%p.s.
Diosgenina	<u>Discorea deltoides</u>	26 mg.g ⁻¹ p.s.	20 mg.g ⁻¹ p.s.
Saponinas gin seng	<u>Panax ginseng</u>	0.38%p.f.	0.3 y 3.3%p.f.
Nicotina	<u>Nicotiana tabacum</u>	3.4%p.s.	2.5% p.s.
Thebaina	<u>Papaver bracteatum</u>	130 mg.g ⁻¹ p.s.	1400 mg.g ⁻¹ p.s. (hoja)
Ubiquinona	<u>Nicotiana tabacum</u>	0.5 mg.g ⁻¹ p.s.	16 mg.g ⁻¹ p.s.

Fowler, M. V. (1)

contenido de alcaloides por un lado, y una relación directa de éste último con la diferenciación celular por el otro. Resultados similares fueron obtenidos por Yeoman & col. en 1980 (14), Brown & Charlwood en 1986 (17) y Collinge & Yeoman en 1986 (18).

En contraste, células en suspensión de Catharanthus roseus con crecimiento rápido, mostraron una producción alta de alcaloides y una diferenciación morfológica pobre. Asimismo, cultivos celulares de tabaco y zanahoria, tuvieron un comportamiento similar (1).

Relacionando las observaciones presentadas en los diferentes estudios de metabolitos secundarios en células vegetales, se considera que en muchos casos, la producción de estos metabolitos es independiente del crecimiento y puede ser manipulada experimentalmente, alterando la división celular del cultivo, y aumentando la acumulación del producto en tejidos organizados. Estas observaciones y las dificultades que presenta el cultivo de células vegetales en suspensión para la síntesis de metabolitos, hace pensar en la necesidad de contar con un método que ayude a reducir la velocidad de crecimiento y simular condiciones de organización de estas células, permitiendo un mayor control del cultivo y un posible incremento en la producción de metabolitos deseados (19).

4.2 EL GENERO CAPSICUM

El género Capsicum pertenece a la familia Solanaceae, y agrupa de 20 a 30 especies originarias del área tropical de Sudamérica, América Central y las Islas de la región. Las especies silvestres

se encuentran, generalmente, creciendo en áreas no perturbadas, mientras que las cultivadas ocupan grandes extensiones de tierras de cultivo (20).

Las especies cultivadas son las más estudiadas y las que presentan mayores niveles de hibridación, no obstante, con el fin de simplificar su estudio, actualmente la FAO solo reconoce las siguientes especies domesticadas: Capsicum frutescens, C. chinense, C. annuum, C. pendulum y C. pubescens (21).

En México existe una gran variedad de chiles cultivados y silvestres con diferente forma, tamaño, color y picor, los cuales, en su mayoría, pertenecen a la especie de C. annuum (22). Estos frutos han sido utilizados principalmente en la alimentación, donde el color (carotenos), olor (aceites esenciales) y picor (capsaicinoides) son los factores que más han influido para su consumo (2).

4.2.1. Uso de los capsaicinoides

Los frutos del Capsicum contienen, entre otros compuestos, una mezcla compleja de amidas que se relacionan entre sí (capsaicinoides). Estas amidas, consideradas como el principio picante del chile, presentan en su estructura al ácido enoico, octanoico y decanoico de la vainilla (23).

La primera amida identificada fue la capsaicina, la cual, durante mucho tiempo, se consideró como el único compuesto responsable del picor (24). Posteriormente, la aplicación de técnicas de separación y cromatografía ayudaron a identificar esta mezcla, la cual está formada por los siguientes compuestos análogos: Capsaicina (C), Homocapsaicina (HC), Dihidrocapsaicina

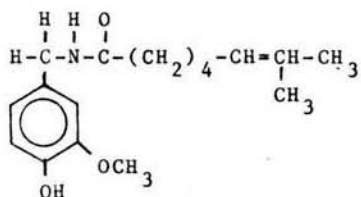
(DC), Nordihidrocapsaicina (NDC) y Homodihidrocapsaicina (HDC) (fig. 1).

Iwai y col. (25) consideran a la C y DC como los compuestos que mayor influencia tienen sobre el picor, pues juntos representan el 90% de los capsaicinoides totales, manteniendo una proporción de 2:1 ó 1:1 cuando el fruto alcanza la madurez.

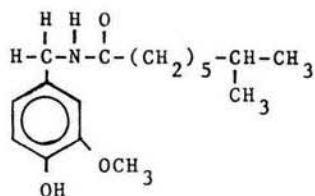
Estos compuestos se concentran principalmente en la placenta y septos del fruto, de donde se distribuyen a las zonas aledañas. Se considera que el grado de picor de la especie depende, tanto de factores genéticos como de aquellos factores ambientales a los que fue expuesta la planta, así como del grado de madurez del fruto, la parte que de él se considere y el manejo que se le dé después de la cosecha (26, 27).

En materia ecológica es poco lo que se sabe sobre la función de estos compuestos, no obstante se dan las siguientes explicaciones: 1) Resguarda a las semillas de depredadores, 2) Son productos de desecho, y 3) Sus efectos pueden ser similares a los de las alexinas (5).

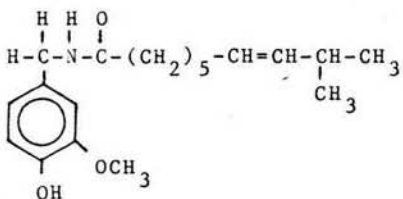
Los capsaicinoides son usados en la alimentación como saborizantes y condimento; y en fármacos como estimulantes internos y externos, que alivian molestias de reumatismo, lumbago y neurálgia (28, 29). Además se proponen como analgésicos locales en la extracción dental, debido a sus efectos sobre las neuronas sensoriales, y también para tratar condiciones de hipercolesterol, ya que estudios recientes revelaron que la capsaicina disminuye los niveles de colesterol en animales de laboratorio (30, 31). Estudios referentes a los efectos fisiológicos, causados por estos compuestos, pueden ampliar las



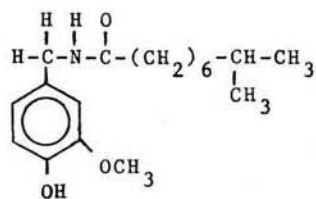
CAPSAICINOIDES (C)



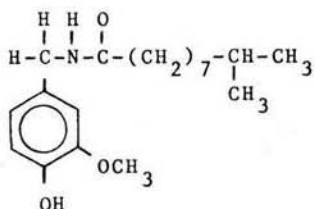
NORDIHIIDROCAPSAICINA (NDC)



HOMOCAPSAICINA (HC)



DIHIIDROCAPSAICINA (DHC)



HOMODIHIIDROCAPSAICINA (HDC)

Fig. 1. ESTRUCTURA QUIMICA Y NOMENCLATURA DE LA CAPSAICINA Y SUS ANALOGOS (5, 36).

posibilidades de su uso, en la medicina.

4.2.2. Biosíntesis de capsaicinoides en el fruto

La ruta biosintética que se muestra en la fig. 2, presenta dos vías que convergen en la producción de capsaicina y compuestos análogos (32, 33). Estudios más específicos muestran que los capsaicinoides son sintetizados en el interior del retículo endoplásmico por vía enzimática, a partir de vainillinamina y varios ácidos grasos. Estos compuestos, una vez producidos, tienden a acumularse en vesículas y vacuolas de las células epidermales como una mezcla lípido-capsaicinoide (34, 35, 36).

La excreción de estos compuestos por las vacuolas, ocurre cuando los capsaicinoides se han acumulado considerablemente, mientras que en el caso de las vesículas, éstas son expulsadas del citoplasma para fusionarse con el plasmalema (37).

4.2.3. Obtención de los Capsaicinoides

Los capsaicinoides son obtenidos de la purificación de un extracto líquido denominado oleorresina, la cual se extrae previamente de chiles secos deshidratados (2). La oleorresina es una mezcla compleja que contiene además del principio picante, grasas, pigmentos, pentosas, sales minerales y resinas, que dificultan y encarecen los procesos de purificación (4).

Actualmente, se están buscando alternativas que permitan la obtención de los capsaicinoides, sin los problemas antes mencionados. Entre éstas se encuentran la técnica de cultivo de tejidos y células vegetales.

Experimentos diseñados para determinar si la ruta

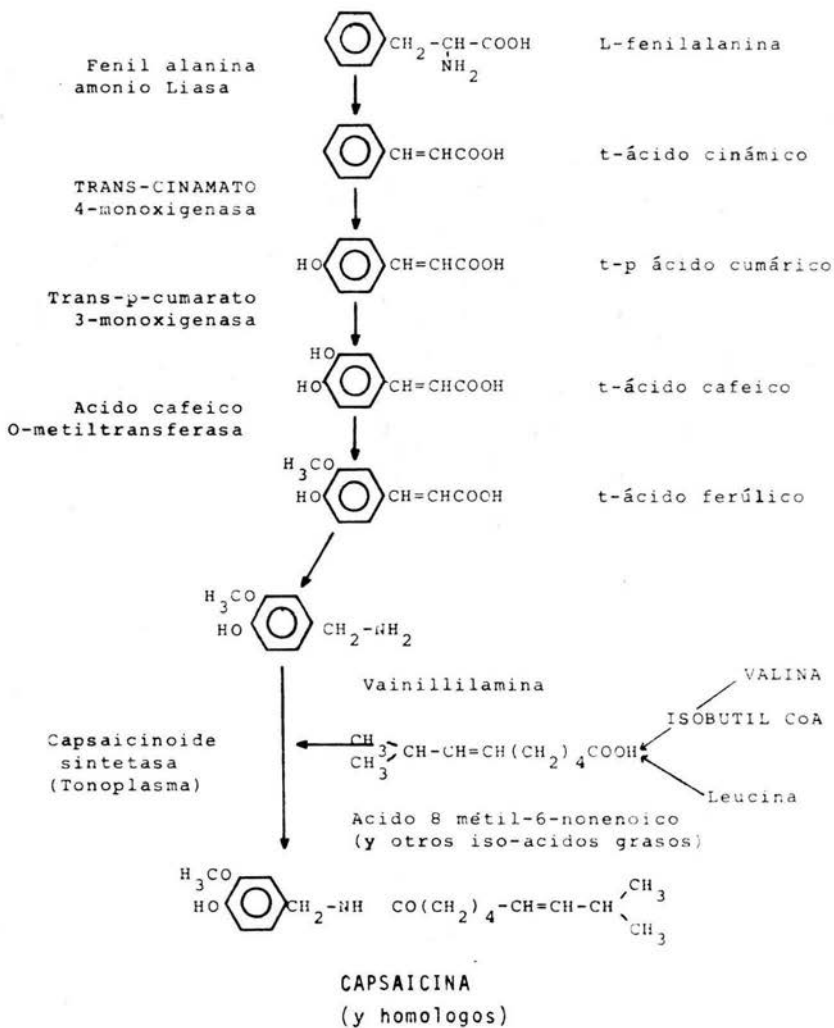


Fig. 2. VIA PROPUESTA PARA LA BIOSINTESIS DE VAINILLILAMINA Y CAPSAICINOIDES. (35).

biosintética puede ser expresada en callos y células en suspensión, han demostrado que los niveles de producción de capsaicinoides son más bajos en cultivos *in vitro* que en los frutos de la planta. No obstante, se observa que el mecanismo de excreción es el mismo *in vivo* e *in vitro* (16).

Los estudios para aumentar su producción están encaminados a manipular el medio de cultivo variando nutrientes esenciales (nitratos, fosfatos, carbono, etc.), condiciones de cultivo (pH, luz, temperatura, etc.) e incorporación de precursores (fenilalanina y ácido cinámico) (38, 39). Además, se ha visto que los niveles de producción de estos compuestos se ven incrementados al inmovilizar las células de *C. frutescens* en espuma de poliuretano (6,7).

Los trabajos encaminados a estudiar el efecto de la inmovilización sobre el metabolismo primario, y en consecuencia el secundario, mostraron que el promedio de síntesis de proteína en células inmovilizadas por un período de 5 días en medio Shenk-Hildrebrand, fue del 50% con respecto a las células libres en fase de crecimiento estacionaria, y el promedio de actividad respiratoria es similar en ambos cultivos (40).

Los resultados obtenidos en estos estudios mostraron que el sistema de inmovilización, incrementa la producción de capsaicinoides en células de *C. frutescens* en varios órdenes de magnitud, que el obtenido con células en suspensión.

4.3 INMOVILIZACION DE CELULAS VEGETALES

Se entiende como células inmovilizadas aquellas células confinadas físicamente en una región definida, con retención de

su actividad catalítica y si es posible o necesario su viabilidad, pudiéndose utilizar repetida y continuamente (41).

Las técnicas de inmovilización datan de 1916, al aplicarse primeramente a enzimas aisladas. El primer caso reportado de células completas inmovilizadas, aparece en 1966 con células de líquen (Umbilicaria postulata), atrapadas en gel de poliacrilamida. Desde entonces, una gran variedad de células, en su mayoría bacterianas son inmovilizadas en diferentes soportes (42). Posteriormente Kierstan y Bucke (43) inmovilizaron cloroplastos y mitocondrias de espinaca y aguacate, para estudiar la reacción de Hill y la síntesis de ATP, respectivamente.

Las primeras inmovilizaciones de células vegetales completas fueron realizada con éxito por Brodelius en 1979, utilizando células de Moringa citrifolia, para obtener antraquinonas por síntesis de "novo", células de Catharanthus roseus para la formación de indolalcaloides y células de Digitalis lanata para la biotransformación de digoxina (44). Posteriormente Schnabl & col. (45) y Bornman & Zachrisson (46) inmovilizaron protoplastos de Vicia faba en alginato de calcio y Datura innoxia en Cytodex 1, con el fin de medir viabilidad.

No obstante que la mayoría de los estudios con células vegetales inmovilizadas, están encaminados a investigar el efecto de la inmovilización sobre la viabilidad celular, existe gran interés en su aplicación para la producción de metabolitos secundarios a gran escala, ya que presentan las siguientes ventajas: 1) El tamaño de agregados celulares puede controlarse mejor. 2) Los efectos de las fuerzas de corte impuestos por el

movimiento del fluido, son eliminados, en su mayor parte, al proteger a las células con la matriz de inmovilización. 3) Los inhibidores metabólicos, causados por las modificaciones a que se someten las células, pueden ser liberados continuamente permitiendo la correcta expresión de las vías metabólicas. 4) Los problemas debidos a la inestabilidad genética, se pueden reducir. 5). El sistema permite la separación de la fase de crecimiento (antes de la inmovilización) y la fase de producción. 6) No hay crecimiento importante de las células y sin embargo éstas son metabólicamente activas, permaneciendo viables por largos periodos sin división celular. 7) Posibilidad de reusar el sistema inmovilizado, recuperando el producto del medio de cultivo con relativa facilidad. 8) Es posible conservar la viabilidad celular, y 9) Mayor estabilidad del proceso (47).

Las células vegetales son dirigidas para crecer en un estado multicelular (condición parcialmente organizada), manteniéndolas en un estado físico estacionario. Los gradientes físicos y químicos, así establecidos, simularán un ambiente muy semejante al encontrado en la situación *in vivo* (contacto célula-célula), por lo que ésta técnica facilita la manipulación de las células provenientes de los cultivos en suspensión y permite cierta diferenciación bioquímica de las mismas, lo cual, puede ser una condición asociada con el metabolismo secundario (47, 48).

4.4 METODOS DE INMOVILIZACION

La sensibilidad de las células vegetales a las fuerzas mecánicas (causada por el tamaño de la célula), al "stress" osmótico y nutricional, a la temperatura, pH, tensión de O_2 y a

agentes químicos, limitan significativamente la selección del método de inmovilización.

Los principales métodos de inmovilización son: atrapamiento, adsorción y acoplamiento (tabla 3) (49, 50).

La técnica de atrapamiento es la más utilizada para inmovilizar células vegetales, y su auge se debe a que la estructura del soporte, difícilmente origina cambios directos en la funcionalidad de una célula o enzima. Además se trata de un método suave, donde la red polimérica que se forma, protege a las células vegetales de las fuerzas mecánicas de corte y/o roce (51, 52).

Los métodos de atrapamiento se clasifican en cuatro grupos principales y sus mecanismos de formación se encuentran en la tabla 4 (53, 54).

La técnica de adsorción (tabla 3) también es usada con éxito en células vegetales, debido a su simplicidad y rapidez, aunque puede dañar la viabilidad celular, por lo que es necesario tener ciertas precauciones.

El método menos utilizado, es el de acoplamiento, debido a los efectos perjudiciales que causan los agentes acoplantes en las células, por lo que no se considera adecuado para inmovilizar células vegetales.

4.5 SOPORTES UTILIZADOS EN LA INMOVILIZACION DE CELULAS VEGETALES.

Uno de los criterios para la elección de un buen soporte, es que éste sea inerte y que permita conservar la viabilidad celular (55). Los soportes más utilizados para la inmovilización de células vegetales, ya han sido estudiados por algunos autores.

Tabla 3. TECNICAS GENERALES DE INMOVILIZACION

METODO DE INMOVILIZACION	SOPORTES Y AGENTES ACOPLANTES	MECANISMOS	LIMITACIONES
ADSORCION	Madera Cerámica Vidrio poroso Celulosa Carbón	Interacciones --- electrostáticas - entre el acarreador y la superficie celular.	Edad de la célula. Dependencia del -- pH.
ATRAPAMIENTO	Agar Alginato Pectato Carragenina Poliuretano Plástico Acrilamida	Atrapamiento físico.	Difusión del sustrato y del producto. Destrucción del -- gel por fosfato.
ACOPLAMIENTO	Isocianato Glutaraldehído Carbodiimida	Formación de uniones covalentes.	Toxicidad.

Adaptado de Kolot, B. F. (49).

Tabla 4. SOPORTES UTILIZADOS PARA INMOVILIZAR CELULAS VEGETALES POR ATRAPAMIENTO.

POLIMERO	FORMACION DEL GEL
1. Formación del gel mediante entrecruzamiento iónico (ionotrópico).	
Alginato	Enlace iónico (Ca^{++} 0.1 M).
Carragenina	Calentamiento ($50^{\circ}C - 20^{\circ}C$) + Enlace iónico ($K^{+}0.3$ M).
Quitosana	Enlace con iones multivalentes
Ac. poligalacturónico	Enlace iónico (Ca^{++})
2. Formación del gel por calentamiento , y enfriamiento posterior. (térmico).	
Agar	Calentamiento ($50^{\circ}C - 20^{\circ}C$).
Agarosa	Calentamiento ($40^{\circ}C - 20^{\circ}C$).
3. Formación del gel por medio de una reacción química (polimerización).	
Gelatina	Enlace químico (glutaraldehído al 1%).
Poliacrilamida-hidratada (PAAH-G).	Glioxal como agente enlazante.
Polifenilenoóxido	Polimerización con glutaraldehído al 5%.
Alginato + Gelatina	Enlace iónico (Ca^{++} 0.1 M) + Enlace químico (glutaraldehído al 1%).
4. Atrapamiento físico, dentro de una matriz porosa (absorción).	
Poliuretano	Espuma.
Nylon	Malla.
Fibra hueca	Sistema de membrana

Adaptado de Morris, P. y col. (53) & Brodelius, P. (54).

como puede verse en la tabla 5.

La magnitud del daño causado por el soporte sobre la viabilidad de las células vegetales, se debe a que los geles que se forman en medio ionotrópico y térmico, no afectan la viabilidad de éstas, mientras que los que se forman por medio de una reacción química si la afectan (54).

Del primer grupo, el alginato de sodio es el más utilizado debido a la facilidad en su manejo y a su disponibilidad a nivel mundial. Es un polisacárido que forma parte de la pared celular de algas marinas pardas (*Myrocystis pyrifera* L., *Laminaria hyperborea* L. y *Ascophyllum medusum* L.) y forma geles con soluciones ácidas o en presencia de calcio y otros cationes metálicos polivalentes, formando una malla a través de los iones calcio o hidrógeno, o por una combinación de los dos (55, 56). En los trabajos de células inmovilizadas en este soporte, se ha observado que se obtienen cantidades mayores de metabolitos secundarios, en comparación con la obtenida con los demás soportes, debido, quizá, a un mecanismo inhibitorio de éstos sobre las células vegetales, posiblemente debido al efecto de la temperatura de gelación utilizada (55, 57, 58).

Otro soporte utilizado para atrapar células vegetales es la quitosana, un polímero que empieza a tomar auge debido a que tiene mayor estabilidad que el alginato. Al parecer no afecta la viabilidad y es de bajo precio en el mercado, además incrementa la permeabilidad de la célula, facilitando así la excreción de algunos productos secundarios que no son liberados al medio (59).

La quitosana se deriva de la quitina, que es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza y el más ampliamente

Tabla 5. EFECTO DE LOS DIFERENTES POLIMEROS SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CELULAS VEGETALES INMOVILIZADAS.

TIPO DE SOPORTE	VIABILIDAD CELULAR				ESPECIE VEGETAL	USO
	A	B	C	D		
Alginato	+	+	+	+	<u>Catharanthus roseus</u>	Síntesis de novo de alcaloides. Biotransformación de - alcaloides.
					<u>Papaver somniferum</u>	
Kapa-carragenina	+	+	+	+	<u>Catharanthus roseus</u>	Síntesis de novo de ajmalicina.
Agar	+	+	+	/	" "	Uso de precursores para la síntesis de ajmalicina.
Agarosa	+	+	+	/	" "	Síntesis de novo de ajmalicina.
Gelatina	+	-	-	/	" "	Sobrevivencia.
Poliacrilamida	-	-	-	-	" "	Sobrevivencia.
Espuma de poliuretano.	/	/	+	+	<u>Capsicum frutescens</u>	Síntesis de capsaicina.
Malla de nylon	/	/	+	+	<u>Beta vulgaris</u>	Síntesis de betacianinas.
Fibra hueca	/	/	/	/	<u>Glycina max</u>	Síntesis de fenoles.

A: Plasmólisis (+) Células viables.
 B: Respiración (-) Células no viables.
 C: Crecimiento celular
 D: Tinción con diacetato de fluoresceína.

Adaptado de Morris, P. y col. (53).

distribuido en el mundo. Las fuentes potenciales de quitina son los caparazones de langosta de mar, cangrejos y camarones. También se encuentran en cantidades significativas como constituyentes del micelio y esporas de muchos hongos.

Su sensibilidad a variaciones de pH y a fuerzas iónicas, es mayor que la de otros polisacáridos y es uno de los pocos polielectrolitos catiónicos, que provee una gran variedad de aplicaciones potenciales, debido a su particular comportamiento en solución (60).

Las aplicaciones potenciales de la quitosana son muchas, entre ellas, se encuentra el uso de los llamados glóbulos de quitosana en la encapsulación de células microbianas para la producción de enzimas y aminoácidos (61). Vorlop & Klein (59) y Rodriguez-Sanchez & Rha (62) proporcionan valiosa información sobre el uso potencial de este polímero en el atrapamiento de células vegetales por cultivo de tejidos. Sin embargo, existen pocos informes de la aplicación de quitosana para inmovilizar células vegetales, entre ellas está el de Knorr & Teutónico (63), quienes lograron inmovilizar células de *Amaranthus tricolor* en quitosana para obtener oxalato en cantidades significativas, mayores a las obtenidas con células libres.

En el segundo grupo (mecanismo térmico), el agar y la agarosa tampoco afectan la viabilidad celular, aunque la capacidad biosintética de las células es menor a la que presentan las células atrapadas en alginato de calcio. Esto se atribuye a que estos soportes permiten la división celular (51).

El atrapamiento en gelatina y poliacrilamida, soportes que pertenecen al tipo de gelación por reacción química, es poco

recomendado ya que el uso de agentes enlazantes como el glutaraldehído, afectan la respiración celular, aspecto que repercute enormemente en la capacidad biosintética de la célula (51). Sin embargo, aún cuando se recomienda no utilizar sustancias químicas como agentes enlazantes, Galum & col. (64) encontraron que las células de Mentha sp. atrapadas en poliacrilamida hidrazida (PAAG-H) y estabilizadas con glioxal, mostraron semejanza con la viabilidad celular obtenida en células libres.

Una vía alterna a las ya mencionadas, es la retención de células dentro de una matriz semirígida y altamente porosa, Rhodes & col. (65) usaron fibras de nylon y espuma de poliuretano reticulado, observando la existencia de una película delgada mucilaginoso, cubriendo las células atrapadas y la matriz. La importancia de ésta película para la retención de las células dentro de la matriz, es discutida por estos autores. Lindsey & col. (6,7,40) llevaron a cabo estudios de inmovilización de células de Capsicum frutescens, en espuma de poliuretano, encontrando que este material no afecta la viabilidad celular y permite obtener mayor producción de capsaicinoides que la que se logra con células libres.

Las células vegetales inmovilizadas en algunos soportes, muestran un incremento en la producción de ciertos compuestos naturales, con respecto a las células libres, lo cual indica que esta técnica tiene un futuro prometedor para la obtención a mayor escala de capsaicinoides así como de otros metabolitos secundarios, ya que las células retienen su capacidad biosintética, tanto por síntesis "de novo" (reacciones

enzimáticas secuenciales dentro de la célula, que tienen una fuente simple de carbono como precursor), como por la transformación de precursores con que se alimenta el cultivo, en la sustancia deseada (55).

4.5.1. Soportes utilizados en la inmovilización de células de C. chinense.

En este trabajo se eligieron cuatro polímeros, para establecer con ellos las condiciones de inmovilización más adecuadas de las células de C. chinense. Estos polímeros son: espuma de poliuretano, alginato de sodio, quitosana y ácido poligalacturónico.

-La espuma de poliuretano es considerada como un polímero durable en su uso con células vegetales, además de que preserva la viabilidad celular y facilita la manipulación de las células, disminuyendo la contaminación de los cultivos (40).

-El alginato de calcio es un gel que, a diferencia de la gelatina, el agar, y la carragenina, preserva con mayor eficiencia la viabilidad de las células vegetales, ya que su uso en la inmovilización no requiere la aplicación de temperaturas que dañen a las células (57).

-La quitosana, un polímero derivado de la quitina, se encuentra reportada en la literatura como un gel con gran uso potencial en la inmovilización de células vegetales, debido a que presenta mayor estabilidad que el alginato, por lo que consideramos de interés aplicarla en la inmovilización de células de C. chinense (63).

-El ácido poligalacturónico, que es un derivado de la pectina, es un polímero con características de gelación similares a las del alginato. Su uso en la inmovilización de bacterias y levaduras es muy reciente, y se ha venido utilizando en el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN, en el atrapamiento de células bacterianas para la transformación de esteroides y la producción de etanol, por lo que en este trabajo se propone como un polímero con posibilidades de éxito en la inmovilización de células vegetales.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1. CULTIVO DE CELULAS

Se utilizaron cultivos en suspensión de células de Capsicum chinense (chile habanero), previamente establecidos de acuerdo al diagrama que se muestra en la figura 3.

5.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados fueron:

MS. Medio mineral Murashige y Skoog, pH 5.7 ± 0.1 (66) (apendice 1).

MS1. Medio mineral Murashige y Skoog, adicionado con ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) 12.5×10^{-3} M, ajustado a pH 5.7 con NaOH 1 N.

En ambos casos las sales fueron disueltas en agua desionizada, y los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/pulg^2 durante 15 minutos.

5.3. SOPORTES Y REACTIVOS

Alginato de sodio, alta viscosidad, obtenido de Macrocystis pyrifera; Acido poligalacturónico, grado III, obtenido de naranja; Quitosana, grado práctico, obtenido de concha de cangrejo. Estos soportes fueron obtenidos de Sigma Chem. Co. Cubos de espuma de poliuretano (1 cm x 1 cm x 1 cm) con 40 poros x cm aprox., uso comercial; 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolium (TTC), Sigma Chem. Co. Todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico, obtenidos de J.T. Baker S.A..

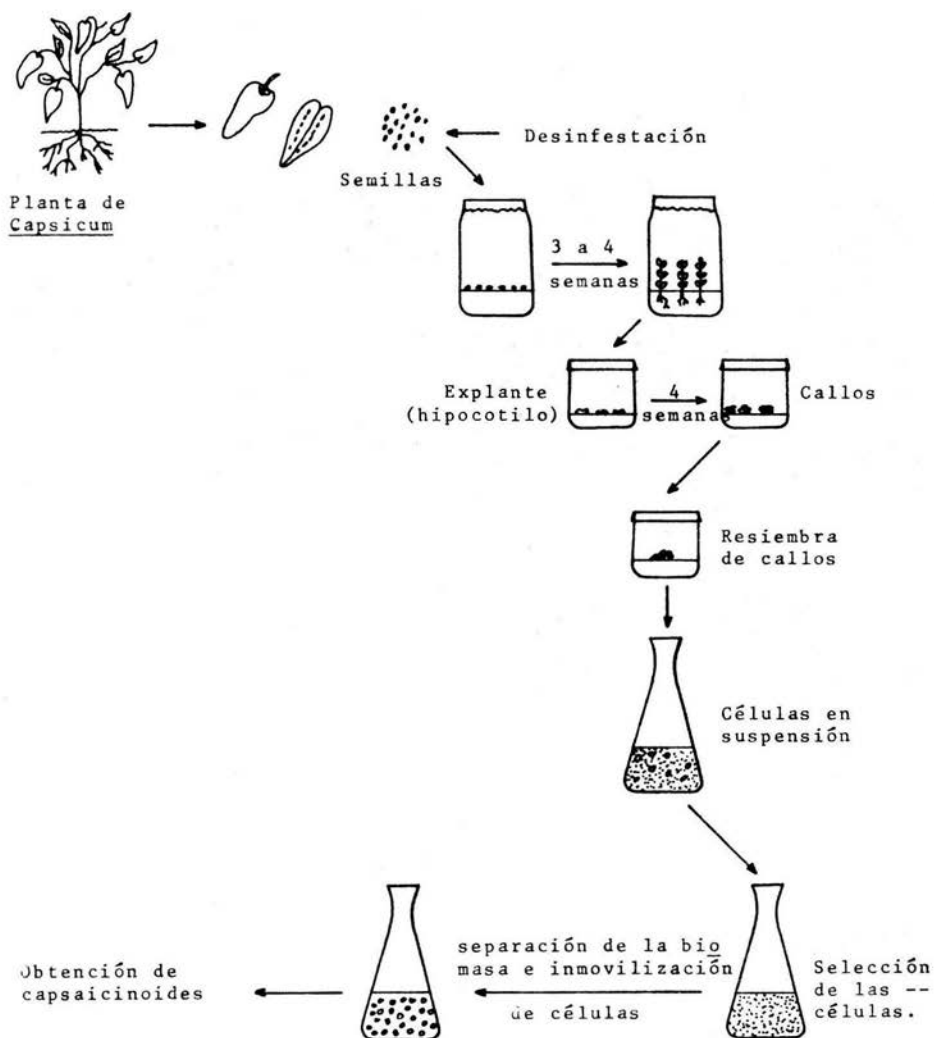


Fig. 3. OBTENCION E INMOVILIZACION DE CELULAS DE *C. chinense* PARA LA PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES.

5.4 MANTENIMIENTO DEL CULTIVO

Los cultivos de células libres e inmovilizadas se incubaron en una agitadora a 90-95 rpm bajo las siguientes condiciones:

- a) Iluminación continua con lámparas de luz fluorescente (blanco frío) de 32 watts y una intensidad luminosa de 5000 lux.
- b) Temperatura: Se mantuvo a $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ mediante un sistema de aire acondicionado.

Los cultivos en suspensión se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 500 ml y 200 ml, conteniendo 100 ml y 50 ml de medio mineral MS, respectivamente. Las resiembras para su mantenimiento se realizaron cada 15 días. Los cultivos se manipularon en condiciones de asépsia, empleando una campana de flujo laminar y material estéril.

5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los resultados, tanto para establecer las condiciones de inmovilización en los diferentes polímeros, como para cuantificar la producción de capsaicinoides de las células inmovilizadas se hicieron por triplicado. En cada caso los valores obtenidos representan el promedio.

5.6. INMOVILIZACION DE CELULAS DE *C. chinense* EN LOS DIFERENTES SOPORTES

5.6.1. Espuma de poliuretano

El proceso de inmovilización de células en espuma de poliuretano, se llevó a cabo de acuerdo al diagrama de la figura 4.

En este método se emplearon hojas de espuma de poliuretano de

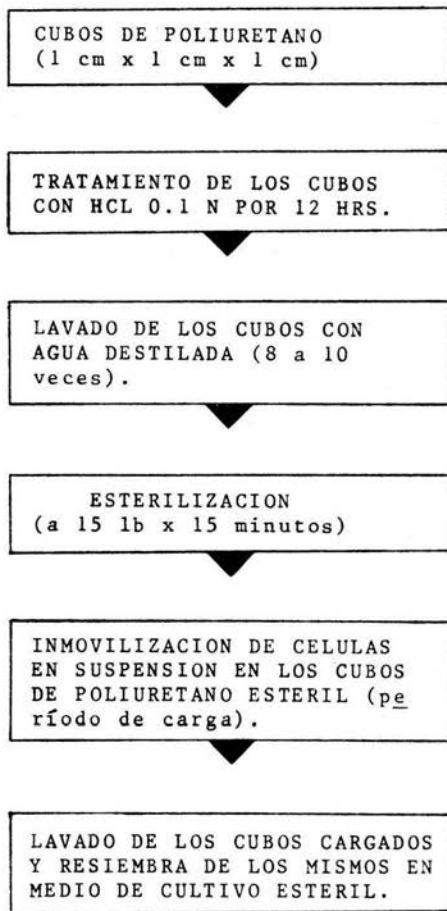


Fig. 4. DIAGRAMA PARA LA INMOVILIZACION DE CELULAS DE C. chinense EN CUBOS DE ESPUMA DE POLIURETANO. Adaptado de Conner (67) y de Lindsey & col. (42).

1 cm de grosor, las cuales fueron cortadas en cubos de 1 cm x 1 cm x 1 cm (con un promedio de 40 poros/cm) de acuerdo a Lyndsey & col. (42). Los cubos fueron tratados con una solución de HCl 0.1 N, de acuerdo al método de Conner y Meredith (67) y posteriormente fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/pulg² durante 15 minutos, con lo cual se logró la remoción de compuestos residuales, como los monómeros de isocianato o los solventes orgánicos utilizados en la fabricación de la espuma, que pudieran resultar tóxicos para la célula (68).

El período de carga (tiempo necesario para saturar los cubos de espumas con las células), se inició al incubar 5g de células (p.f.) y 3 cubos de espuma de poliuretano, de las dimensiones ya mencionadas, en matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 30 ml de medio mineral MS1. El tiempo de saturación de las espumas se determinó midiendo el peso seco (p.s.) de las células libres e inmovilizadas hasta obtener un peso constante.

5.6.2. Alginato de sodio

Se utilizó alginato de sodio al 2%, disuelto en el medio MS con un pH final de 6, y se empleó una solución precipitante de CaCl₂ a diferentes concentraciones (0.005 M a 0.2 M) disuelto en el mismo medio mineral y ajustado a un pH final de 7.5. Ambos pH's se determinaron experimentalmente en el laboratorio, para prevenir cambios en la acidificación de las soluciones provocados por la esterilización, según se muestra en la tabla 6. Las soluciones se esterilizaron a 15 lb/pulg² durante 15 minutos.

En la figura 5 se muestra el método seguido para la inmovilización de las células en este gel, utilizando cultivos en

Tabla 6. EFECTO DE LA ESTERILIZACION SOBRE EL pH DE LOS GELES Y LA SOLUCION PRECIPITANTE.

SOLUCION	pH		
	Antes de Esterilizar	Después de Esterilizar	
Alginato (2%)	6.0	5.5	
Acido poligalacturónico (4%)	7.0	5.5	
CaCl ₂	0.005 M	7.5	5.5
	0.05 M	7.5	5.2
	0.1 M	7.5	5.2
	0.15 M	7.5	5.0
	0.2 M	7.5	5.1

a. Los geles y la solución precipitante CaCl₂ fueron preparados en medio mineral Murashige-Skoog.

b. Los experimentos se hicieron por triplicado.

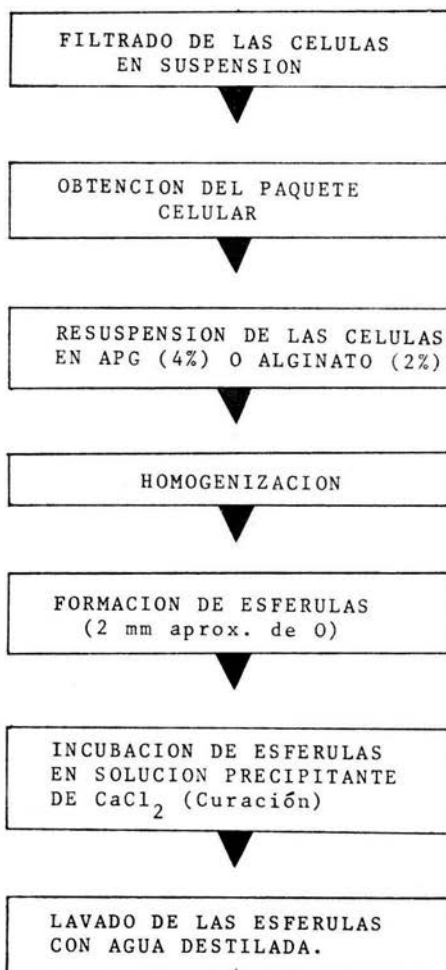


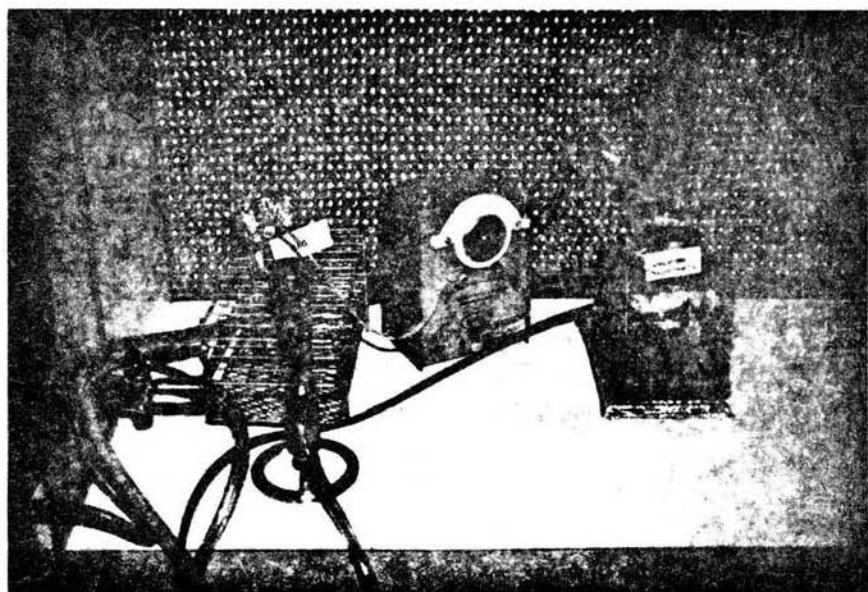
Fig. 5. DIAGRAMA PARA LA INMOVILIZACION DE CELULAS DE C. chinense EN AC. POLIGALACTURONICO Y ALGINATO DE CALCIO.

fase de crecimiento logarítmico (4 a 7 días de establecidos), filtrados a través de una malla de 1.5 mm de poro y retenidas en otra de 0.15 mm de poro.

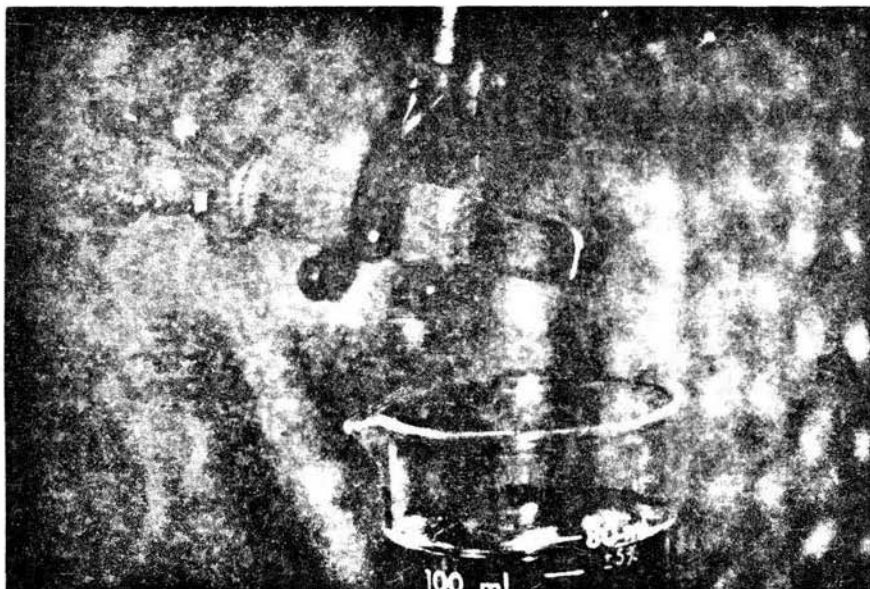
Las células se mezclaron con 10 ml del gel, en tubos de ensayo, y se hicieron pasar a través del dispositivo que se muestra en las fotografías 1 y 2, y que consiste de dos tubos de acero inoxidable de 2 mm de diámetro interno. Por el tubo inferior se hizo pasar la mezcla gel-células, con ayuda de una bomba peristáltica y por el tubo superior del dispositivo, que sirvió como aspersor, se hizo pasar un flujo de aire. La inmovilización de células de Capsicum, se llevó a cabo al ponerse en contacto la mezcla gel-células con la solución precipitante, la cual se mantuvo en constante agitación con ayuda de una placa magnética. El tamaño de la esférula obtenida, dependió de la velocidad de extrusión y el flujo de aire aplicado a la mezcla. Las esférulas se dejaron diferentes tiempos en contacto con la solución precipitante para su "curación", tiempo mínimo necesario que deben permanecer estas en la solución precipitante de CaCl_2 para que se forme la red polimérica de atrapamiento (fig. 6). Posteriormente las células inmovilizadas se resuspendieron en el medio MS para la producción de capsaicinoides. Todo el método de inmovilización se hizo en condiciones de asépsia y esterilidad, en una campana de flujo laminar.

5.6.3. Acido poligalacturónico

Se utilizó APG al 4%, según la técnica descrita por Magaña (70), y CaCl_2 como solución precipitante, a diferentes



Fotografía 1. APARATOS Y MATERIALES UTILIZADOS EN LA INMOVILIZACION DE CELULAS DE C. chinense EN ALGINATO DE CALCIO Y APG.



Fotografía 2. DISPOSITIVO EMPLEADO PARA LA INMOVILIZACION DE CELULAS DE C. chinense EN ALGINATO DE CALCIO Y APG.

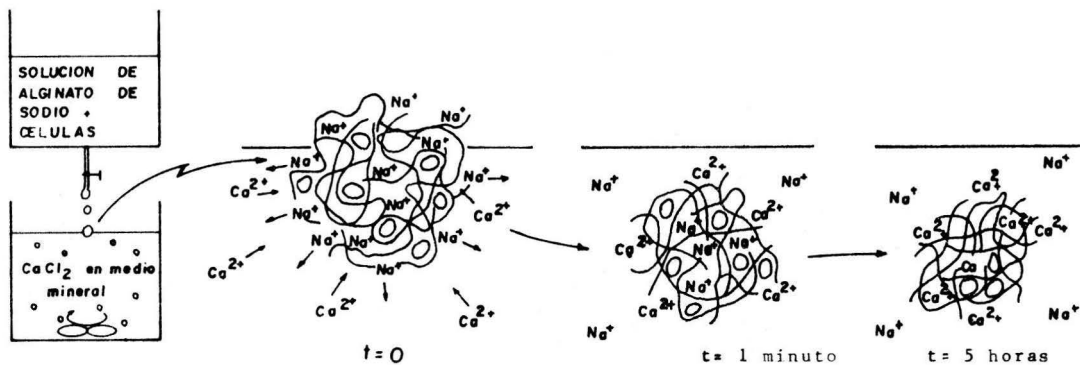


Fig. 6. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL INTERCAMBIO DE IONES Na^+ Y Ca^{2+} DURANTE EL PROCESO DE FORMACION DE ESFERULAS DE ALGINATO DE CALCIO. Adaptado de Hulst & Tramper (69).

concentraciones. El gel se ajustó a pH 7 con una solución de NH_4OH concentrada. Ambas soluciones se prepararon con medio mineral MS y se esterilizaron a 15 lb/pulg^2 durante 15 minutos. Posteriormente se siguió la misma metodología descrita para la inmovilización en alginato (fig. 5).

5.6.4. Quitosana

Se siguieron las técnicas descritas por Vorlop & Klein (59), Knorr & Teutonico (63) y Rodriguez & Rha (62), a las cuales se hicieron modificaciones con el fin de obtener un pH que no dañara a la célula de *C. chinense*, para lo cual se utilizó una solución de ácido acético-acetato de sodio con pH 6, para disolver el polímero, y una solución de polifosfato a pH 7, como solución precipitante. Las esférulas se obtuvieron siguiendo la técnica descrita para alginato.

5.7. EFECTO DEL TIEMPO DE CURACION SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CELULAS INMOVILIZADAS

Para determinar el efecto del tiempo de "curación" de las esférulas de alginato de sodio y ácido poligalacturónico sobre la viabilidad de las células de *C. chinense*, se sometieron las esférulas con 0.3 g (p.f.) a diferentes tiempos de "curación" que variaron de 2 a 12 horas.

5.7.1. Viabilidad celular

Para medir la viabilidad de las células de *C. chinense* se utilizó el método de Steponkus & Lampear (71), modificado por Towill & Mazur (72). Este método se basa en la eficiencia respiratoria de las células, la cual se mide por medio de la reducción del 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) que da

origen a un compuesto de color rojo conocido como formazán, insoluble en agua, pero soluble en alcohol y que absorbe la luz en una longitud de onda de 485 nm.

Para medir la viabilidad en células libres, se realizaron ensayos para determinar las condiciones óptimas de reacción del TTC con las células de *C. chinense*, para lo cual se utilizaron concentraciones celulares de 0.1 g y 0.3 g (p.f.), concentraciones de TTC de 0.01% a 1.4 % (p/v) disuelto en una solución de fosfatos 0.05 M, así como diferentes valores de pH de 5.5 a 5.9 y tiempos de reacción de 5 a 27 horas. Una vez establecidos los parámetros óptimos de reacción, se hizo una curva de calibración con diferentes porcentajes de células vivas y muertas (figura 7).

En el caso de las células inmovilizadas, primero se redisolviéron para obtener células libres (inciso 5.7.2.), éstas se lavaron con agua destilada estéril y posteriormente se adicionaron a la solución de TTC al 1% (pH 7), durante 18 horas. Después se extrajo el formazán con alcohol al 95% (v/v) y se midió la coloración en un espectrofotómetro a 485 nm. La lectura obtenida, se interpoló en la curva estándar de calibración.

5.7.2. Disolución de esférulas para la obtención de células libres

Para liberar a las células inmovilizadas en alginato de sodio, se utilizó una solución de fosfato 0.2 M y EDTA 0.005M a pH 6, como agentes secuestrantes que compiten por el Ca^{++} de la red polimérica. Para las células inmovilizadas en APG, se utilizó una solución de citratos 0.04 M. a pH 6.0 como agente secuestrante.

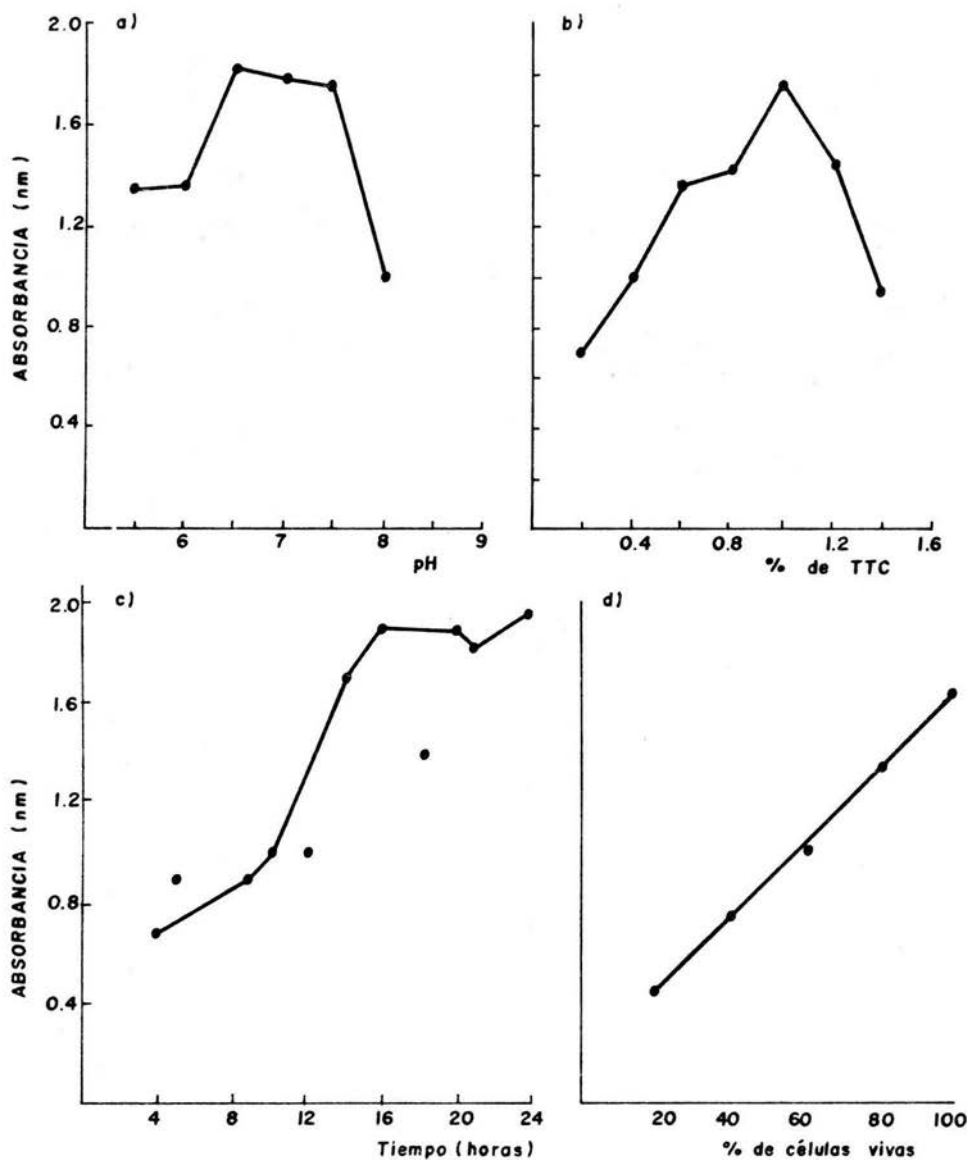


Fig. 7. OPTIMIZACION DE LOS PARAMETROS DE REACCION: a) pH, b) Concentración y c) Tiempo, del método de Trifeniltetrazolium (TTC) y d) Curva patrón para determinar la viabilidad de las células de *C. chinense*.

Estas condiciones, permitieron liberar a las células inmovilizadas, obteniéndolas viables.

5.8. EVALUACION DE CAPSAICINOIDES

5.8.1. Peso de las células

El peso fresco de las células libres e inmovilizadas en espuma de poliuretano, se pesó en una balanza granataria, después de remover el exceso de medio por filtración.

El peso seco se obtuvo filtrando la suspensión celular a través de un papel Whatman # 1, previamente tarado y colocado en un embudo buchner. El papel filtro y las células retenidas fueron, posteriormente, colocadas en una estufa de vacío a una presión de 15 lb/pulg² y temperatura de 70° C hasta peso constante. El peso seco de las células inmovilizadas en Alginato y APG se midió de la siguiente manera: a) por diferencia de peso entre esférulas con las células inmovilizadas y esférulas vacías y b) en células liberadas, después de despolimerizar la matriz. En ambos casos, las células y esférulas fueron secadas en una estufa de vacío de forma similar a las células libres.

5.8.2. Efecto del CaCl₂ y la concentración de células sobre la producción de capsaicinoides

Para determinar la influencia de la concentración de CaCl₂ sobre la producción de capsaicinoides, se hicieron esférulas conteniendo 0.3 g (p.f.) de células y se inmovilizaron en diferentes concentraciones de CaCl₂ (0.05 M a 0.2 M).

Para determinar el efecto de la concentración celular, sobre la producción de capsaicinoides, se hicieron esférulas conteniendo entre 0.1 g y 3 g de células (p.f.). En ambos casos

conteniendo 50 ml de MS1, cuantificándose la producción de capsaicinoides por cromatografía de líquidos de alta resolución como se mencionará posteriormente.

5.8.3. Cultivo de células inmobilizadas

5.8.3.1. Alginato de sodio y Acido poligalacturónico

Se inocularon esférulas de ácido poligalacturónico y alginato de calcio en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de MS1 conteniendo 2g de células (p.f.), en las condiciones descritas en el inciso 5.4..

5.8.3.2. Espuma de poliuretano

Se inocularon 6 espumas de poliuretano, con una cantidad de células comprendida entre 5 g y 8 g (p.f.) en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de MS1, en las mismas condiciones descritas en el inciso anterior.

Se hizo el ensayo preliminar de producción de capsaicinoides utilizando una columna de vidrio de 13 cm x 2.5 cm, empacada con 20 cubos de espuma de poliuretano a la cual se hicieron recircular 400 ml de medio de cultivo MS1 a una velocidad de 13 ml/min. La producción de capsaicinoides se siguió por un tiempo de 28 días, extrayendo cada tercer día muestras de 20 ml de medio de cultivo para su cuantificación.

En todos los casos se compararon los experimentos con células en suspensión, en las mismas condiciones.

5.8.4. Extracción y cuantificación de capsaicinoides

La extracción de capsaicinoides del medio de cultivo se hizo en un embudo de separación, adicionando un volumen de cloroformo por uno de medio y repitiendo esta operación 3 veces.

Posteriormente la fase orgánica fue evaporada a sequedad, a 50°C y 15 lb/pulg² en un rotavapor (Yamato mod. RE-51).

El residuo se resuspendió en 1 ml de metanol y se cuantificó por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), utilizando un Cromatógrafo (Tracor) con las siguientes condiciones: columna Supercosil (C-18), fase móvil metanol-agua (60-40%) + 0.05 M de AgNO₃ (pH 2.5) con un flujo de 1 ml/min, detector de luz ultravioleta a 280 nm y un volumen de muestra de 10 μ l. utilizando un estándar externo de capsaicina (73).

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. INMOVILIZACION EN ESPUMA DE POLIURETANO

Se inmovilizaron células de *C. chinense* en espuma de poliuretano, empleando un inóculo de 70% (v/v) en fase logarítmica de 4 a 6 días de edad, y se determinó el período de carga, tanto con inóculos homogéneos como con heterogéneos (fig. 8). Al utilizar cultivos homogéneos, el tiempo necesario para que las células empezaran a penetrar a la espuma fue de 12 días. Después de este tiempo se presentaron fluctuaciones en peso, lo cual indica una continua entrada y salida de células, que se vió favorecida por el uso de cultivos celulares con un tamaño de agregados menor a los 0.2 mm (tamaño mínimo de los poros de la matriz), estableciéndose así el tiempo de saturación a partir de los 20 días. Además, se observó que la mayoría de estas células atrapadas, una vez que son inoculadas en el medio de producción y sometidas a la agitación correspondiente, se desprenden de la matriz y quedan libres en el medio, lo que indica una saturación deficiente que fue observada al microscopio y que se puede apreciar en la fotografía 3.

Al utilizar agregados celulares de hasta 3.0 mm de diámetro (cultivos heterogéneos), el atrapamiento celular empezó al segundo día, lográndose una saturación total en solo 9 días sin que se presentaran fluctuaciones en el peso, lo cual indicó que no hubo liberación celular. Una vez que las células saturaron el interior de la espuma se acumularon fuera de ella, lográndose una mayor compactación entre célula y polímero, como se muestra en la fotografía 4.

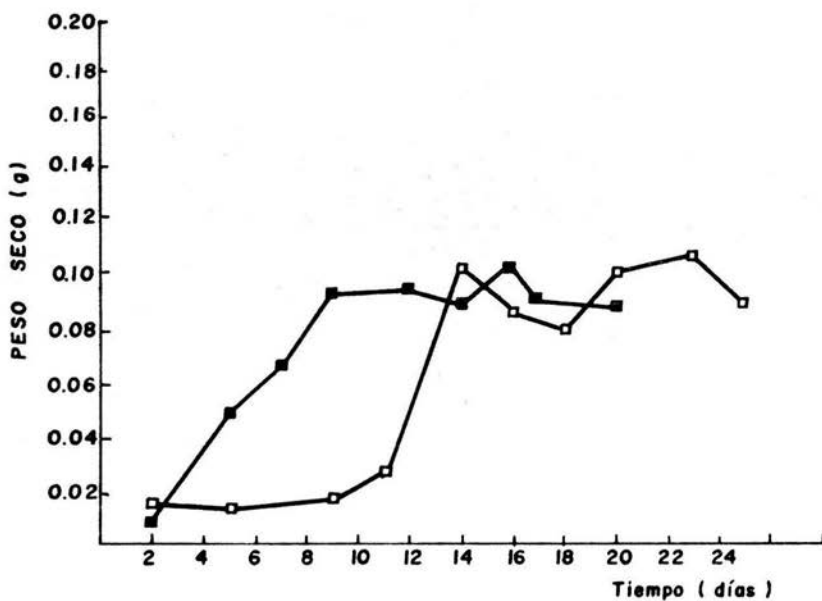
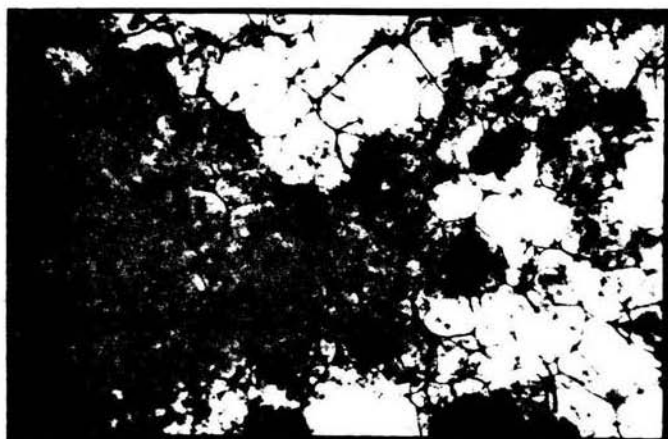
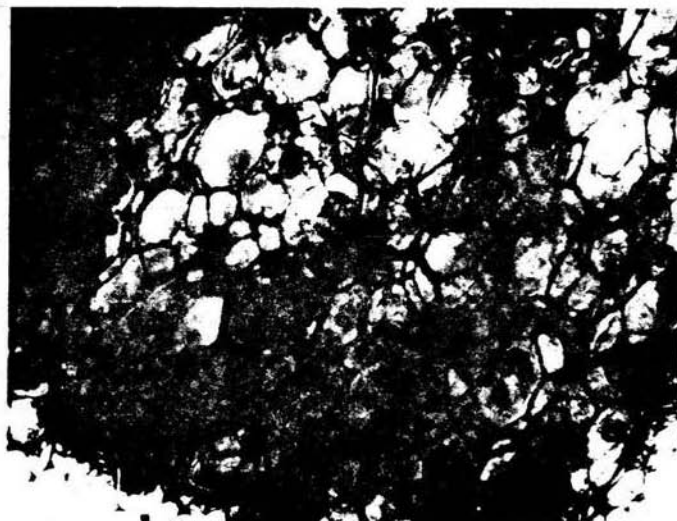


Fig. 8. PERIODO DE CARGA DE ESPUMAS DE POLIURETANO CON SUSPENSIONES HOMOGENEAS Y HETEROGENEAS DE CELULAS DE *C. chinense*.

- Células libres (Cultivos homogéneos)
- Agregados celulares (Cultivos heterogéneos)



Fot. 3. Fotomicrografía de microscopio estereoscópico (19X) que muestra el aspecto interno de un cubo de poliuretano saturado con cultivos homogéneos (Película - PX-PAN 125).



Fot. 4. Fotomicrografía de microscopio estereoscópico (19X) que muestra el aspecto interno de un cubo de poliuretano saturado con cultivos heterogéneos (Película PX-PAN 125).

Estos resultados concuerdan con los encontrados en la literatura, en donde Rhodes & col. (74), trabajando con cultivos homogéneos, afirman que el requerimiento de largos períodos de carga, dificultan el control de los estados iniciales de saturación debido a que las interacciones físicas entre células y soporte, son débiles y extremadamente sensibles a las condiciones de corte.

Mavituna & Park (75), inmovilizaron agregados de C. frutescens en matrices porosas de poliuretano y midieron crecimiento celular y consumo de sustrato (glucosa), encontrando que los agregados celulares fueron físicamente atrapados en el interior de la matriz, donde crecieron y se adhirieron unos a otros, hasta llenar todo el espacio disponible. Por su parte, Rhodes & col. (65) y Rosevear & Lambe (76) reportaron la presencia de una cubierta mucilaginoso en células de Humulus lupulus L., Beta vulgaris L. y Chinchona pubescens inmovilizadas en poliuretano, la cual facilita la adhesión de las células a la matriz. Esta cubierta, según los estudios de Akiyama y col. (77) y Fincher y col. (78), está formada de polisacáridos y glicoproteínas, las cuales son secretadas por la célula vegetal libre o inmovilizada, aunque en los cultivos en suspensión es poco visible, ya que las fuerzas de corte favorecen la diseminación de estos mucilagos en el medio, dificultando así la adhesión de las células.

6.2. INMOVILIZACION EN ALGINATO DE SODIO Y EN ACIDO POLIGALACTURONICO

Para la inmovilización de células de C. chinense en alginato de calcio y ácido poligalacturónico, se utilizó un inóculo de

aproximadamente 40% (v/v) en fase logarítmica (4-7 días de edad), con un tamaño de agregados de hasta 0.2 mm de diámetro, ya que los agregados de mayor tamaño dificultaron el proceso de inmovilización.

Los geles y la solución precipitante mostraron una caída de pH causada por el proceso de esterilización (ver metodología, tabla 6)

Al respecto, Kirvin & col. (79) reportan una acidificación del medio mineral MS, posterior al proceso de esterilización en autoclave. Viskot & Bezdek (80) mencionan que el medio mineral MS con un pH inicial de 5.0, 5.39 y 5.8 también tiene una caída entre 0.2 y 0.5 unidades después de la esterilización. También reportan que la acidificación del medio fue acompañada por la sedimentación de un precipitado de sulfato ferroso, lo cual indica que el calor aplicado en la esterilización favorece la formación de compuestos que están interactuando indirectamente en las variaciones de pH. En nuestro caso, este efecto fue más marcado, debido posiblemente a la adición del polímero y sales de CaCl_2 al medio.

Una vez establecidas las condiciones de preparación de cada una de las soluciones utilizadas, se inmovilizaron las células de *C. chinense*, haciendo algunas modificaciones al método de inmovilización. La elección de cultivos de 4-7 días de edad, permitió obtener células en fase de crecimiento logarítmico, para evitar la presencia de células dañadas. Asimismo, el filtrado de éstos cultivos a través de una malla, permitió la inmovilización de agregados celulares de un tamaño aproximado de 0.15 mm a 1 mm, ya que de acuerdo a los trabajos de Lindsey & Yeoman y Miyasaka &

col. (42, 81), la producción de metabolitos puede verse incrementada al trabajar con cultivos celulares con cierta agregación.

6.2.1. Efecto del tiempo de curación

El calcio es un catión que cumple diversas funciones dentro de la fisiología celular de la planta. Este compuesto es importante en la síntesis de la pectina que conforma la lamela media; se encuentra involucrado en el metabolismo de formación de núcleos y mitocondrias y en la activación de algunas enzimas como las fosfolipasas y otras. También se ha encontrado que el exceso de calcio, puede ocasionar la formación de complejos insolubles que tienden a precipitar y prevenir efectos tóxicos de otras sales en la planta. Por otro lado, la formación de estos compuestos limita la captación de calcio por las células, manifestando una deficiencia de éste (82, 83).

Tomando en cuenta lo anterior, se tuvo que considerar el efecto del calcio sobre la viabilidad de las células inmovilizadas. Para ello, se consideró el porcentaje de viabilidad de las células de *G. chinense* inmovilizadas, como el parámetro indicativo para determinar el tiempo de curación, encontrando que éste es de 2 a 4 horas para las esférulas de APG al 4%, con un 46% de viabilidad, y de 4 a 6 horas para las de alginato de calcio al 2%, obteniéndose una viabilidad de 83% y 86%. Se utilizó una concentración de CaCl_2 de 0.2 M para la gelificación de ambos polímeros (tabla 7). Esta concentración fue elegida de acuerdo a la literatura consultada.

En ambos casos, después de que las células inmovilizadas

Tabla 7. EFECTO DEL TIEMPO DE CURACION EN LAS CELULAS INMOVILIZADAS
DE C. chinense.

TIEMPO DE CURACION ^a (Horas)	% DE VIABILIDAD ^b	
	Alginato de sodio 2% (p/v) ^c	Ac. Poligalacturónico 4% (p/v) ^d
0	100	100
2	51	44
4	83	46
6	86	38
8	45	--
10	--	38
12	35	--

a. En CaCl_2 M.

b. Esfêrulas con 0.1 g (p.f.) de células.

c. Solución de fosfatos 0.2 M + EDTA 0.005 M. pH 6.

d. Solución de citratos 0.04 M. pH 6.

permanecieron 2 h en contacto con la solución precipitante, se observó una reducción de 49% a 56% en la viabilidad de éstas, lo cual puede ser atribuido a los cambios a los que fue sometida la célula y a un efecto de adaptación, manifestado por un decremento en la respiración celular. En el caso de alginato de calcio, las células tienden a recobrar su viabilidad debido, posiblemente, a una mejor adaptación de éstas a la matriz, pero después de 10 horas de estar en contacto con la solución precipitante se presenta un efecto nocivo del CaCl_2 , lo cual puede atribuirse a que conforme se incrementa el tiempo de permanencia de las esférulas en la solución precipitante, el complejo célula-gel presenta mayor estabilidad, dificultándose la redisolución de las esférulas, requiriéndose más tiempo para ello y aumentando el daño celular.

En el caso de ácido poligalacturónico, la pérdida de viabilidad celular, que fue de un 49% a las 2 horas de ser inmobilizadas se vió disminuida con el transcurso del tiempo. Las razones de este comportamiento no pueden ser precisadas, sin embargo es posible atribuir cierta influencia a las características del ácido poligalacturónico polimerizado, el cual fue más estable y rígido que el alginato, en las condiciones empleadas. Además el hecho de que el APG forme parte integral de la pared vegetal, podría favorecer una unión más fuerte entre célula y polímero y, de esta manera, dificultar la disolución posterior de la esférula con solución de citratos, provocando daño en la pared y, en consecuencia, en la membrana celular (56, 84).

Los trabajos de Brodelius y col. (44, 57) muestran que el

tiempo de curación de las esferulas de alginato de calcio, depende también de la concentración del polímero que se utilice. Por ejemplo, estos autores inmovilizan células de Catharanthus roseus en alginato de sodio al 3% y las dejan curar durante 12 horas en la solución precipitante de CaCl_2 0.05 M; usando la misma especie, en otro trabajo con alginato de sodio al 5% y un tiempo de curación de 30 minutos en solución de CaCl_2 0.05M, se obtienen, en ambos experimentos viabilidad celular medida cualitativamente por plasmólisis, respiración y división celular.

La discrepancia en cuanto a tiempo de curación que muestran nuestros resultados respecto a los reportados en la literatura (44, 51, 53, 55, 57) pueden atribuirse a las diferencias de concentración utilizadas tanto de los geles como de la solución precipitante, así como también a la susceptibilidad propia de cada especie.

Rocheffort & col. (85) observaron que el proceso de gelación depende de muchos factores, entre los que se encuentra la concentración del ion calcio y su relación con el tiempo de curación. Si dicha concentración es alta, la reacción gelificante será más rápida que la difusión del catión y, como resultado de ello, la formación del gel se realizará preferencialmente cerca de la superficie. Si por el contrario, la concentración de CaCl_2 es baja, el catión no será suficiente para originar una estructura firme del gel, requiriéndose un mayor tiempo de curación del polímero.

Es necesario aclarar que la liberación de las células inmovilizadas en alginato de calcio y ácido poligalacturónico, se llevo a cabo inmediatamente después de que estas fueron retiradas

de la solución de CaCl_2 , obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 7. Asimismo, al llevar a cabo el mismo proceso de liberación, en células inmovilizadas, que permanecieron más de 1 día en medio de cultivo, no se detectó viabilidad celular al aplicar el método de TTC, lo cual puede atribuirse a que conforme pasa el tiempo, esférulas y células forman una unidad, y la despolimerización del gel puede provocar daños irreversibles a las células. Esto originó que en los experimentos posteriores se tomara la producción de capsaicinoides, como el parámetro indicativo de viabilidad celular, ya que la biosíntesis de este compuesto se da por medio de una síntesis *de novo* (producto formado por un gran número de reacciones metabólicas que se inician a partir de una simple fuente de carbono y nitrógeno), la cual no puede ser realizada a menos que las células estén viables (86).

6.2.2. Efecto de la concentración de CaCl_2 .

Se estudió la concentración mínima necesaria de CaCl_2 para polimerizar ambos geles, ya que en estudios preliminares se observó que para alginato de calcio al 2% se requería una concentración de CaCl_2 0.05M y para ácido poligalacturónico al 4% es necesaria una concentración de 0.1M. Partiendo de ello, se incrementó la concentración de CaCl_2 para la inmovilización de células de *C. chinense* en ambos polímeros y se determinó su efecto sobre la producción de capsaicinoides. En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos para ambos polímeros, en donde se aprecia que al utilizar una concentración intermedia de CaCl_2 (0.15 M) en la gelificación, se obtiene una producción ---

Tabla 8. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CaCl_2 SOBRE LA PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES EN CELULAS INMOVILIZADAS DE *C. chinense* EN ACIDO POLIGALACTURONICO Y ---- ALGINATO DE CALCIO

<u>AC. POLIGALACTURONICO¹</u>					<u>ALGINATO DE CALCIO²</u>				
<u>CaCl_2</u>	<u>Capsaicinoides ($\mu\text{g/g/l}$)</u>				<u>CaCl_2</u>	<u>Capsaicinoides ($\mu\text{g/g/l}$)</u>			
(Molaridad)	C	NDC	DHC	CAP TOT	(Molaridad)	C	NDC	HDC	CAP TOT
00.1	78.575	199.065	5.235	282.893	0.05	11.75	—	—	11.75
0.15	120.45	387.865	—	508.315	0.1	17.09	—	—	17.09
0.2	41.91	78.58	5.235	125.725	0.15	17.99	—	—	17.99
					0.2	8.54	tr	—	8.54

Condiciones del experimento:

- 0.3 g (p.f.) de células.
- Se utilizaron cultivos celulares con 25¹ y 35² resiembras.
- Tiempo de curación de 3 horas¹ y de 4 horas².
- El tiempo de incubación fue de 7 días.

mayor de capsaicinoides totales, mientras que las concentraciones menores o mayores de ésta mostraron producciones bajas.

La tendencia a una baja producción de capsaicinoides con respecto a una concentración baja de CaCl_2 , mostrada tanto para alginato de sodio como para ácido poligalacturónico, se atribuye a un atrapamiento celular deficiente, que inmoviliza pero no causa "stress" a la célula a un grado que permita su máxima producción.

En lo que se refiere a la capacidad de biosíntesis de capsaicinoides, mostrada al gelificar los polímeros con CaCl_2 0.2 M, el decremento observado para alginato de calcio (47%) y ácido poligalacturónico al 27% posiblemente se deba a la formación de una red polimérica muy compacta que puede estar limitando la entrada o salida de productos y/o sustratos al interior de la matriz. Tanaka y col. (87) mencionan que el tamaño de poro de un gel, dado por el tamaño de la molécula y/o a su concentración puede afectar la difusión de los sustratos o productos, limitando la velocidad de reacciones enzimáticas en células inmovilizadas.

Otro trabajo realizado por Wichers & col. (88), con células de Mucuna pruriens inmovilizadas en alginato de calcio, reporta que la adición de un exceso de calcio (70 mM en adelante) inhibe tanto la producción como la liberación de L-Dopa (L-Dihidrofénilalanina), debido probablemente a un mecanismo inhibitorio del transporte activo en el plasmalema. Un efecto similar fue reportado por Felix y col. (89), quienes observaron una inhibición por calcio, de algunas reacciones enzimáticas

catalizadas por hexoquinasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en células de *C. roseus* inmovilizadas en alginato y agarosa. Ellos atribuyen esta observación a la presencia de calcio en el medio de incubación, el cual evita la reacción por uniones iónicas con la coenzima cargada negativamente.

Cabe hacer notar que los cultivos celulares empleados para la inmovilización en alginato de sodio y APG, pertenecen a diferentes resiembras y no provienen de una línea celular establecida, lo cual podría explicar la diferencia de producción de capsaicinoides obtenida al variar la concentración de CaCl_2 . En la literatura se menciona que el uso de este tipo de cultivos, provoca cambios epigenéticos, así como el reordenamiento estructural de los cromosomas, lo que ocasiona una reducción o pérdida de la capacidad celular para producir metabolitos secundarios (90, 91).

6.2.3. Efecto de la concentración de células.

Otro de los factores que contribuyen a crear un microambiente limitante dentro del gel, es la concentración celular, la cual puede afectar la velocidad de difusión del sustrato y la del oxígeno (92), repercutiendo directamente en la producción de metabolitos secundarios. Por lo tanto fue necesario inmovilizar diferentes concentraciones celulares, evaluando la producción de capsaicinoides como parámetro indicativo para determinar la cantidad más adecuada de células inmovilizadas en cada uno de los geles.

El efecto de la concentración celular sobre la producción de capsaicinoides se aprecia en la tabla 9 con células inmovilizadas.

Tabla 9. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CELULAS SOBRE LA PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES EN CELULAS INMOVILIZADAS DE C. chinense.

<u>ACIDO POLIGALACTURONICO</u> ¹					<u>ALGINATO DE CALCIO</u> ²				
Peso celular (g/p.f.)	Capsaicinoides (µg/g/l)				Peso Celular (g/p.f.)	Capsaicinoides (µg/g/l)			
	C	NDC	DHC	CAP TOT		C	NDC	DHC	CAP TOT
0.1	—	—	—	—	0.1	0.0148	—	—	0.0148
0.3	7.91	tr	tr	7.91	0.3	0.0353	—	—	0.0353
0.7	9.45	tr	tr	9.45	0.7	0.3969	0.0028	0.007	0.406
1.0	20.29	tr	tr	20.29	1.0	293.2	23.3	18.12	280.62
2.0	55.63	10.59	5.19	71.21	2.0	182.0	14.88	12.27	209.10

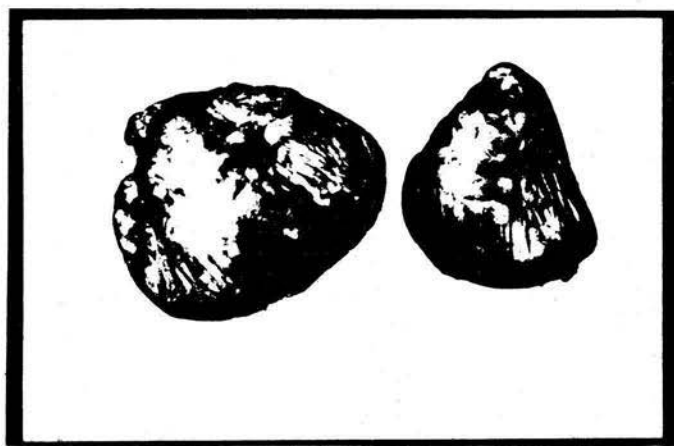
Condiciones del experimento:

- Se utilizaron cultivos celulares con 29¹ y 38² resiembras.
- Tiempo de curación 3 horas¹ y 5 horas² en CaCl₂ 0.15M.
- Tiempo de incubación de 7 días.

en ácido poligalacturónico y alginato de sodio. La concentración máxima de células utilizadas para inmovilizar en ácido poligalacturónico se determinó de acuerdo a los problemas que se presentaron al formar la esférula con la mezcla célula-polímero, ya que se observó que conforme aumenta la concentración celular, se pierde la forma de la esférula de APG (ver fotografía 5). En la tabla 9 se observa que la producción de capsaicinoides aumenta en forma proporcional al peso de las células inmovilizadas, de tal manera que con 2 g peso fresco, se obtienen 71.21 $\mu\text{g/g/l}$ de capsaicinoides totales, mientras que inmovilizando 1g de p.f., la producción disminuye en un 71% (20.29 $\mu\text{g/g/l}$).

Cabe señalar que la inmovilización de células de *C. chinense* en ácido poligalacturónico se facilitó debido a que este gel presenta baja viscosidad al disolverlo, permitiendo una distribución homogénea de células, con lo cual, posiblemente se evitaron problemas difusionales relacionados con la transferencia de oxígeno y sustrato, así como problemas causados por bióxido de carbono, etc.

Para el caso de las células inmovilizadas en alginato de calcio, la producción de capsaicinoides fue similar a la observada en células inmovilizadas en APG, sin embargo, en alginato de calcio el valor más alto de producción se alcanzó con una carga celular de 1 g (p.f.), decayendo ligeramente al aumentar la concentración celular a 2 g (p.f.). Esto puede atribuirse a que el exceso de células pudo provocar competencia, al crear un ambiente de anaerobiosis en el interior de la esférula.



Fot. 5. Fotomicrografía de microscopio estereoscópico (12X) de células inmovilizadas en Ac. poligalacturónico (Película PX-PAN 125).

Son pocos los trabajos que hacen referencia al efecto de la concentración celular en sistemas inmovilizados, debido al escaso conocimiento de los cambios fisiológicos y bioquímicos causados por el confinamiento al que es sometida la célula. En estos trabajos se menciona que un incremento en dicha concentración ocasiona problemas de limitación por oxígeno que pueden manifestarse directamente sobre la producción de metabolitos secundarios (87, 93, 94). Mavituna & col. (95) informan que células inmovilizadas de *C. frutescens* cv *annuum* en espuma de poliuretano, previamente sometidas a un período limitante de oxígeno, incrementaron la producción de capsaicinoides en el medio al restaurar los niveles de oxígeno (arriba del 60%) en el medio de cultivo. Por su parte Hulst & col. (96) proponen que para agregados celulares de *Tagetes pátula*, la carencia de oxígeno en el centro de los agregados, puede ser el factor que estimula la síntesis de tiofenos. Este comportamiento es similar al observado en los sistemas inmovilizados, sin embargo Jones & Veliky (97) mencionan la necesidad de continuar con estudios detallados para conocer el efecto del O_2 disuelto sobre el metabolismo de las células.

Por otra parte, la baja de producción de capsaicinoides con 0.1 g, 0.3 g y 0.7 g (p.f.) en células inmovilizadas en alginato de sodio, puede atribuirse a un atrapamiento heterogéneo (esférulas vacías y esférulas con pocas células en su interior), causado por la naturaleza viscosa del gel. Asimismo se observó un rompimiento de la matriz (fotografía 6) en un tiempo aproximado de 35 días causado por el crecimiento celular. Esto muestra una menor resistencia del alginato, lo cual coincide con lo



Fot. 6. Fotomicrografía de microscopio estereoscópico (8X)
de células inmovilizadas en Alginato de calcio .
(Película PX-PAN 125).

encontrado en la literatura (60, 85, 98).

Cabe recalcar que los cultivos celulares empleados para la inmovilización en alginato de sodio y APG pertenecen a diferentes resiembras y no provienen de una línea celular establecida, lo cual podría explicar la diferencia de producción de capsaicinoides obtenida, al variar la concentración celular, ya que en la literatura se menciona que los cultivos celulares mantenidos por varios subcultivos, muestran una gran variabilidad en la producción de metabolitos secundarios, así como también cambios morfológicos marcados, lo cual es atribuido a cambios genéticos o epigenéticos de las células (91, 99, 100, 101).

Por último, en la mayoría de los casos donde se midió la producción de capsaicinoides, la capsaicina se produjo en mayor cantidad, dato que resulta de interés, debido a que este componente es el que le confiere mayor picor al fruto de Capsicum (25).

6.3. INMOVILIZACION EN QUITOSANA

La quitina de la cual se deriva la quitosana, es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, y el más ampliamente distribuido en el mundo. Es parecido a la celulosa y no es una goma industrial debido a que es insoluble en agua (60).

Las aplicaciones potenciales de la quitosana son muchas, entre ellas, se encuentra el uso de glóbulos de quitosana en la encapsulación de células microbianas para la producción de enzimas y aminoácidos, Rha (61), Vorlop & Klein (59) y Rodriguez & Rha (62) proporcionan valiosa información sobre el uso potencial de este polímero en el atrapamiento de células

vegetales por cultivo de tejidos, ya que existen pocos reportes de la aplicación real de quitosana para inmovilizar células vegetales. Knorr y Teutónico (63) lograron inmovilizar células de Amaranthus tricolor en quitosana, obteniendo una producción de oxalato en cantidades significativamente mayores a las obtenidas con células libres. Su sensibilidad a variaciones de pH y a fuerzas iónicas, es mayor que la de otros polisacáridos y es uno de los pocos polielectrolitos catiónicos que provee una gran variedad de aplicaciones potenciales, debido a su particular comportamiento en solución.

Con el fin de encontrar los procesos de gelificación y disolución de este gel, realizamos las pruebas necesarias para mantener el pH de la quitosana y de la solución precipitante, dentro de los intervalos tolerados por las células de C. chinense.

Para obtener esférulas resistentes, se hicieron algunos ensayos, que aparecen en la literatura para la gelación y disolución del gel (tabla 10).

Al seguir la metodología utilizada por Vorlop y Klein (59) se obtuvo la formación de glóbulos alargados y característicamente compactos. Sin embargo el pH obtenido con este gel y la solución precipitante fue de 3.9 y 14.0 respectivamente, por lo cual no se utilizaron para la inmovilización de células de C. chinense. Con el método utilizado por Knorr y Teutónico (63) se formaron hojuelas delgadas, mientras que por el método de Rodríguez y Rha (62), la gelificación lograda permitió la formación de glóbulos huecos. En los tres casos, al adicionar las células a las soluciones éstas

Tabla 10. PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS EN LA FORMACION DE ESFERULAS DE QUITOSANA PARA LA INMOVILIZACION DE CELULAS DE C. chinense.

QUITOSANA			SOLUCION PRECIPITANTE			REFERENCIA
GEL (% p/v)	DISOLUCION EN: (% p/v)	PH		CONCENTRACION (% p/v)	PH	
A. 1.5	Acido cítrico (3.8)	3.9	Hidróxido de sodio	2.0	14	59
B. 2.4	Acido ascórbico (1.6)	4.1	Trifosfato de sodio	3.0	10.7	63
C. 2.6	Acido acético (0.8)	4.7	Trifosfato de sodio	1.5	11	62

murieron inmediatamente, debido a los valores de pH obtenidos. Knorr & Berlin (1987), citados por Beaumont & Knorr (102) reportan que una solución de quitosana en ácido acético 1.55% causa la muerte de células de Chenopodium rubrum, debido al tratamiento ácido que requiere el polímero para su disolución.

Otro de los factores que intervinieron en la polimerización de este soporte fue la temperatura. Bihari & col (103) y Muzzareli (104) informan que a temperaturas altas, las cadenas de este gel se distienden, disminuyendo así la viscosidad de la solución, pero que también retornan a su estado normal, al someterse a un estado de enfriamiento.

Por tal motivo se utilizó el método de Rodriguez & Rha, modificando los valores de pH de las soluciones, para obtener valores de pH cercanos a 7, y que además fueran capaces de formar esférulas resistentes. Se utilizó quitosana al 2.6 % disuelta en una solución reguladora de ácido acético (1.2%) y acetato de sodio (0.001%), pH 6, y una solución precipitante de trifosfato de sodio (1.5 %) pH 7.0. Previo a esto se llevó a cabo un ensayo que nos permitió conocer la influencia del pH de la solución precipitante, trifosfato de sodio (1.5 %) antes y después de la esterilización, sobre la formación de esférulas y/o glóbulos de quitosana. Los resultados obtenidos mostraron que la esterilización no afectó la gelificación, ya que se obtuvieron esférulas resistentes, aunque para ello se tuvo que someter la solución de quitosana a un proceso de enfriamiento por abajo de 0 °C por 12 horas, debido a que se observó que un enfriamiento a temperatura ambiente, no permite la formación de glóbulos.

Una vez que se determinaron las condiciones de disolución y

gelificación de quitosana, dentro de los valores de pH que soporta la célula (6-6.5), se midió el efecto directo de estas soluciones, sobre la viabilidad celular, observándose una pérdida total de ésta. Este resultado puede atribuirse a un daño directo de la quitosana sobre las células, ya que, Kohle (105), informa que al adicionar quitosana soluble, a un cultivo, para permeabilizar células de *Glycine max*, ésta alteró la composición de la pared celular, presentando liberación del material iónico intercelular en el medio de cultivo. Asimismo, se detectó muerte celular en alto porcentaje. Young & col. (106, 107) mencionan que los efectos nocivos causados por quitosana sobre células de *G. max*, se debe a una pérdida de iones (electrolitos) y otros materiales a nivel de membrana y pared celular, provocados por la naturaleza policationica de la quitosana. Debido a los numerosos problemas que se presentaron decidimos no continuar los ensayos con este soporte.

6.4. ENSAYOS PRELIMINARES PARA LA PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES POR CELULAS IMOVILIZADAS DE *C. chinense*.

La biosíntesis de metabolitos secundarios por células vegetales se considera que está correlacionada, en la mayoría de los casos, con el grado de diferenciación celular. Lindsey & Yeoman (42) reportan que los cultivos de tejido calloso de *C. frutescens* cv *annuum* con mayores niveles de producción, fueron aquellos que presentaron apariencia compacta y lento crecimiento, lo cual hace pensar que el contacto físico entre una célula y otra, mejora la expresión de la capacidad de biosíntesis de la célula vegetal.

Existen evidencias de que la inmovilización, por

atrapamiento, imita condiciones de agregación semejantes a las que se dan en cultivos callosos, propiciando la unión entre célula-gel que permite simular el contacto célula-célula de los cultivos con agregados celulares. Por otra parte, el atrapamiento también limita la disponibilidad de los nutrientes y por lo tanto la división celular, con lo cual no solo se provoca un ambiente donde se incrementa la síntesis de metabolitos secundarios, sino que además, el atrapamiento de la célula permite la remoción de estos compuestos de manera continua, en todos aquellos cultivos en donde el metabolito es liberado al medio de producción (7, 48, 108, 109).

Una vez establecidas las condiciones de inmovilización de células de *C. chinense*, inmovilizadas en alginato de calcio, ácido poligalacturónico y poliuretano, se midió la producción de capsaicinoides con respecto al tiempo.

En la figura 9 se compara la producción de capsaicinoides de células de *C. chinense* en suspensión con la de células inmovilizadas en alginato y ac. poligalacturónico, durante un período de incubación de 30 días. Se observó que la producción de capsaicinoides obtenida con células inmovilizadas, es significativamente mayor a la que se observa en cultivos en suspensión. En el caso de las células inmovilizadas en APG, éstas muestran una producción de capsaicinoides máxima a los 30 días, de 150.143 $\mu\text{g/g/l}$, la cual es 14 veces mayor que la obtenida con células libres (10.94 $\mu\text{g/g/l}$) y 7.5 veces mayor que la producción de capsaicinoides lograda con células inmovilizadas en alginato de calcio (19.94 $\mu\text{g/g/l}$).

Esta baja capacidad de producción de capsaicinoides de los

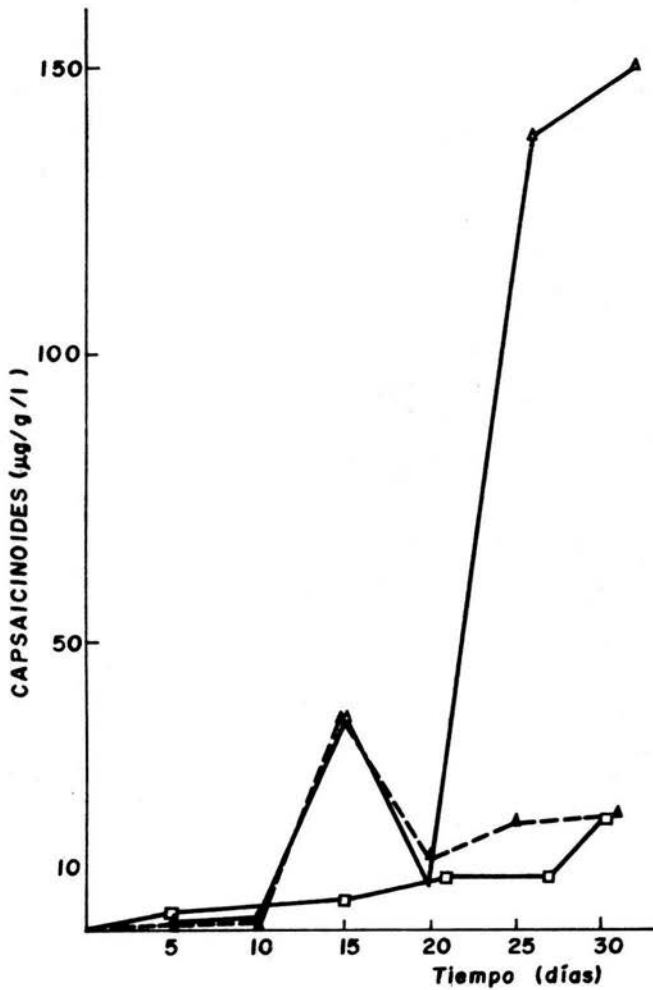


Fig. 9. PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES EN CELULAS DE *C. chinense* INMOVILIZADAS EN DIFERENTES SOPORTES.

- ▲---▲ Células inmovilizadas en Alginato.
- △—△ Células inmovilizadas en APG.
- Células en suspensión.

cultivos en suspensión, con respecto a las células inmobilizadas, que se observa en la figura 8, también es reportada por Lindsey & Yeoman (16, 19, 36), quienes consideran que en los cultivos en suspensión de células de *C. frutescens* cv *annuum*, los aminoácidos precursores de los capsaicinoides, fenilalanina y valina, tienden a formar parte integral de las proteínas. La incorporación de estos precursores es más alta cuando las condiciones de cultivo favorecen el crecimiento celular, ya que durante este proceso se incrementa la demanda preferencial de aminoácidos para la síntesis de proteínas. Aunado a ello, se presume que fenilalanina y valina también son utilizados en la síntesis de pared celular (39, 110). Holden & Yeoman (111), reportan que células de *C. frutescens* cv *annuum* utilizaron un 63% de la fenilalanina suministrada al medio de cultivo, la cual fue consumida por las células e integrada a la pared celular, ya sea en la formación de derivados del ácido hidroxicinámico o de lignina. De esta manera, el aprovechamiento preferencial de los aminoácidos en la síntesis de proteínas y pared celular, posiblemente limita la expresión de la ruta de biosíntesis de los capsaicinoides, al evitar el paso de fenilalanina-ácido cinámico, catalizado por la enzima fenilalanina-amonioliasa (PAL) y cuyos pasos dan inicio a la ruta de biosíntesis de capsaicinoides.

Sin embargo, en células inmobilizadas el sustrato es utilizado preferencialmente en la síntesis de capsaicinoides, ya que los procesos asociados con el crecimiento, síntesis de proteínas, lignina y otros componentes de la pared celular, se ven limitados por la baja disponibilidad de oxígeno, nutrientes y reguladores de crecimiento. Rosevear y Lamba (112), consideran

que la acumulación de metabolitos secundarios en el microambiente creado por la inmovilización, aunado a una difusión pobre dada por la matriz, posiblemente influya de forma positiva en la producción de éstos compuestos. Estos autores, al igual que Brodelius (108), sugieren que las condiciones de la célula dentro del gel son similares a las existentes en la planta completa y callo, lo que propicia una mejor expresión de las vías metabólicas y de algunos compuestos metabólicos importantes.

La diferencia de producción entre las células inmovilizadas en uno y otro soporte, sugiere que la inmovilización con ácido poligalacturónico es más estable que la lograda con alginato de calcio, ya que se observó ruptura de las esferúlas de alginato en un tiempo promedio de 25 a 30 días de incubación (fotografía 6), lo cual indica crecimiento de las células en el interior del polímero, así como inestabilidad de éste, que se ve acentuada por los fosfatos presentes en el medio mineral MS y/o al efecto de la agitación que provoca el roce continuo de las esferúlas con las paredes del recipiente, promoviendo el desgaste de éstas. Un comportamiento similar es descrito por varios autores (98, 113, 114, 88), quienes reportan una destrucción de las esferúlas, por efecto de agentes quelantes en el medio de cultivo, los fosfatos y el EDTA, así como por el crecimiento de las células inmovilizadas. Las esferúlas de APG presentaron mayor resistencia debido posiblemente a que la conformación química del polímero, esté facilitando la formación de uniones de tipo éster y puentes de hidrógeno con el calcio, las cuales no ocurren en alginato (56).

Cabe mencionar que existe poca información sobre el uso de

Ac. poligalacturónico, el cual se ha estado trabajando desde 1982 en el Dpto. de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, para la inmovilización de microorganismos y actualmente se está utilizando en la inmovilización de células vegetales. En un trabajo realizado por Navarro & col. (115), donde se inmovilizaron células de Sacharomices cerevisiae en pectina, para la producción de etanol, se propone a este gel como un soporte adecuado para preservar la viabilidad celular, así como la capacidad biosintética de las células. Además, se observó que este polímero retiene tanto su estabilidad como sus características morfológicas, por lo que es posible la reutilización de esférulas y células, alargando así el tiempo de producción del metabolito de interés. En trabajos realizados sobre inmovilización de células vegetales, Venek & col. (116) informan de la inmovilización de células de Solanum aviculare en geles de pectina, para la producción de verbenol, aunque no se dan mayores datos sobre los rendimientos.

Por otra parte, la figura 9, también nos muestra que las células inmovilizadas en ambos geles, siguen un comportamiento de producción de capsaicinoides similar, observándose altas y bajas en la producción, de manera periódica. Este mismo comportamiento es reportado por Lindsey y Yeoman (40), en un trabajo realizado con células de C. frutescens, inmovilizadas en espuma de poliuretano, obteniendo una producción de capsaicinoides en un período de cultivo corto (36 días) y en un cultivo continuo en un sistema de columna (92 días). El comportamiento cíclico en la producción de capsaicinoides, también es reportado por Mavituna & col. (95), quienes lo atribuyen a una inhibición por producto

final (capsaicinoides), el cual se puede evitar con la remoción continua del medio de cultivo. Lindsey (39) a su vez, propone que la inhibición se da a nivel de una o más enzimas de la ruta de biosíntesis de capsaicinoides, sin embargo hasta la fecha no existen evidencias suficientes al respecto. Fluctuaciones similares son reportadas por Jirků y col. (117) con células inmovilizadas de Solanum aviculare, para la producción de glucoalcaloides, lo cual indica que este comportamiento no es específico del género Capsicum.

En la figura 10 se compara la producción de capsaicinoides en células inmovilizadas en APG, en espuma de poliuretano y células en suspensión. En esta gráfica se observa que las células inmovilizadas en espuma de poliuretano, presentan niveles de producción similares a los obtenidos con células en suspensión, obteniéndose un máximo de 6.92 $\mu\text{g/g/l}$ en ambos a los 34 días de incubación. En cambio con las células inmovilizadas en APG se observa un incremento de capsaicinoides de hasta 57 veces (394.546 $\mu\text{g/g/l}$), durante el mismo período de tiempo.

La similitud de producción obtenida entre los cultivos de células inmovilizadas en espuma de poliuretano y los cultivos de células libres, coincide con lo reportado por Venek y col. (116) quienes trabajaron con células de Solanum aviculare para la producción de trans-verbenol. A diferencia de esto, Lindsey y col. (16, 42, 47), informan de un incremento en la producción de capsaicinoides en células inmovilizadas en espuma de poliuretano, con respecto a las células libres.

En nuestro caso la similitud de producción obtenida entre los

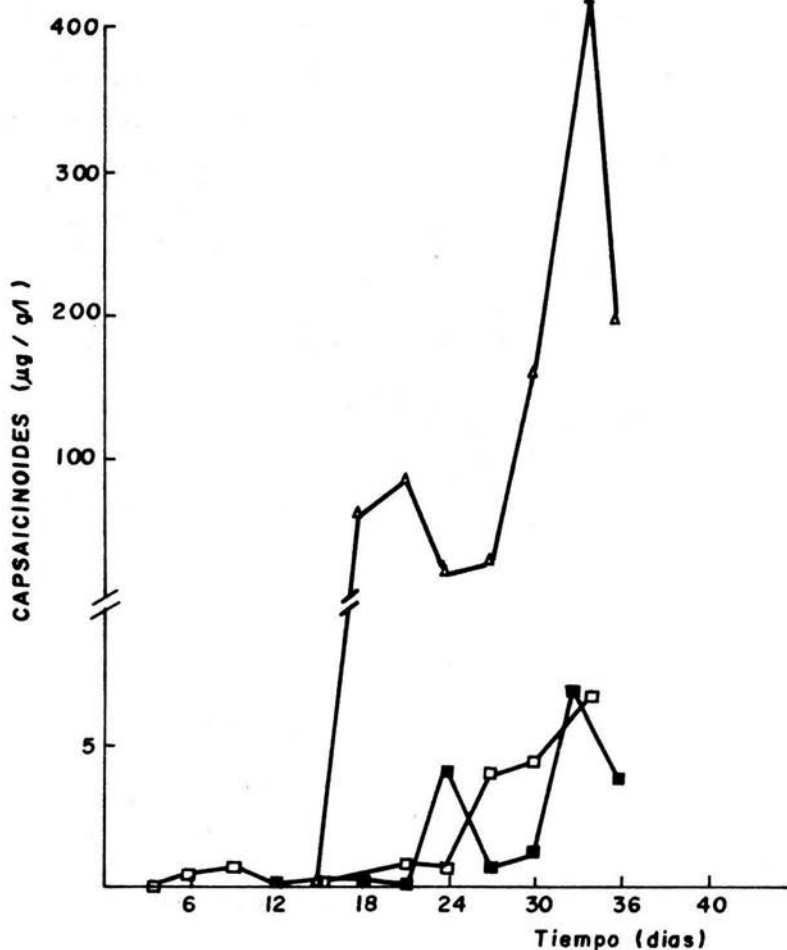


Fig. 10. PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES EN CELULAS DE C. chinense INMOVILIZADAS EN DIFERENTES SOPORTES.

- △—△ Células inmobilizadas en APG.
- Células inmobilizadas en espuma de poliuretano.
- Células en suspensión.

cultivos de células inmovilizadas en espuma de poliuretano y los cultivos de células libres puede deberse a que no consideramos algunos factores como: el número de poros por centímetro de espuma, el tamaño adecuado de los cubos de poliuretano para inmovilizar estas células, tamaño adecuado de agregados celulares a inmovilizar y la proporción entre el volumen de medio nutritivo y peso celular incubado, ya que en los trabajos de Park & Mavituna (118) se menciona que la cantidad de células atrapadas eficientemente, dependerá de las dimensiones de la matriz, así como de la cantidad de poros por partícula de poliuretano. Rhodes & col. (65) proponen que el uso de cubos mas pequeños (6 mm.) favorecen la oxigenación de las células y evitan problemas difusionales entre ellas. En cuanto al tamaño de agregados celulares inmovilizados en espuma de poliuretano Mavituna & col. (95 y 119) mencionan que durante el atrapamiento físico, la profundidad de penetración de los agregados celulares dentro de la matriz, fue determinado por el tamaño de los agregados, la distribución de los tamaños de poro en la matriz, las condiciones hidrodinámicas y la concentración de agregados en el medio de cultivo, por lo que recomiendan utilizar agregados celulares de un tamaño definido.

En lo que se refiere a la producción de capsaicinoides, obtenida con células inmovilizadas en APG ésta vuelve a presentarse en cantidades altas, confirmando que este soporte resulta adecuado para la inmovilización de células vegetales, debido a las características discutidas con anterioridad.

Aún cuando no existe información que pueda explicar la razón por la cual las células inmovilizadas en APG producen una mayor

cantidad de capsaicinoides, podrían tomarse en cuenta las consideraciones de Fukui y col. (84), quienes encontraron que las células en suspensión de Lithospermum erythrorhizon fueron capaces de producir shikonina, cuando se adicionó agar al medio de cultivo, en donde el componente responsable de la inducción fue agaropectina, un polisacárido ácido. Sin embargo, estos autores mencionan que no se conoce el mecanismo de acción, pero sugieren una posible unión entre agaropectina, con algunas proteínas de la membrana citoplasmática, las cuales pueden ocasionar cambios fisiológicos en la célula que permiten la expresión de la ruta de biosíntesis de shikonina. En nuestro caso puede estar sucediendo algo similar.

Con el fin de corroborar los bajos resultados de producción, obtenidos en células inmovilizadas en espuma de poliuretano a nivel de matraz y comprobar si la agitación de los cultivos y del medio de cultivo tiene influencia sobre dicha producción, se realizó un experimento en un reactor tipo columna con células inmovilizadas en espuma de poliuretano. Este ensayo consistió en inocular 20 cubos de espuma de poliuretano saturadas con células en la columna a la cual se hizo recircular medio nutritivo MS1. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la figura 11 en donde la producción de capsaicinoides fue mayor a la obtenida en matraz. Considerando el carácter preliminar del experimento, en éste trabajo sólo se discuten las ventajas de mantener a las células inmovilizadas en un sistema de columna con recirculación de medio de cultivo, en donde se pudo observar que las células continúan creciendo hasta aglutinarse sobre la matriz

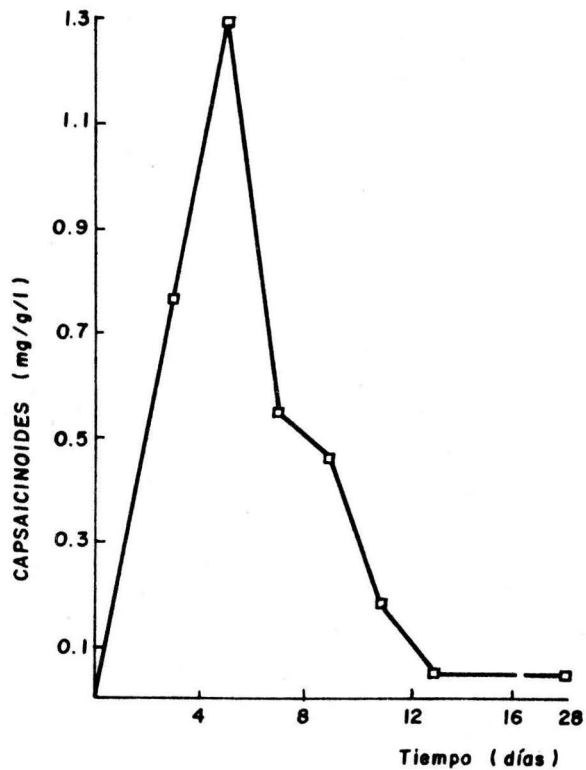


Fig. 11. PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES POR CELULAS DE C. chinense INMOVILIZADAS EN ESPUMA DE POLIURETANO.

Condiciones del experimento;
 Reactor de columna empacada (13 cm x 2.5 cm)
 Flujo: 13 ml/min.
 Volúmen inicial: 400 ml de medio MS.

liberación de células al medio, mientras que en matraz el crecimiento no fue visible, ya que la agitación continua promovió la dispersión de las células.

Por otra parte, el sistema en columna permite la adición periódica de medio nutritivo, alargando así el tiempo de producción. Lindsey & Yeoman (42) utilizando un sistema similar observaron que los nutrientes son fácilmente disponibles, debido al flujo continuo de medio que baña a las células, además permite una mayor iluminación y un ahorro de espacio con respecto al sistema de matraz.

VII. CONCLUSIONES

- * Se inmovilizaron células de *C. chinense* por atrapamiento, en alginato de calcio al 2% y ácido poliglactúronico al 4%, utilizando CaCl_2 0.15 M como solución precipitante, quitosana 2.6 %, empujando ácido acético-acetato de sodio (1.2 %, 0.001%) como solución gelificante y por absorción en espuma de poliuretano de 1 cm X 1 cm X 1 cm, cargados con agregados celulares heterogéneos.
- * El tiempo de curación para las células inmovilizadas en alginato de calcio fue de 4 a 6 horas, obteniéndose una viabilidad celular de 83% a 86%.
- * Las células inmovilizadas en ácido poligalactúronico requirieron un tiempo de "curación" de 4 hrs, manteniendo la viabilidad celular en un 46%.
- * La quitosana al 1.5 % (p/v), provocó la muerte de las células de *C. chinense*, por lo que se descartó el uso de este soporte en la inmovilización de células de *C. chinense*.
- * Las condiciones óptimas para la obtención de capsaicinoides, con los diferentes sistemas de inmovilización fueron:
 - * Cubos de poliuretano de 1 cm X 1 cm X 1 cm con un período de carga de 9 días de incubación y una concentración celular de 0.11024 g (p.s.), obteniéndose una producción máxima de 6.93 $\mu\text{g/g/l}$ a los 33 días.
 - * Con este sistema se utilizó un reactor en columna de 13 cm X 2.5 cm empacado con 20 cubos de poliuretano, con

recirculación de 400 ml de medio de cultivo MS. La velocidad de recirculación fue de 13 ml/min y un tiempo de producción de 28 días. Los niveles de producción alcanzados fueron de 1.29 mg/g/l a los 5 días de incubación.

* Con células inmovilizadas en alginato de calcio (1 g. p.f.), se obtuvo una producción máxima de capsaicinoides de 39.62 μ g/g/l en 15 días.

* Con el sistema inmovilizado en ácido poligalactúronico (2 g p.f. de células), se obtuvo una producción máxima de capsaicinoides de 163 μ g/g/l en 39 días.

De los 3 sistemas de inmovilización, el ácido poligalacturónico fue el que permitió un mejor manejo y superó los niveles de producción de capsaicinoides.

VIII. SUGERENCIAS

- * Inmovilizar en espuma de poliuretano, ensayando con diferentes tamaños de poro de la espuma, así como diferentes cultivos celulares con agregados homogéneos, con objeto de disminuir el período de carga celular de los cubos y optimizar el atrapamiento de las células, así como experimentar diferentes cortes para variar la forma de la espuma (cubos, esférulas, láminas circulares inmóviles en el fondo del matraz, etc.).

- * Realizar estudios tanto con el alginato de sodio como con el APG en combinación con otros geles como pectina, quitosana, etc., para mejorar el atrapamiento celular, así como probar la gelación de éste con cationes como: Ba^{++} , Mn^{++} , Al^{+++} , etc.

- * Llevar a cabo la inmovilización de células provenientes de una línea celular productora.

- * Implementar el uso de biorreactores que permitan el mantenimiento de las células inmovilizadas.

- * Realizar estudios tendientes a mejorar la producción de capsaicinoides, conociendo la biosíntesis de los mismos, así como el comportamiento fisiológico de la célula inmovilizada.

APENDICE

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE & SKOOG, 1962 (66).

COMPONENTES	MOLARIDAD EN EL MEDIO
MACRONUTRIENTES	
KNO ₃	1.88 x 10 ⁻²
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.50 x 10 ⁻³
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.00 x 10 ⁻³
NH ₄ NO ₃	2.06 x 10 ⁻²
MICRONUTRIENTES	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	9.99 x 10 ⁻⁵
H ₃ BO ₃	1.00 x 10 ⁻⁴
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.99 x 10 ⁻⁵
KI	5.00 x 10 ⁻⁶
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁶
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁷
FUENTE DE FIERRO	
FeSO ₄ ·8H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁴
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁴
SUPLEMENTO ORGANICO	
Tiamina-HCl	3.00 x 10 ⁻⁵
Acido nicotínico	4.66 x 10 ⁻⁶
Piridoxina-HCl	2.40 x 10 ⁻⁶
Mio-inositol	4.90 x 10 ⁻⁴
FUENTE DE CARBONO	
Sacarosa	8.80 x 10 ⁻²
pH	5.7 - 5.8

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fowler, M. W., 1983. Comercial Applications and Economic Aspect of Mass Plant Cell Culture. En: Plant Biotechnology (Mantell S. H. & H. Smith Eds.). Cambridge: Cambridge University Press., pp. 3-17.
- ✓ 2.- Long-Solis, J., 1986. Capsicum y Cultura. La Historia del Chile. Fondo de Cultura Económica. México. 180 p.
- ✓ 3.- Tapia, R., 1987. Caracterización de Capsaicinoides por HPLC Producidos en Frutos, Callos y Células en Suspensión del Género Capsicum. Tesis de Licenciatura, UNAM, México. 75p.
- 4.- Govindarajan, V. S., D. Rajalakshmi & N. Chand, 1985. Capsicum, Production, Technology, Chemistry and Quality, Part IV: Evaluation of Quality. Crit. Rev. In Food Sci. and Nutr. 25(3): 185-275.
- 5.- Susuki, T., H. Fujiwake & K. Iwai, 1984. Constituents of Red Pepper Species: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Food Science of The Pungent Principle of Capsicum Species. En: The Alkaloids (Brossi, A. Ed.). vol. XXIII. Acad. Press. Orlando, Fla. 23:227-300.
- 6.- Lindsey, K. & M. M. Yeoman. 1984. The Synthetic Potential of Immobilized Cells of Capsicum frutescens Mill. c.v. annum. Planta Medica. 162: 495-501.
- 7.- Lindsey, K., M. M. Yeoman, G.M. Black & F. Mavituna, 1983. A Novel Method for The Immobilization and Culture of Plant Cells. FEBS LETTERS. 155(1): 143-149.
- 8.- Fowler, M. W., 1986. Industrial Applications of Plant Cell Culture. In Plant Cell Culture Technology (Yeoman, M.M. Ed.) vol.23. Blackwell Scientific Publications. London England. pp.202-227.
- 9.- Balandrin, M. F. & J. A. Klocke., 1985. Natural Plant Chemicals: Source of Industrial and Medicinal Materials. Science. 228:1154-1160.
- 10.-Bell, E. A., 1981. The Physiological Role(s) of Secondary (Natural) Products. En: The Biochemistry of Plants (Conn, E.E. Ed.) vol. 7. Academic Press, N.Y., pp. 1-34.
- 11.-Vining, L. C., 1986. Secondary Metabolism. En: Biotechnology (Pope, H. & H.J. Rehm Eds.) vol. 4. VCH. F.R.G., pp. 19-38.
- 12.-López, P. V., 1985. Establecimiento de un Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. En Fundamentos Teóricos Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales (Villalobos, V.M. Ed.). CP-FAO, México, pp. 12-24.

- 13.-Shuler, M. L., 1981. Production of Secondary Metabolites from Plant Tissue Culture-Problems and Prospects. Ann. N.Y. Acad. Sci. 369:65-80.
- 14.-Yeoman, M. M., M. B. Miedzybrodzka, K. Lindsey & W. R. Mclauchlan, 1980. The Synthetic Potential of Cultured Plant Cells. En: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives (Sala, F., B. Parisi, R. Cella & O. Ciferri Eds.). Elsevier Amsterdam Biomedical Press., pp. 327-343.
- 15.-Shuler, M. L., J. W. Pyne & G. A. Hallsby, 1984. Prospects and Problems in The Large Scale Production of Metabolites from Plant Cell Tissue Cultures. JAOCs, 61(11): 1724-1228.
- 16.-Lindsey, K. & M. M. Yeoman, 1983. The Relationship Between Growth Rate, Differentiation and Alkaloid Accumulation in Cell Cultures. J. Exp. Bot., 34(145): 1055-1065.
- 17.-Brown, J. T. & B. V. Charlwood, 1986. Differentiation and Monoterpene Biosynthesis in Plant Cell Cultures. En: Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures (Morris, P., A.H. Scragg, A. Stafford & M.W. Fowler Eds.). Cambridge: Cambridge University Press., pp. 68-74.
- 18.-Collinge, M. A. & M. M. Yeoman, 1986. The Relationship Between Tropane Alkaloid Production and Structural Differentiation in Plant Cell Cultures of Atropa belladonna and Hyoscyamus muticus. En: Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures (Morris, P., A.H. Scragg, A. Stafford & M.W. Fowler Eds.). Cambridge: Cambridge University Press., pp. 82-88.
- 19.-Lindsey, K., 1986. The Production of Secondary Metabolites by Immobilized Plant Cells. En: Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures (Morris, P., A.H. Scragg, A. Stafford & M.W. Fowler Eds.). Cambridge: Cambridge University Press., pp. 143-155.
- 20.-Govindarajan, V. S., 1985. Capsicum-Production, Technology, Chemistry, and Quality. Part I: History, Botany, Cultivation and Primary Processing. Crit. Rev. En: Food Sci. and Nutri. 22(2): 109-176.
- 21.-Maga, J. A., 1975. Capsicum. Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr. 6(1): 177-199.
- 22.-SARH-INIA., 1984. Presente y Pasado del Chile en México. Publicación especial. No. 85, 1a. Reimpresión.
- 23.-Lee, K., T. Suzuki, M. Kobashi, K. Hasewa & K. Iwai, 1976. Quantitative Microanalysis of Capsaicin, Dihydrocapsaicin and Nordihydrocapsaicin Using Mass Fragmentography. J. of Chrom. 123: 119-128.
- 24.-Nelson, E. K., 1910. Capsicum. The Pungent Principle of

Capsicum and The Detection of Capsicum. J. Ind. Eng. Chem. 2: 419-421.

- 25.-Iwai, K., T. Suzuki & H. Fujiwake, 1979. Formation and Accumulation of Pungent Principle of Hot Pepper Fruits, Capsaicin and Its Analogues, in Capsicum annuum var. annuum cv. karayatsubusa, at Different Growth Stage After Flowering. Agric. Biol. Chem. 43(12): 2493-2498.
- 26.-Purseglove, J. N., E. G. Brown, C. L. Green & S. R. L. Robbins, 1981. Chillies: Capsicum spp.. Spices. Longman Group Limited. vol.1. London and New York. pp.331-439.
- 27- Iwai, K., K. Lee, M. Kobashi, T. Suzuki & S. Oka, 1978. Intracellular Localization of Capsaicinoid Synthesizing Enzyme in Sweet Pepper Fruits. Agric. Biol. Chem. 42(1): 201-202.
- 28.-Tood, P., M. Besinger & T. Biftu, 1975. TLC Screening Techniques for The Qualitative Determination of Natural and Synthetic Capsaicinoids. J. of Chrom. Sci. 13: 577-579.
- 29.-Johnson, E. K., H. C. Thompson & M. C. Bowman, 1982. Trace Analysis of Natural Capsaicinoids in Animal Feed, Human Urine and Wastewater Hig-Pressure Liquid Chromatography. J. Agric. Chem. 30: 324-329.
- 30.-Buck, H. & F. T. Burks, 1983. Capsaicin: Hot New Pharmacological Tool. Trends. Pharmacol. Sci. 4(2): 84-87.
- 31.-Ping, K., J. A. Negulerco & M. Murnane, 1982. Decreased Total Serum, Myocardial and Aortic Cholesterol Levels Following Capsaicine Treatments. IRCS Medical Sci. 10: 446-447.
- 32.-Bennet, D. J. & G. W. Kirby, 1968. Constitution and Biosynthesis of Capsicum. J. Chem. Soc. (c): 442-446.
- 33.-Leete, E. & M. C. Loudon, 1968. Biosynthesis of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum frutescens. J. Amer. Chem. Soc. 90: 6837-6841.
- 34.-Fujiwake, H., T. Suzuki, K. Iwai, 1980. Intracellular Localization of Capsaicin and Its Analogues. En: Capsicum Fruits II. The Vacuole as The Intracellular Accumulation Site of Capsaicinoid in The Protoplast of Capsicum Fruit. Plant Cell Physiol. 21(6): 1023-1030.
- 35.-Fujiwake, H., T. Suzuki & K. Iwai, 1982. Capsaicinoid Formation in the Protoplasts from The Placenta of Capsicum Fruits. Agric. Biol. Chem. 46(10): 2591-2592.
- 36.-Suzuki, T., H. Fujiwake & K. Iwai, 1980. Intracellular Localization of Capsaicinoid Synthesizing Enzyme in Sweet Pepper Fruits. Agric. Biol. Chem. 42(1): 201-202.

- 37.-Zamski, E., O. Shoham, D. Palevitch & A. Levy, 1987. Ultrastructure of Capsaicinoid-Secreting Cells in Pungent and non Pungent Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars. Bot. Gaz. 148(1): 1-6.
- 38.-Lindsey, K., 1985. Manipulation by Nutrient Limitation of The Biosynthetic Activity of Immobilized Cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. annuum. Planta. 165: 126-133.
- 39.-Lindsey, K., 1986. Incorporation of [¹⁴C] Phenylalanine and [¹⁴C] Cinnamic Acid Into Capsaicin in Cultured Cells of *Capsicum frutescens*. Phytochem. 25(12): 2793-2801
- 40.-Lindsey, K. & M. M. Yeoman, 1984. The Viability and Biosynthetic Activity of Cells of *Capsicum frutescens* Mill. c.v. annuum Immobilized in Reticulate Polyurethane. J. Exp. Botany. 35(160):1684-1696.
- 41.-Klein, J. & F. Wagner, 1983. Methods The Immobilization of Microbial Cells. En: Applied Biochemistry and Bioengineering (Wingard, L.B. & E. Katchalskikatzir Eds.). vol. 4 Academic Press. pp.11-46.
- 42.-Lindsey, K. & M. M. Yeoman, 1983. Novel Experimental System for Studying The Production of Secondary Plant Metabolites by Plant Tissue Cultures. En: Plant Biotechnology (Mantell, S.H. & H. Smith Eds.). Cambridge: Cambridge University Press., pp. 39-66.
- 43.-Kierstan M. & C. Bucke. 1977. The immobilization of microbial cells, subcellular organells, and enzymes in calcium alginate gels. Biotech. Bioeng. 12
- 44.-Brodelius, B., B. Deus, k. Mosbach & M. H. Zenk, 1979. Immobilized Plant Cells for The Production and Transformation of Natural Products. FEBS Letters. 103(1): 93-97.
- 45.-Schnabl, H., R. J. Youngman & V. Zimmermann, 1983. Maintenance of plant cell membrane integrity and function by the immobilization of protoplasts in alginate matrices. Planta. 158: 392-397.
- 46.-Borman, C. H. & A. Zachrisson, 1982. Immobilization of protoplas by anchoring to microcarriers. Plant cell Rep. 1: 151-153.
- 47.-Lindsey, K. & M.M. Yeoman, 1986. Immobilized Plant Cell. En: Plant Cell Culture Technology (Yeoman, M.M. Ed.) vol. 23. Blackwell Scientific Publications. pp.228-267.
- 48.-Rosevear, A. & C.A. Lambe, 1986. Immobilization Technology. En: Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures (Morris, P., A.H. Scragg, A. Stafford & M. W. Fowler Eds.).Cambridge: Cambridge University Press., pp. 225-236.

- 49.-Kolot, B.F., 1981. Microbial Carriers-Strategy for Selection. *Process Biochemistry*, 16(6): 30-46.
- 50.-Blanch, H.W., 1984. Immobilized Microbial Cells. En: *Annual Reports on Fermentation Process* (Tsao, G.T. Ed.) vol. 7. pp.81-87.
- 51.-Brodelius, P. & K. Mosbach, 1982. Immobilized Plant Cells. En: *Advances in Applied Microbiology* (Laskin, I. Ed.). Academic Press Inc. vol. 28. pp. 1-26
- 52.-Nilsson, K. & K. Mosbach, 1984. A General Method for Entrapment of Cells in Beaded Polymers. En: *Biotech: 83. International Conference on the commercial applications and Implications of Biotechnology*. London: Online publ. pp. 217-231
- 53.-Morris, P., A.H. Scragg, N.J. Smart & A. Stafford, 1985. Secondary Product Formation by Cell Suspension Cultures. En: *Plant Cell Culture: a Practical Approach* (Dixon, R.A. Ed.). Oxford, R.L. Press. pp. 127-167.
- 54.-Brodelius, P., 1984. Immobilized Viable Plant Cells. *Ann. N.Y. Sci.* 434: 382-393.
- 55.-Brodelius, P., 1983. Immobilized Plant Cells. En: *Immobilized Cells and Organelles* (Mattiasson, B. Ed.). vol. 1. CRC Press, Boca Raton, R.L., pp. 27-55.
- 56.-Glicksman, M., 1969. Gum Technology in The Food Industry. *Food Science and Technology*, A series of monographs. Academic Press. N. Y. & London. pp.159-190.
- 57.-Brodelius, P. & K. Nilsson, 1980. Entrapment of Plant Cells in Different Matrices. *FEBS LETTER*. 122(2): 312-316.
- 58.-Jones, A. & I. A. Veliky, 1981. Effect of Medium constituents on The Viability of Immobilized Plant Cells. *Can. J. Bot.* 54: 2095-2101.
- 59.-Vorlop, K. D. & J. Klein, 1981. Formation of Spherical Chitosan Biocatalyst Ionotropic Gelation. *Biotechnol. Lett.*, 3(1): 9-14.
- 60.-Knorr, D., 1984. Use of Chitinous Polymers in Food. *Food Technology*. 1: 85-97.
- 61.-Rha, CH., 1984. Chitosan as a Biomaterial. In *Biotechnology in The Marine Sciences* (Colwell, R.R., J.A. Sinskug, J. Wiley & Sons Eds.). USA. pp. 177-189.
- 62.-Rodriguez-Sanchez, D. & CH. Rha, 1981. Chitosan globules. *J. Food Technol.* 16: 469-479.

- 63.-Knorr, D. & R. Teutonico, 1986. Chitosan Immobilization and Permeabilization of *Amaranthus tricolor* Cells. J. Agric. Food Chem. 34:96-97.
- 64.-Galum, E. D. Aviv, A. Danted & A. Freeman, 1983. Biotransformation by Plant Cells Immobilized in Crosslinked Polyacrylamide-Hidrazide. *Planta Medica*. 49: 9-13.
- 65.-Rhodes, M. J. C., R. J. Robins, R. J. Turner & J. I. Smith, 1985. Mucilaginous Film Production by Plant Cells Immobilized in a Polyurethane or Nylon Matrix. *Can. J. Bot.* 63: 2357-2363.
- 66.-Murashige, T. & F. Skoog, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- 67.-Conner, A. J. & C. P. Meredith, 1984. An Improved Polyurethane Support System for Monitoring Growth in Plant Cell Culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* (3): 59-68.
- 68.-Mavituna, F, J. M.Park & A. K. Wilkinson, 1987. Sampling immobilized cell particles from a biorreactor. En: *Plant and animal cells process possibilities* (Weeb, C. & F. Mavituna). Ellis Horwood limited Chichester, England. pp. 266-270
- 69.-Hulst, A. C. & J. Tramper, 1989. Immobilized plant cells: a literature survey. *Enzyme Microb. Technol.* (11): 546-558.
- 70.-Magaña, P.I. (comunicación Personal).
- 71.-Stepenkus, P.L. & F.O.Lamphear, 1967. Refinement of The Triphenyl Tetrazolium Chloride Method of Determination Cold Injury. *Plant Physiol.* 42: 1423-1426.
- 72.-Towill, K. & P. Mazur, 1975. Studies on The Reduction of 2,3,5-tripheniltetrazolium Chloride as a Viability Assay for Plant Tissue Culture. *Can. J. Bot.* 53: 1097-1102.
- 73.-Rios E. (comunicación Personal).
- 74.-Rhodes, M. J. C., J. I. Smith & R. J. Robins, 1987. Factors affecting the immobilization of plant cells on reticulate polyurethane foam particles. *Appl. Microbiol Biotech. Lett.* 2(2):115-120.
- 75.-Mavituna, F. & J. M. Park, 1985. Growth of Immobilized Plant Cells in Reticulate Polyuretane from Matrices. *Biotech. Lett.* 7(9): 637-640.
- 76.-Rosevear, A. & C. A. Lambe, 1987. The Potential of Immobilized Plant and Animal Cells. En: *Process Engineering Aspects of Immobilized Cell System* (Webb, C., M.G.Black & B. Atkinson Eds.). The Institution of Chemical Engineers, England, pp. 225-237.

- 77.- Akiyama, Y., S. Eda, M. Mori & K. Kato, 1983. A galactoglucomannan from extracellular polysaccharide in suspension culture cells of *Nicotiana tabacum*. *Phytochem.* 22: 1177-1180.
- 78.-Fincher, G. B., B. A. Stone & A. E. Clark, 1983. Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34: 47-70.
- 79.-Skirvin, M. R., M. C. Cha, M. L. Mann, H. Young, J. Sullivan & T. Fermanian, 1986. Stability of Tissue Culture Medium pH as a Function of Autoclaving, Time and Cultured Plant Material. *Plant Cell Reports.* 5: 292-294.
- 80.-Viskot, B. & M. Bezdek, 1984. Stabilization of The Synthetic Media for Plant Tissue and Cell Cultures. *Biologia Plantarum.* 26(2): 132-134.
- 81.-Miyasaka, H., M. Nasu, T. Yamamoto, Y. Endo & K. Yoneda, 1986. Production of Cryptotanshinone and Ferruginol by Immobilized Cultured Cells of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochem.* 25(7): 1621-1624.
- 82.-Bidwell, S. G. R., 1979. *Plant Physiology.* 2 Ed. Mac Millan publishing Co. Inc. New York. pp.259.
- 83.-Baker, A. D., 1983. Uptake of Cations and their Transport within Plant. En: *Metals and Micronutrients Uptake and Utilization by Plants* (Robb, A.D. & S.W. Pierpoint Eds). Academic Press, Inc. London. pp. 13-14.
- 84.-Fukui, H., N. Yoshikawa & M. Tabata, 1983. Induction shikonin production by agar in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Phytochem.* 22(11): 2451-2453.
- 85.-Rocheffort, E. W., T. Rehg & P. C. Cham, 1986. Trivalent Cation Stabilization of Alginate Gel for Cell Immobilization. *Biotech. Lett.* 8(2): 115-120.
- 86.-Brodelius, P. 1985. Immobilized plant cells: preparation and biosynthetic capacity. En: *Immobilized cells and enzymes, a practical approach.* (Woodward, J. Ed.) IRL Press. Oxford. Washington D. C. pp. 127-145.
- 87.-Tanaka, H., M. Matsura & I. A. Veliky, 1984. Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-Alginate Gel Beads. *Biotechnology and Bioengineering.* 26:53-58.
- 88.-Wichers, H. J., T. M. Malinere & H. J. Hulzing, 1983. The Effect of some Environmental Factors on the Production of L-DOPA by Alginate-entrapped Cells of *Mucuna pruriens*. *Planta.* 159:482-486.
- 89.-Felix, H., P. Brodelius & K. Mosbach, 1981. Enzyme Activities of the Primary and Secondary Metabolism of Simultaneously

Permeabilized and Immobilized Plant Cells. Anal. Biochem. 166: 462-470.

- 90.-Deus-Neuman, B. & M. H. Zenk, 1984. Instability of indole alkaloid Production in Catharanthus roseus Cell Suspension Cultures. Planta Med. 50: 427-431.
- 91.-Tabata, M. & N. Hiraoka, 1976. Variation of Alkaloid Production. En: Nicotiana rustica Callus Cultures. Physiol. Plant. 38:19-23.
- 92.-Hulst, A. C., J. Tramper, P. Brodelius, L. J. C. Eijkenboom, 1987. Immobilized plant cells: respiration and oxygen transfer. En: Plant cells: Immobilization and oxygen transfer. (A. C. Hulst, Ed.). pp.65-75.
- 93.-Gosman, B. & H. R. Jurgen, 1986. Oxygen Uptake of Microorganism entrapped in Ca-alginate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 163-167.
- 94.-Anderson, G. J., 1986. Immobilized Cell Physiology. En: Process Engineering Aspects of Immobilized Cell System (Webb, C., M.G. Black & B. Atkinson Eds.). The Institution of Chemical Engineers, England. pp. 153-176.
- 95.-Mavituna F., J. M. Park, A. K. Wilkinson & D. Williams, 1987. Characteristic of Immobilized plant cell reactors. En: Plant and Animal cells Process Possibilities. (C. Webb and F. Mavituna Eds). Ellis Horwood Ltd. Chichester England pp. 111.
- 96.-Hulst C. A., M. M. T. Meyer, H. Breteler & J. Tramper, 1987. Effect of aggregate size in cell cultures of Tagetes patula on thiopheno production and cell growth. En: Plant cells: Immobilization and oxygen transfer (A. C. Hulst Eds.). pp. 99-114.
- 97.-Jones, A. & I. A. Veliky, 1981. Examination of Parameters Affecting the 5-B Hydroxylation of Digitoxigenin by Immobilized Cells of Daucus carota. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13: 84-89.
- 98.-Dainty, L. A., K. H. Goulding, P. K. Robinson, I. Simpkins & M. D. Trevan, 1986. Stability of Alginate-Immobilized Algal Cells. Biotech. Bioeng. 28: 210-216.
- 99.-Holden, P. R., M. Aitken, K. Lindsey & M. M. Yeoman, 1986. Variability and Stability of cell culture of Capsicum frutescens. En: Secondary metabolism in plant cells cultures (Morris, P., A. H. Scrag, A. Stafford & M. W. Fowler, Eds.) Cambridge University Press. pp. 237-234.
- 100.-Dougall, D. K., 1985. Chemical from plant cell cultures: yields and variation. En: Biotechnology in plant Science (Zaitlin, M., P. Day & Hollaender, Eds.) Academic Press.

Inc. USA. pp. 174-190.

- 101.-Holden, P. R., M. A. Holden & M. M. Yeoman, 1988. Variation in the secondary metabolism of cultured plant cells. En: The manipulation secondary metabolism in culture (Robins, R. & M. Rhodes Eds.) Cambridge University Press. pp.16-28.
- 102.-Beaumont, D. M. & D. Knorr, 1987. Effects of Immobilizing Agents and Procedures on Viability of Cultured Celery (*Apium graveolens*) Cells. *Biotech. Lett.* 9(6): 377-382.
- 103.-Bihari-Varga, M., C. Sepulchre & E. Maczár, 1975. Thermoanalytical Studies on Protein Polysacchacaride Complex of Connective Tissues. *J. Termal Annal.* 7: 675-683.
- 104.-Muzzarelli, A. A., 1977. Chitin. Pergamon Press, England. pp. 45-86.
- 105.-Kohle, H., D. H. Young & H. Kaus, 1984. Physiological changes in suspension-cultured soybean cells elicited by treatment with chitosan. *Plant Sci. Lett.* 33: 221-230.
- 106.-Young, H. D., H. Kohle & H. Klaus, 1982. Effects of Chitosan on Membrane Permeability of Suspension Cultured *Glycine max.* and *Phaseolus vulgaris* Cells. *Plant Physiol.* 70: 1449-1454.
- 107.-Young, H. D., & H. Klaus, 1983. Release of Calcium from Suspension Cultured *Glycine max* Cells by Chitosan, Other Polycations and Polyamines in Relation to Effects on Membrane Permeability. *Plant Physiol.* 73: 698-702.
- 108.-Brodelius, P., B. Deus, K. Mosbach & M. H. Zenk, 1981. European Patent Application 8085011050.
- 109.-Dainty, A. L., Goulding, 1985. Effect of Immobilization on plant physiology-real or imagined? *Trends Biotechnol.* 3 (3):59.
- 110.-Hall, R., M. A. Holden & M. M. Yeoman, 1987. The accumulation of phenylpropanoid and capsaicinoid compounds in cell cultures and whole fruit of the chilli pepper, *C. frutescens* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ.* 8: 163-176.
111. Holden A. M. & M. M. Yeoman. 1987. International conference on bioreactor and biotransformation (Moody, N. G. & P. B. Baker Eds). Elsevier Applied Science Publishers LTD. pp.7.
- 112.-Rosevear, A. & C. A. Lambe, 1983. Immobilised plant and animal cell. En: Topics in Enzyme and Ferment Biotechnol. (A. Wiseman, PH. D.F.R.I.C., M.I.Biol. Eds). Ellis Horwood Limited Chichester London. Vol 7: pp. 13.
- 113.-Birnbaum, S., R. P. G. Larson & K. Mosbach, 1981. Covalent stabilization of Alginate gel for the Entrapment of living

- Whole cells. *Biotech. Lett.* 3 (8): 393-400.
- 114.-Watts, M. J. & H. A. Collin. 1985. Growth and nutrient uptake by Immobilized tissue culture cells of Celery (*Apium graveolens*). *Plant. Sci.* 42: 67-72.
- 115.-Navarro, A. R., M. C. Rubio & D. A. G. Callieri. 1983. Production of ethanol by yeasts immobilized in Pectin. *Eur. J. Appl. Biotechnol.* 17: 148-151.
- 116.-Venek, T., T. Macek, K. Stransky. 1988. En: International Symposium of secondary products from plant tissue culture. (I. R. Hutchinson Ed). Kings College London. pp.68.
- 117.-Jirku, V., J. Venek, V. Kromphazl, V. Kubanek. 1981. Continuous production of steroid glycoalkaloids by Immobilized plant cell. *Biotech. Lett.* 3(8): 447-450.
- 118.-Park, M. J. & F. Mavituna. 1986. Factors affecting the Immobilization of plant cells in biomass support particles. En: Process Engineering Aspects of Immobilized cell system. (Webb, C., M.G. Black & B. Atkinson Eds.). The Institution of Chemical Engineers, England. pp. 259-302.
- 119.-Mavituna, F. A. K. Wilkinson & P. D. Williams. 1987. A Technique for rapid production of plant-cell suspension culture from callus culture. En: Plant and Animal Cells. Process Possibilities (Webb, C., M.G. Black & B. Atkinson Eds.). Ellis Horwood Limited Chichester England. pp. 263-266.