



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

Casa abierta al tiempo

**Establecimiento de un cultivo de células en suspensión
de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C.
Johnst. para la producción de goma de mezquite**

TESIS

para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

PRESENTA

José Luis Trejo Espino

Director

Dr. Francisco Cruz Sosa

Co-director

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Diciembre del 2010

“El posgrado en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio 471-01/Doctorado en Biotecnología”

México D.F. a ____ de _____ del 2010

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst para la producción de goma de mezquite

que presentó

José Luis Trejo Espino

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Co-director: Dr. Mario Rodríguez Monroy
CeProBi-IPN

Asesor: Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Jurado:

Presidente: Dr. Jaime E. Vernon Carter _____

Secretario: Dr. Sergio Huerta Ochoa _____

Vocal: Dr. Juan Orozco Villafuerte _____

Vocal: Dra. Kalina Bermúdez Torres _____

A mi Esposa e Hijas: Gaby, Paty y Fer

A mis Papás: Sotero y Martha

Y a mis Hermanos: Héctor, Rocío, Nena, Silvia, Horacio, Beto, Jano y René

AGRADECIMIENTOS:

Al Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, por haberme permitido “regresar” y por brindarme la oportunidad y apoyo para realizar mis estudios de Doctorado.

Al Instituto Politécnico Nacional por la Licencia con goce de sueldo que me otorgó a través del Consejo Técnico de Prestaciones a Becarios (COTEPABE), para realizar mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de esta Tesis (registro 204451).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyectosy a la Secretaria de Investigación y Posgrado del IPN proyectos.....que financiaron esta Tesis.

A mi comité tutorial, doctores Francisco Cruz Sosa, Mario Rodríguez Monroy y Jaime E. Vernon Carter, por el tiempo que invirtieron en las acertadas sugerencias durante el trabajo experimental y escritura de los artículos y tesis.

A los miembros del Jurado de examen, doctores Jaime E. Vernon Carter, Sergio Huerta Ochoa, Juan Orozco Villafuerte y Kalina Bermúdez Torres, por sus sugerencias y el tiempo que invirtieron en la revisión de Tesis y en la presentación de mi examen.

Al Dr. Antonio Jiménez Aparicio por todo el apoyo que me ha brindado desde mi llegada al CeProBi.

A mis compañeros del Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN, por el apoyo brindado para poder solicitar el permiso con goce de sueldo y realizar mis estudios de doctorado.

A todos los amigos y compañeros que me han acompañado durante mi formación personal y profesional. Me es difícil nombrarlos individualmente, sin embargo estoy seguro que saben a quienes me refiero: Los de mi Pueblo; UAM-I (Hidros, Lab R003); CINVESTAV; UTTT; CeProBi, Yautepec y más.....

INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS Y CARACTERES GRIEGOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	viii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst.	1
1.2 Gomosis	4
1.3 Propiedades funcionales de la Goma de mezquite	6
1.4 Cultivo de células vegetales	10
1.5 Cultivos <i>in vitro</i> de <i>P. laevigata</i>	15
1.6 CCV en suspensión para la producción de goma	16
2 JUSTIFICACIÓN	19
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1 Hipótesis	20
3.2 Objetivo General	20
3.3 Objetivos Particulares	20
4 MATERIALES Y METODOS	21
4.1 Plan de trabajo	21
4.2 Escarificación, desinfección y germinación de semillas	22
4.3 Obtención de explantes e Inducción de callo	22
4.4 Establecimiento de las suspensiones celulares	23
4.5 Crecimiento en matraz	24
4.6 Crecimiento en biorreactor	24
4.7 Evaluación de los parámetros de transferencia de oxígeno (OTR y OUR)	25
4.8 Determinación de crecimiento celular	27
4.9 Viabilidad celular	27
4.10 Caracterización morfológica de las células crecidas en matraz y biorreactor	27
4.11 Purificación de Gomas	28
4.12 Contenidos totales de proteína, azúcares, y ac. glucurónico	28
4.13 Azúcares neutros	29
4.14 Identificación y cuantificación de AGPs	29
4.15 Preparación de emulsiones	30
4.16 Actividad y estabilidad emulsificante por densidad óptica	30
4.17 Determinación de la tasa de coalescencia en las emulsiones	30
5 RESULTADOS Y DISCUSION	32
5.1 Obtención de plántulas e inducción de callo	33

5.2	Cinéticas de crecimiento en matraz y biorreactor	36
5.3	Caracterización morfológica de las células crecidas en matraz y biorreactor	37
5.4	Transferencia y requerimientos de oxígeno en el biorreactor	42
5.5	Caracterización química de las gomas obtenidas <i>in vitro</i>	45
5.6	Propiedades emulsificantes	49
5.7	Estabilidad de las emulsiones	51
6	CONCLUSIONES	55
7	REFERENCIAS	56
8	ANEXOS	66

Figura 1	Árbol de <i>Prosopis laevigata</i>	3
Figura 2	Goma de mesquite	7
Figura 3	Estructura primaria del componente polisacárido de la goma de mesquite	8
Figura 4	Concentración de auxinas/citocininas utilizadas en CCV	14
Figura 5	Biorreactor utilizado en el crecimiento de células de <i>P. laevigata</i>	25
Figura 6	Inducción de callo de <i>P. laevigata</i>	33
Figura 7	Crecimiento y viabilidad de células de <i>P. laevigata</i> crecidas en matraz y biorreactor	38
Figura 8	Fotomicrografías de células en suspensión de <i>P. laevigata</i>	40
Figura 9	Requerimientos de oxígeno de células de <i>P. laevigata</i> crecidas en biorreactor	44
Figura 10	Crecimiento celular y producción de AGPs de células de <i>P. laevigata</i> crecidas en matraz y biorreactor	47
Figura 11	Emulsiones aceite/en agua preparadas con GM y las producidas <i>in vitro</i>	49
Figura 12	Actividad y estabilidad de las emulsiones	50
Figura 13	Distribución del tamaño del tamaño de gota en las emulsiones	53

Cuadro 1	Efecto de los RCV y tipo de explante en la inducción de callo	34
Cuadro 2	Tamaño y forma de agregados celulares de <i>P. laevigata</i> crecida en matraz	39
Cuadro 3	Tamaño y forma de agregados celulares de <i>P. laevigata</i> crecida en biorreactor	41
Cuadro 4	Caracterización química de las gomas	46
Cuadro 5	Tasa de coalescencia y d_{30} de las emulsiones	54

ABREVIATURAS

AGPs	Arabinogalactano-proteínas
ANA	Acido α -Naftalen acético
BAP	6-Benzil aminopurina
CCV	Cultivo de células vegetales
CIN	Cinetina
d₃₀	Diámetro promedio de las gotas de aceite
QO₂	Consumo específico de O ₂
FFE	Factor de forma elíptica
GA	Goma arábiga
GM	Goma de Mezquite
GMc	Exudado tipo goma producido por callos
GMb	Goma de mezquite purificada de matraces
GMm	Goma de mezquite purificada de biorreactor
K_c	Constante de coalescencia de las gotas de aceite
K_{la}	Coefficiente volumétrico de transferencia de O ₂
MS	Medio Murashige Skoog
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal

t_d	Tiempo de duplicación
2,4-D	Acido 2,4-Diclorofenoxi acético
2,4,5-T	Acido 2,4,5-Triclorofenoxi acético
μ	Velocidad específica de crecimiento

Resumen

La goma de mezquite (GM) es un exudado que producen los árboles del género *Prosopis* en sus ramas y troncos, como una respuesta a diferentes condiciones de estrés. La GM es considerada como una Arabinogalactano-proteína (AGP) del tipo II y se ha demostrado tiene una aplicación como emulsificante, debido a su capacidad para formar membranas viscoelásticas en una interfase aceite-agua. Además, también funciona como agente microencapsulante de lípidos por sus propiedades térmicas que le ayudan a actuar como barrera a la transferencia de oxígeno.

La búsqueda de alternativas tecnológicas para la producción de sustancias naturales de interés para el hombre, como la GM, ha conducido a buscar sistemas de estudio que permitan realizar investigaciones pertinentes para ello. En consecuencia, en este estudio se propuso utilizar al cultivo de células y tejidos vegetales (CCV) para lograr el establecimiento de una línea de células en suspensión de *P. laevigata* productora de GM, caracterizar su crecimiento a nivel de matraz y biorreactor y verificar si mantiene las propiedades funcionales presentes en la GM producida por árboles silvestres.

Para la obtención de callo se probaron 12 tratamientos con distintas combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) a 3 concentraciones: 0.5; 5.0 y 10 μM , sobre 3 tipos de explante: hipocótilo, cotiledón y hoja. Los tratamientos con 2,4,5-T + CIN y 2,4,5-T + BAP a una concentración 5.0 μM e hipocotilo como explante, resultaron los más eficientes para inducir callo (100%). Los callos provenientes del tratamiento con 2,4,5-T + CIN, presentaron un color verde claro y una consistencia suave al tacto, y en su superficie se observó la formación de un exudado tipo GM (goma de callo, GMc), por lo que se utilizaron para iniciar un CCV en suspensión de *P. laevigata*.

El CCV en suspensión se desarrollo a nivel de matraz y en biorreactor tipo tanque agitado. En matraz, se alcanzó una biomasa máxima de 11.9 g de ms/L y una μ de 0.14 d^{-1} . En contraste, en el biorreactor la biomasa máxima fue de 16.6 g de ms/L,

con una μ de 0.08 d^{-1} . La viabilidad en ambos sistemas no fue menor al 60% durante la cinética de crecimiento.

La caracterización morfológica de los agregados celulares mostró que cuando el cultivo crece en matraz el tamaño de los agregados se incrementa en 0.026 mm^2 , mientras que cuando crecen en biorreactor, el tamaño permanece constante (ca. 0.065 mm^2). En relación a su forma, el factor de forma elíptica (FFE) disminuyó durante el crecimiento, independientemente del sistema utilizado, presentando valores cercanos a 2.5 al final del crecimiento indicando que los agregados cambian de formas alargadas a redondas. La velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) presentó valores superiores (ca. 2.5 veces) a la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) durante todo el cultivo, lo que significa que las condiciones de aireación y agitación en el biorreactor fueron las apropiadas para asegurar que el cultivo no estuviera limitado por oxígeno.

El análisis químico en el medio de cultivo al final de la cinética de matraces y biorreactor, mostró que esta línea celular secreta AGPs, proteína y polisacáridos, componentes principales de la GM producida por árboles silvestres, durante su crecimiento *in vitro*. Este resultado reforzó la hipótesis de que estos compuestos poseen las características emulsificantes presentes en la GM.

Se prepararon emulsiones aceite en agua con soluciones acuosas de GM, exudado tipo goma de callos (GMc), goma obtenida en matraces (GMm) y goma obtenida en el biorreactor (GMb), y se evaluaron sus propiedades emulsificantes a través del método de densidad óptica. No se presentó una diferencia significativa en la capacidad emulsificante de las emulsiones, sin embargo, si la hubo en la estabilidad emulsificante, presentando una mejor estabilidad la emulsión con GM. Se determinó por análisis de imágenes, el diámetro promedio ($d_{3,0}$) de las gotas de aceite en las emulsiones como una función del tiempo, no se encontraron diferencias en el $d_{3,0}$ de las emulsiones recién formadas, sin embargo el $d_{3,0}$ después de 72 h fue menor para la emulsión con GM ($2.1 \mu\text{m}$) que para las de GMm y GMb (3.1 y $3.6 \mu\text{m}$ respectivamente), lo que significa que la GM provee una mayor estabilidad a la emulsión. Un mecanismo que promueve la pérdida de estabilidad es la coalescencia

de las gotas de aceite, esta se caracteriza por una ampliación en la distribución de tamaño de partículas, con un incremento en el tamaño promedio de gotas con el tiempo. Así, se utilizó el $d_{3,0}$ de las emulsiones y se calculó la tasa de coalescencia (C) de las gotas de aceite. Los resultados mostraron que la GM presenta una $C = 6.02 \times 10^{-6}$, menor a la que se obtuvo para la GMm ($C = 2.39 \times 10^{-5}$) y GMb ($C = 3.81 \times 10^{-5}$) lo que corrobora que las emulsiones con GM son más estables que las formuladas con GMm y GMb.

En suma, se logró el establecimiento del cultivo de células en suspensión, la línea celular mostró su capacidad para crecer a nivel de matraz y biorreactor y se comprobó que secretan AGPs, proteínas y polisacáridos al medio de cultivo, que le confieren propiedades emulsificantes.

Abstract

Mesquite gum (MG) is an exudate that produced by trees of genus *Prosopis* in its branches and trunks, as a response to different stress conditions. The MG is regarded as an Arabinogalactan-protein (AGP) of type II and has been shown to have an application as emulsifier, due to its ability to form viscoelastic films in an oil-water interface. In addition, it also works as a lipid microencapsulating agent by its thermal properties that help to act as a barrier to oxygen transfer. The search for technological alternatives, for production of natural substances of interest to man, such as MG, has led to search of systems to carry out research studies relevant to this. Consequently, in this study plant cell culture (PCT) was used to achieve the establishment of a MG producing *P. laevigata* cell suspension line, to characterize their growth at flask and bioreactor level and to verify if MG preserves the functional properties present in wild trees. To obtain callus were tested 12 treatments with different combinations of plant growth regulators (PGR) at 3 concentrations: 0.5, 5.0 and 10 μM on 3 types of explants: hypocotyl, cotyledon and leaf. Treatments with 2,4,5-T + KIN and 2,4,5-T + BAP at 5.0 μM and hypocotyl as explant, were the most efficient to induce callus (100%). The callus from treatment with 2,4,5-T + KIN, had a light green color, smooth to the touch, and an exuded gum-like substance (MGc) was observed on its surface; this callus were used to initiate a *P. laevigata* cell suspension culture (CSC).

P.laevigata CSC was developed at Erlenmeyer flask and stirred tank bioreactor type. In the Erlenmeyer flask, the biomass reached a maximum of 11.9 g dm/L and a μ of 0.14 d⁻¹. In contrast, in the bioreactor maximum biomass was 16.6 g dm/L with a μ of 0.08 d⁻¹. The viability in both systems was not less than 60% during the growth kinetics. Morphological characterization of cell aggregates showed that when the culture is grown in a Erlenmeyer flasks the size of aggregates increases by 0.026 mm², whereas when grown in the bioreactor, the size remains constant (ca. 0.065 mm²). In relation to its shape, the elliptical form factor (EFF) decreased during growth period, regardless of the system used, with values close to 2.5 at the end of growth, indicating that the aggregates shape change from elongated to round.

The oxygen transfer rate (OTR) had higher values (ca. 2.5 times) to the oxygen uptake rate (OUR) during the culture in the bioreactor, which means that the conditions of aeration and agitation were appropriate to ensure that the culture was not limited by oxygen.

Chemical analysis of gums from flasks and bioreactor, showed that *P. laevigata* cell line secreted AGPs, protein and polysaccharides, the main components of the MG produced by wild trees. Oil in water emulsions were prepared with aqueous solutions of MG, exuded gum-like substance (MGc), gum from flasks (MGm) and from bioreactor (MGB), and emulsifying properties were measured by optical density method. Not a significant difference in the emulsifying capacity of the emulsions was found, however, they showed a better emulsion stability with MG. The mean diameter ($d_{3,0}$) of the oil droplets in emulsions was determined by image analysis. There were no differences in the $d_{3,0}$ newly formed emulsion, but the $d_{3,0}$ after 72 h was lower for the emulsion with MG (2.1 μm) than for MGm and MGB (3.1 and 3.6 μm , respectively). This means that GM provides more stability to the emulsion. A mechanism that promotes the loss of stability is the coalescence of oil drops, this is characterized by an increase in the size distribution of particles, with an increase in the mean droplet size over time. Thus, we used $d_{3,0}$ of emulsions and calculate the rate of coalescence (C) of the oil droplets. The results showed that MG has a $C = 6.02 \times 10^{-6}$, less than that obtained for the MGm ($C = 2.39 \times 10^{-5}$) and the MGB ($C = 3.81 \times 10^{-5}$). This confirms that the emulsions with MG are more stable than those made with MGm and MGB.

The *P. laevigata* cell suspension culture was successfully established; the cell line showed its ability to grow on flask and bioreactor and found to secrete AGPs, proteins and polysaccharides to the culture medium, which give emulsifying properties.

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M. C. Johnst

Se han descrito alrededor de 50 especies del género *Prosopis* en todo el mundo (Figueiredo, 1990). 42 especies están presentes en el continente Americano en dos grandes localidades: Norte América (México y el Sur-Oeste de los Estados Unidos) y Sur América (Argentina, Paraguay y Chile). También han sido introducidas en zonas áridas del Este de la India, Australia, África y principalmente en Hawaii (Vernon-Carter y col., 2000). En nuestro país, están presentes 10 especies del género *Prosopis*, que crecen en las áreas de la costa del océano Pacífico (desde Sinaloa hasta Chiapas), en Sonora, la Península de Baja California y en el centro y sur del País. Entre estas especies se encuentra *Prosopis laevigata*, que predomina en la meseta del Norte y Centro de México.

Clasificación taxonómica:

Familia: Fabaceae (alt. Leguminoseae)

Subfamilia: Mimosoidae

Género: *Prosopis*

Especie : *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst.

Sinonimias: *Prosopis dulcis* Kunth, *Algorobia dulcis* (Kunth) Benth, *Mimosa rotundata* Sessé et Moc., *Neltuma laevigata* (Willd.) Britt. et Rose.

De acuerdo a la región en donde crece recibe diferentes nombres comunes: Mezquite (es el mayormente utilizado); útuh (huasteco); chúcata, tirtzecua (tarasca) en Michoacán; algarrobo en Colima, Jalisco y Nayarit.

P. laevigata es un árbol o arbusto (figura 1) que se desarrolla preferentemente en zonas áridas y semiáridas, se puede encontrar a diferentes altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2,050 msnm, alcanza alturas hasta de 15 m con lo que crea bajo su copa condiciones muy favorables para el desarrollo de otras plantas herbáceas. En sus raíces crecen simbióticamente bacterias del género *Rhizobium*, por lo que es considerado como una planta fijadora de nitrógeno. Forma parte del matorral espinoso o “Selva baja espinosa subcaducifolia”. También se distribuye en forma aislada entremezclado con plantíos o cultivos anuales como el maíz y alfalfa, así como en laderas riolíticas o en terrenos aluviales con vegetación muy alterada (<http://www.rlc.fao.org/redes/sisag/arboles/Mex-pr-l.htm>).

Su madera es dura y pesada, en el centro es café onegra, muy durable por su dureza y consistencia. Las hojas son bipinadas, las flores se encuentran agrupadas en inflorescencias en espigas, son sumamente pequeñas y producen un aroma y néctar agradable para la polinización. Su fruto es una vaina, en donde se alojan las semillas que tienen el tamaño menor al de un frijol, en forma aplastada o aplanada. Sus ramas presentan espinas laterales.

P. laevigata es una especie con alto grado de agresividad o capacidad colonizadora en áreas perturbadas, por lo que su regeneración puede darse por rebrote o retoño y por semilla. Ese último mecanismo se ve favorecido ya que generalmente cada año grandes cantidades de vainas y semillas se producen, lo que ayuda a la dispersión natural de la especie a través de la diseminación zocora y endozoica, es decir, a través del aparato digestivo de animales como borregos y cabras.

Prácticamente toda la planta de mezquite y sus productos son aprovechados, la madera es utilizada para fabricar duela, madera aserrada y parquet, para hacer mangos de herramientas, hormas para zapatos en escala industrial, y como leña y carbón de muy buena calidad por su alto poder calorífico. Las hojas y vainas se utilizan como forraje para el ganado, las vainas tienen un alto valor nutritivo y de ellas

se puede obtener harina que en una proporción de entre el 20 y 60% es mezclada con harina de maíz, alfalfa, zacate, salvado, alfalfa molida, pasta de cacahuete o linaza y se adiciona al forraje. De la corteza se extraen curtientes, además los troncos y ramas se usan como postes para cercas.



Figura 1 Árbol silvestre de *Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst. (Mesquite).

Los árboles del son apreciados como planta melífera y se ha reportado que tiene usos medicinales (Vernon-Carter y col., 2000). La goma diluida en agua se usa para hacer gárgaras y contra la disentería, el cocimiento de las hojas y de renuevos o el zumo de éstos, se emplea contra la inflamación de ojos. También la infusión para el tratamiento de salpullidos. El cocimiento de la corteza de las ramas jóvenes (en agua o leche), se da a tomar a los bebés para aliviar los cólicos.

En años recientes se ha mostrado un interés creciente y especial en el exudado (goma de mezquite; GM) que producen los árboles en sus ramas y troncos como respuesta al estrés (López-Franco *y col.*, 2008) Principalmente porque presenta propiedades funcionales que se comparan con las de la goma arábica (GA), que es la goma natural mayormente utilizada a nivel comercial en industrias como la farmacéutica y la alimentaria.

1.2 Gomosis

La gomosis es el proceso de acumulación y exudación de gomas que presentan los árboles. Estas gomas están formadas principalmente por polisacáridos proteínas y ácidos urónicos en algunas especies de plantas. Se sabe que la gomosis se presenta como una respuesta común a diferentes condiciones de estrés ambiental, heridas, infección por patógenos o ataques de insectos (Skrzypek *y col.*, 2004). El papel fisiológico de la goma en plantas no está totalmente claro, se piensa que su función es limitar el área invadida por hongos, insectos y bacterias patógenas aislando el tejido infestado o infectado del tejido sano. La goma exudada tiene también un papel protector, sella las heridas y las zonas dañadas, además ayuda a ocluir los conductos del xilema, previniendo con esto, tanto la pérdida de agua como la invasión de patógenos dentro de la planta. Esto último se debe también a que algunos compuestos fenólicos son atrapados en la matriz de la goma y estas sustancias participan en la defensa de la planta, además de que la polimerización de dichos compuestos para formar polifenoles, resulta en goma de color café o amarilla. En consecuencia, la formación de goma es un proceso positivo para las plantas.

La gomosis es común en diferentes tipos de árboles, pero está mayormente estudiada en los frutales como el durazno, ciruelo, cerezo y chabacano. Diversos reportes coinciden en que la producción de goma en muchas plantas, esta mediada por etileno (Olien *y col.*, 1982). También se ha demostrado que tanto el ácido

jasmonico, el metil jasmonato y compuestos relacionados, conocidos como jasmonatos, juegan un papel importante en la ruta de traducción de señales en respuesta al estrés (Skrzypek y col., 2004). En este sentido, se sabe que el etileno junto con el metil jasmonato intensifican su acción en la gomosis, además de que ambos están implicados en la promoción de la senescencia de la planta.

Los árboles de *P. laevigata* exudan una goma natural que está estudiada químicamente desde los años 50s, no obstante hay muy poca información publicada con respecto a los factores bióticos o abióticos que regulan el proceso (Vilela y Ravetta, 2005). Al respecto, Anderson y Farquhar (1982), mencionan que distintas condiciones fisiológicas de estrés como calor y sequías extremas pueden promover una mayor producción de goma. Además que el flujo de la goma puede estimularse rociando las hojas con un agente defoliante, provocando daño mecánico al tronco principal con cadenas metálicas y aplicando ácido sulfúrico.

Con el objetivo de inducir una mayor cantidad de GM en árboles silvestres que la que estos producen de manera natural, Vilela y Ravetta (2005) realizaron heridas en el tronco principal y algunas ramas de 5 individuos de 3 especies de *Prosopis*, lo que ayudó a obtener una mayor producción de goma con respecto a los organismos no tratados. Sin embargo, en su estudio no obtienen información de el mecanismo que provocó este aumento y sólo proponen que esto puede tener como base la hipótesis del balance Carbono/Nitrógeno. Esta sugiere que en casos de baja disponibilidad de nutrientes, los carbohidratos no estructurales totales se acumulan debido a la reducción del crecimiento, sin tener una fuerte limitación en la asimilación del CO₂. Lo que a su vez puede disparar la incorporación del exceso de carbono en productos como las gomas vegetales.

Por otro lado, hay evidencias que gomas vegetales son empleadas de manera práctica por el hombre en diversas áreas (Verbeken y col., 2003). En particular, la GA proveniente de *Acacia senegal*, goma tragacanto proveniente de *Astragalus spp*,

goma karaya proveniente de *Sterculia spp.* y la GM proveniente de *Prosopis laevigata* han sido utilizadas en la industria farmacéutica y alimentaria.

Las gomas vegetales pertenecen a la familia de los polisacáridos y tienen una estructura compleja y muy ramificada compuesta por diferentes unidades de azúcares neutros y ácidos urónicos, que pueden ser identificados después de una hidrólisis de sus enlaces glicosídicos. En general estas gomas poseen una cadena central de polisacárido compuesta por unidades de D-galactopiranososa con cadenas laterales de L-arabinofuranosa, L-ramnopiranososa y ácido glucurónico. La cadena central también puede estar compuesta por un copolímero de arabinosa y galactosa con ramnosa y ácido glucurónico en sus cadenas laterales, además de que algunas de ellas presentan un esqueleto proteico en su estructura que puede también cambiar en cantidad y composición. Dichas diferencias en estructura y composición tanto del polisacárido como de la parte proteica, se deben tanto al origen geográfico, como a las condiciones ambientales y de crecimiento de la planta, de tal manera que el mismo tipo de goma puede presentar diferencias en su composición química.

1.3 Propiedades funcionales de la Goma de Mezquite

La GM (figura 2) es un exudado de los árboles del género *Prosopis*, estos la producen en el tronco principal y ramas de la planta como un mecanismo de defensa. Existen reportes que mencionan a la goma de *Prosopis* ambiguamente, esto porque las semillas también contienen una goma, para diferenciarlas, al exudado se le denomina “goma de mezquite”. Esta es líquida, soluble en agua y presenta un color amarillo cuando esta fresca, tornándose ligeramente dura, cristalina y oscura por efecto del calor y contenido de polifenoles. Es un complejo proteoglicano que posee un gran número de grupos ionizables y es altamente ramificado. En general, el 90% de la GM es un esqueleto central de residuos de β -(1-3)-D-galactosa con ramificaciones (1-6) de L-arabinosa (tanto en su forma de piranososa como furanososa),

L-ramnosa, ácido β -D-glucurónico y ácido 4-O-metil- β -D-glucurónico. Presenta también una parte proteica que representa entre el 0.7 y 5.8 % del total de la molécula (Vernon-Carter y *col.*, 2000). Los aminoácidos principales de la proteína, son en mayor proporción la hidroxiprolina, seguida de la prolina y serina (Anderson y *col.*, 1985). Por estas características, la GM es considerada una Arabinogalactano-proteína (AGP) del tipo II (polisacárido unido covalentemente a la proteína) (López-Franco y *col.*, 2004).



Figura 2 Goma de mezquite recolectada de arboles silvestres en la localidad de Río Verde San Luis Potosí, México

Existen diversos estudios que demuestran que las propiedades funcionales de la GM son comparables a las de la GA producida por *Acacia senegal*, que es la goma vegetal de mayor uso en la industria. Esta característica se debe a que La estructura primaria de la GM (figura 3) y su componente proteico son muy similares a los de la

GA (Goycoolea y *col.*, 1995). En este sentido, Beristain y *col.*, (1996) estudiaron la capacidad de absorción de agua y aceite de la GM y la GA y demostraron que la GM presenta la mayor absorción tanto de agua como de aceite en el rango de temperaturas que va de los 23 a los 45°C. Se asume que este resultado se debe a que la GM es sometida a una mayor ionización que la GA, lo que conduce a una mayor absorción de agua. Por su parte, en términos de absorción de aceite, mencionan que este proceso puede estar controlado por las regiones hidrofóbicas de la parte protéica y por los grupos metilo provenientes de las moléculas de ácido glucurónico, que están presentes en mayor proporción en la GM. Aun cuando en dicho trabajo no se estudió la relación entre la estabilidad de la emulsión y la absorción tanto de agua como de aceite, sugieren que dicha relación está presente.

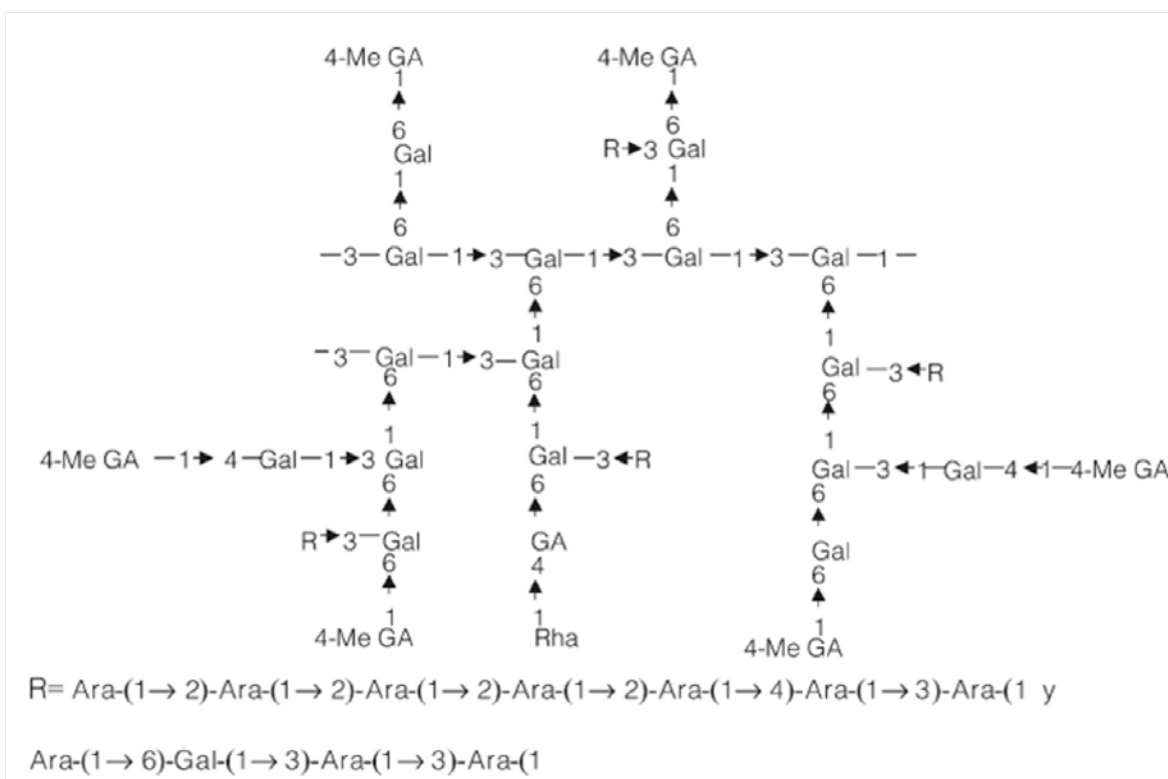


Figura 3 Estructura primaria propuesta para el componente polisacárido de la goma de mezquite (Aspinall y Whitehead 1970).

Por su parte Goycoolea y col., (1997) reportaron que la GM presenta una capacidad de retención de aceite esencial de cascara de naranja emulsificado en agua del 90.6%, después de ser secado por aspersión. Este porcentaje es muy cercano al que presenta la GA (ca. 100%) y concluyen que este resultado les permite proponer a la GM como un sustituto de la GA en regiones geográficas en donde los arboles del genero *Prosopis* están ampliamente distribuidos.

Bosquez-Molina y col., (2003) utilizaron GM como material estructural en la formulación de recubrimientos comestibles a base de cera de candelilla, cera de candelilla con cera de abeja, aceite mineral blanco y ácido oleico. Estos recubrimientos se aplicaron a limones Persas y se evaluaron los cambios en la pérdida de peso, color y composición química de los limones. El recubrimiento que ofreció mejores resultados fue el que combino la GM con aceite mineral y cera de candelilla, además reportan que este recubrimiento presentó los valores más bajos de permeabilidad al vapor de agua, mostrando también, una mayor uniformidad y menores defectos en la morfología de su superficie. Por último, mencionan que el recubrimiento formado por la GM en combinación con cera de candelilla y aceite mineral, tiene el potencial de reducir la tasa de decaimiento natural del limón persa.

En un estudio reciente, Román-Guerrero y col. (2009) fraccionaron la GM y reportaron que se compone al menos de 3 fracciones distintas con contenidos de proteína y polisacárido diferentes. Además, encontraron que la GM y sus fracciones tienen la capacidad para formar membranas viscoelásticas en la interfase aceite agua y para estabilizar emulsiones formadas con aceite de cascara de naranja. En particular determinaron que la fracción que contenía un balance de proteína/polisacárido altos es la que presenta las mejores propiedades emulsificantes.

En general se ha demostrado que los componentes de la GM son determinantes en su aplicación como emulsificante, debido a su funcionalidad protectora como coloide

y a su capacidad para formar membranas viscoelásticas en una interfase aceite-agua. Funciona como un agente microencapsulante de lípidos por sus eficientes propiedades térmicas (difusividad efectiva baja y alta energía de activación) que le ayudan a actuar como barrera a la transferencia de oxígeno.

Por otro lado, Vernon-Carter *y col.* (2000) describen la producción, usos, características y propiedades de especies de *Prosopis*, haciendo énfasis en la situación actual de este recurso en México. Estos autores resaltan que en nuestro país toda la goma es colectada de árboles silvestres, por esta razón y con el fin de aprovechar el recurso, investigadores, grupos privados y gubernamentales están promoviendo la reforestación de zonas áridas y semiáridas con árboles de mezquite. Esta acción tendría efectos benéficos en dos sentidos: los árboles de *Prosopis* ayudan a retener y estabilizar dunas de arena, promueven el desarrollo de carpetas de vegetación retienen humedad, fijan nitrógeno y mejoran el suelo. En segundo termino, se contaría con árboles que representan un recurso importante a través de todos sus productos, especialmente la GM.

Los antecedentes descritos arriba, posicionan a la GM como un producto con un alto potencial de uso en la industria de los alimentos, sin embargo la principal razón para no usarla a nivel industrial es que no se puede garantizar el suministro sostenido de este producto (Vernon-Carter *y col.*, 2000). Esta situación abre el panorama para que se busquen mecanismos apropiados que permitan aumentar la producción de la goma, lo que nos lleva a proseguir con los estudios sobre su producción y promover el desarrollo de biotecnologías destinadas a tal fin.

1.4 Cultivo de células vegetales

La necesidad de contar con mayor información sobre la producción de sustancias naturales de interés para el hombre, como la GM, conduce a buscar sistemas

biotecnológicos alternativos. Una manera es utilizando las técnicas de cultivo de células y tejidos vegetales (CCV). Esta herramienta de la biotecnología no es nueva, se tiene evidencia de que los primeros trabajos se iniciaron a principios del siglo pasado y que desde los años 30 se han obtenido avances importantes en el área. El concepto de cultivo de células y tejidos vegetales es amplio y se puede definir como la técnica de crecer células, órganos, protoplastos, embriones, tejidos o plántulas, aislados de una planta madre, en condiciones *in vitro* y en un medio de cultivo sintético. Su aplicación ha sido dirigida a tres principales aspectos: la producción de metabolitos secundarios, micropropagación y para realizar estudios genéticos, fisiológicos, bioquímicos y de patología de las células vegetales (Zhong, 2001).

Es importante entender los conceptos de totipotencialidad y plasticidad por que son básicos para el CCV. Las plantas desarrollaron la capacidad para soportar condiciones ambientales extremas y de predación por parte de los animales. Para lograrlo tuvieron que desarrollar diversos mecanismos de adaptación para garantizar su crecimiento y la permanencia de la especie. Esta plasticidad tiene como consecuencia que puedan modificar su metabolismo, crecimiento y desarrollo para enfrentarse y aprovechar de la mejor manera las condiciones medioambientales en las que se encuentran. Un aspecto particular de esta adaptación es el que permite establecer un CCV, debido a que las plantas tienen la capacidad (totipotencia) de iniciar la división celular de casi cualquier tejido y lograr una regeneración total de tejidos, órganos o de un organismo completo. Este fenómeno sucede por que las plantas pueden, con el estímulo adecuado, expresar el potencial genético total de la planta madre. En consecuencia, para iniciar un CCV es necesario contar con material vegetal de la especie seleccionada y a partir de este obtener callo (conjunto de células vegetales no diferenciadas que crecen formando agregados amorfos). Estos se desarrollan en un medio de cultivo apropiado previamente seleccionado y provienen de órganos o tejidos diferenciados. Para inducir y mantener esta “desdiferenciación” es necesario manipular los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) del medio de cultivo. Este es un punto crítico en el establecimiento y su éxito

dependerá de la fuente del explante y del tipo y concentración de los RCV utilizados. (Dixon, 1995).

Los RCV son sustancias químicas presentes en tejidos vegetales que tienen un papel regulatorio en el crecimiento y desarrollo de la planta, actividad que llevan a cabo generalmente a muy bajas concentraciones. En el CCV se utilizan algunos RCV que son preparados sintéticamente o a través de procesos de fermentación, de tal forma que son adicionados al medio de cultivo y por tanto se consideran como sustancias endógenas cuyo tipo y concentración a utilizar deben ser evaluados en los experimentos encaminados a la obtención de callo. Estos RCV han sido clasificados en 5 grupos: Auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (Machakova y col., 2008). Las auxinas y citocininas son por su eficiencia las más importantes en la regulación de crecimiento y morfogénesis.

A nivel celular las auxinas regulan procesos básicos como la división y elongación celular, razón por la que son utilizadas ampliamente en el CCV y son consideradas como parte integral del medio de cultivo. La auxina natural más comúnmente utilizada en CCV es el Ácido Indol-3-Acético (AIA), sin embargo se utilizan también análogos sintéticos del AIA. Estos análogos tienen estructuras diferentes pero propiedades biológicas similares, razón por la que son también llamados auxinas. Las auxinas sintéticas más usadas son el Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), el Ácido Naftalen Acético (ANA) y el Ácido Indol-3-Butírico (AIB). De estas, la más reportada para iniciar el cultivo de callo es el 2,4-D a niveles que van desde los 0.5 a 50 μM dependiendo si se trata de especies mono o dicotiledóneas. Otra auxina sintética que ha sido usada en la inducción de callos es el Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético (2,4,5-T), aunque su uso ha sido limitado principalmente a especies monocotiledóneas como *Avena*, *Oryza* y *Panicum* (Heyser y col., 1983).

De la misma forma que las auxinas, las citocininas basan su importancia en su capacidad de estimular la división celular y controlar la morfogénesis. La primera

citocinina descubierta fue la Cinetina (CIN) y es la que se usa principalmente en CCV además de otras como la Benzil Adenina (BA) y los diferentes isómeros de la Zeatina. También existen análogos sintéticos de las citocininas como por ejemplo la 4-Alquil Aminopteridina y la 6-Benzil Oxipurina, sin embargo son menos utilizadas.

En general, tanto auxinas como citocininas son necesarias para la generación de callo y esto se debe a que existe una interacción entre estas que controla la desdiferenciación celular. Por ello se requiere de un balance auxinas/citocininas adecuado, que resulta específico de acuerdo al tipo de planta que se este utilizando. No obstante, su efecto coordinado puede ser resumido de forma general en el esquema propuesto por *Stadel y col.*, (2008) (figura 4).

Cuando se logra obtener callo es importante mantener esta condición en el cultivo y promover la proliferación de este. En esta etapa del proceso y cuando se cumplen las condiciones mencionadas, se considera como “establecido” al cultivo y con ello es posible promover la formación de suficiente biomasa y realizar estudios bioquímicos, moleculares, etc.

A partir del cultivo de callos se desarrolla el cultivo de células en suspensión, este sistema es el que se ha utilizado ampliamente para estudios de proliferación masiva de células, porque permite un control adecuado de las condiciones de mezclado y aireación, en comparación con cultivos de raíces o brotes. Además representa el sistema más adecuado para el lograr un cultivo a gran escala (*Kieran y col.*, 1997). Se utilizan los callos que no presentan oxidación y que sean friables (alta capacidad para disgregarse), se inoculan en un medio de cultivo líquido y se colocan en agitación. Es recomendable iniciar el cultivo con una densidad del inóculo alta y seleccionar periódicamente los agregados más pequeños hasta lograr una suspensión homogénea. De la misma manera que en los callos, se considera a una línea de células en suspensión “estable”, cuando los parámetros de crecimiento y

producción de biomasa son reproducibles, es decir, presentan el mismo comportamiento a través del tiempo.

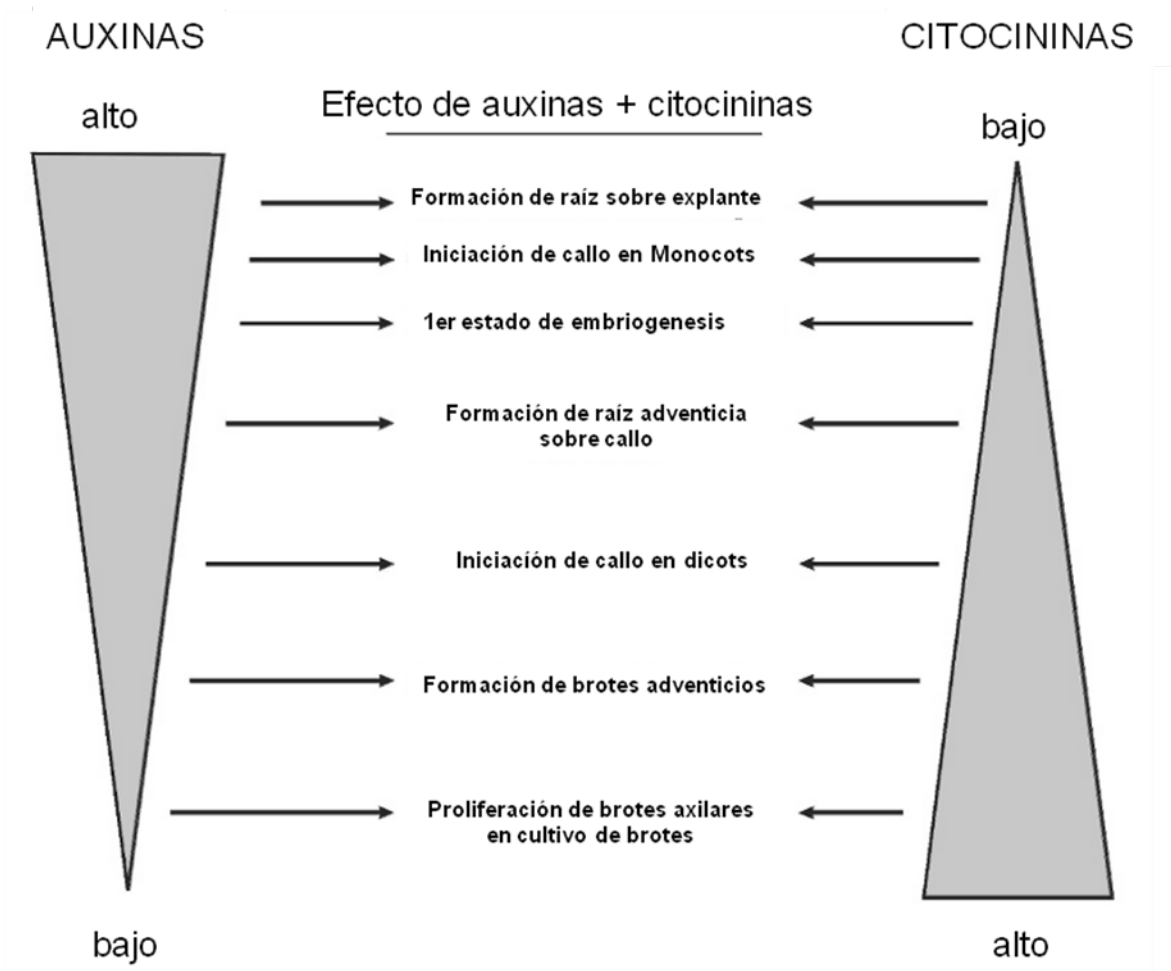


Figura 4 Concentraciones relativas de Auxinas y Citocininas requeridas para el crecimiento y morfogénesis en CCV (Adaptado de Stadel y col. 2008).

1.5 Cultivos *in vitro* de *P. laevigata*

Los reportes del cultivo *in vitro* del genero *Prosopis* para diferentes fines son escasos, algunos de los antecedentes al respecto son los trabajos publicados por Buendía-González y col., (2007; 2010). En el primero, se describe la propagación clonal de plantas de *P. laevigata* a través de nodos cotiledonales, mientras que en el segundo, se reporta la acumulación de plomo y níquel en plántulas de *P. laevigata* generadas y cultivadas *in vitro*.

Por su parte en estudios realizados por Orozco-Villafuerte y col., (2003 y 2005). Se demuestra que es posible obtener una producción de GM en segmentos nodales de tallo de *P. laevigata* cultivados *in vitro* y que esta capacidad aumenta como respuesta al estrés biótico (causado por suspensiones de hongos o bacterias) y abiótico (provocado por la temperatura o heridas mecánicas en tallo). Estos resultados sugieren que la combinación del incremento de la temperatura con el uso de elicitores bióticos puede utilizarse con el fin de incrementar la producción de goma. Los mismos autores en su publicación del 2003, reportan la caracterización de la goma producida en un sistema *in vitro* y la comparan con la que producen los árboles silvestres. Con este trabajo muestran que las características físicas y químicas de la goma obtenida *in vitro* presentan algunas variaciones con respecto a las de la goma obtenida *in situ*. Ambas gommas fueron separadas en 5 fracciones, en donde la mayor similitud se presenta en las fracciones reportadas como 2a y 2b, las cuales pueden ser las responsables de las propiedades emulsificantes reportadas en la GM. Es importante destacar que los segmentos nodales de tallo utilizados corresponden a tejidos diferenciados y que esta característica pudo ser definitiva para lograr la producción de GM *in vitro*. Sin embargo, no se tiene conocimiento de la producción de GM en cultivos de células no diferenciadas (callos o células en suspensión), lo cual abre la posibilidad de establecer un sistema de este tipo que pueda conducir al desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de GM en biorreactores.

1.6 CCV en suspensión para la producción de goma

El interés en las células vegetales como sistemas de bajo costo para la obtención de productos biológicos en grandes cantidades y de bajo riesgo para la salud del consumidor, se ha incrementado considerablemente en los últimos años (Doran 2000). En este sentido, un producto natural que ha sido utilizado por el hombre desde hace miles de años como agente estabilizante y espesante son las gomas vegetales (Verbeken *y col.*, 2003). Estas propiedades funcionales presentes en algunas gomas vegetales se deben en gran parte a uno de sus componentes principales, las arabinogalacto-proteínas (AGPs) (Garti y Reichman 1993). Las AGPs son un grupo de compuestos formado por glicoproteínas que además de formar parte de las gomas, se encuentran también, en la pared, membranas y espacios intercelulares de las plantas. (Mollard y Joseleau, 1994).

En particular la GA, el exudado proveniente de *Acacia senegal*, es la goma de mayor uso a nivel mundial debido a sus excelentes propiedades emulsificantes y por ser reconocida como una sustancia generalmente segura (GRAS). En años recientes se presentó un incremento en la demanda de la GA, lo que propició que su suministro sea incierto, situación que ha promovió la búsqueda de fuentes alternativas de goma, que sean seguras, con una calidad constante y que posean propiedades funcionales similares o superiores a las de la GA.

En este sentido, el CCV en suspensión ha sido utilizado como un sistema para la producción *in vitro* de goma vegetal. Mollard y Joseleau (1994), reportaron el uso de un cultivo de células en suspensión de *Acacia senegal* con el fin de conocer si las células crecidas *in vitro* retienen la capacidad que tiene la planta para producir GA. Este estudio revela que las células en suspensión liberan al medio de cultivo diferentes tipos de polímeros, entre los cuales se incluye al menos un tipo de AGP. Determinaron que esta AGP pertenece a la clase de las AGPs deficientes en hidroxiprolina y que la mayor diferencia con la goma arábica se encuentra en la parte

proteica de la molécula. No obstante, concluyen que esta diferencia no es una evidencia de que el cultivo celular haya perdido la capacidad que tiene las plantas para producir la GA y que la AGP encontrada podría ser una molécula precursora de la goma.

Por su parte Xu y col., (2005), publicaron un estudio en el que muestran la producción de goma vegetal recombinante utilizando células en suspensión de un cultivo transformado de *Nicotiana tabacum* (BY2) crecido en un biorreactor tipo tanque agitado. Esto se logró mediante la expresión de un gen sintético que codifica para una goma basada en una AGP rica en hidroxiprolina a la que denominaron goma arábica-8. Esta goma fue purificada por métodos cromatográficos y caracterizada bioquímicamente, encontrando que la parte proteica fue virtualmente idéntica a la que se predijo por la secuencia consenso de la AGP de la goma arábica y que la parte del polisacárido se presenta en forma de arabinogalactanos y oligosacáridos unidos a residuos de hidroxiprolina. Aun cuando esta goma no presentó propiedades emulsificantes semejantes a la GA nativa, se demostró la factibilidad de utilizar CCV en suspensión y las herramientas de la ingeniería genética para la producción de gomas basadas en glicoproteínas del tipo de las AGPs.

En general, se tiene el conocimiento de que las AGPs forman parte importante de las gomas vegetales como la GA y la GM (López-Franco y col., 2004). Además de que estas moléculas son comúnmente secretadas en el medio de cultivo en sistemas en suspensión de células vegetales (Rumyantseva, 2005), como lo demuestran los trabajos publicados por Reid y col., (1999), quienes reportaron la producción y secreción de polisacáridos y AGPs en suspensiones celulares de manzana (*Malus domestica*). Rodríguez-Monroy y Galindo (1999) muestran la acumulación extracelular de AGPs en cultivos en suspensión de *Beta vulgaris* desarrollados en un tanque agitado y en trabajos más recientes realizados por Baldwin y col. (2001) e Immerzeel y col. (2004) se reportan también la producción de AGPs en cultivos de células en suspensión de *Daucus cartota*.

Por lo tanto se abre la posibilidad de establecer un cultivo de células en suspensión que tenga el potencial para la producción de goma de mezquite o de algunos de sus componentes y con ello se mantengan las propiedades emulsificantes.

2. JUSTIFICACIÓN

La GM es un exudado de los árboles del género *Prosopis* que contiene como compuestos mayoritarios polisacáridos, proteínas, AGPs y en menor proporción compuestos fenólicos. Esta goma se presenta en troncos y ramas de la planta en respuesta a una condición de estrés biótico o abiótico. Desde tiempos precolombinos es utilizada de diversas formas, principalmente como dulce, ingrediente en materiales comestibles para animales y humanos y en la medicina tradicional. Como resultado de los estudios de este producto, fué posible conocer su estructura molecular y sus propiedades físicas y químicas. Al respecto, existe en la literatura un número destacado de reportes que mencionan a la GM como un polisacárido importante que tiene un amplio potencial de uso principalmente en sistemas alimenticios. A pesar de ser considerada como una sustancia que por sus propiedades es capaz de sustituir a la goma arábica en varios procesos, se destaca también, que para lograr esto, es necesario cubrir aspectos importantes como profundizar en el estudio de los mecanismos de su producción en la planta, lograr la autorización para su uso por parte de agencias internacionales de salud y garantizar el suministro constante de esta a la industria. En este sentido, el interés de esta propuesta de trabajo es establecer un cultivo de células vegetales en suspensión que presente el potencial para la producción de GM, caracterizarla químicamente y explorar sus propiedades funcionales comparándolas con las de la GM producida por árboles silvestres. Se pretende además, que el cultivo, sirva como un modelo biológico que nos permita continuar con los estudios encaminados a obtener mayor conocimiento sobre los mecanismos de producción de la GM.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Es posible desarrollar un cultivo de células vegetales *in vitro* de *Prosopis laevigata* capaz de producir goma de mezquite.

3.2 Objetivo General

Establecer un cultivo de células en suspensión de *Prosopis laevigata*, determinar su potencial como fuente de producción *in vitro* de goma de mezquite y evaluar sus propiedades funcionales.

3.3 Objetivos Específicos

1. Desarrollar un cultivo de callos de *Prosopis laevigata* a partir de plántulas germinadas *in vitro* utilizando reguladores de crecimiento vegetal.
2. Establecer el cultivo de células en suspensión de *Prosopis laevigata* a partir de un cultivo de callos utilizando las herramientas del Cultivo de Células Vegetales.
3. Caracterizar el comportamiento cinético y morfológico del cultivo de células en suspensión de *Prosopis laevigata* crecido a nivel de matraz y biorreactor, evaluar y caracterizar la producción de goma de mezquite a través de sus componentes principales.
4. Evaluar las propiedades emulsificantes de la goma de mezquite producida por el cultivo de células en suspensión de *Prosopis laevigata*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Plan de trabajo

El trabajo experimental se realizó considerando 3 diferentes etapas:

1. Establecimiento de los cultivos de callo y células en suspensión.

En esta parte de la investigación, se decidió iniciar con la obtención de plántulas a partir de semillas y utilizarlas como fuente de explante para la inducción de callo, a través de un diseño de experimentos en el que se probaron reguladores de crecimiento, su concentración y tipo de explante. Posteriormente, se eligió el callo con las mejores características de viabilidad, apariencia y disgregabilidad para que a partir de este, se estableciera el cultivo de células en suspensión de *P. laevigata*.

2. Caracterización del cultivo crecido a nivel de matraz y biorreactor.

A partir del cultivo en suspensión previamente establecido, se realizaron cinéticas de crecimiento en dos sistemas diferentes; matraces y biorreactor. En ambos se caracterizó el crecimiento y morfología celular, además de darle seguimiento a la viabilidad del cultivo. De igual manera se evaluó la producción de GM a través de la cuantificación de sus componentes principales y se compararon con goma de mezquite proveniente de árboles silvestres. En los experimentos con biorreactor, se midieron también la velocidad de transferencia de oxígeno y la velocidad de consumo de oxígeno (OTR y OUR respectivamente, por sus siglas en ingles).

3. Evaluación de las propiedades emulsificantes de la goma de mezquite producida *in vitro*.

De las etapas anteriores se obtuvieron el exudado tipo goma en callos y goma liofilizada proveniente de los cultivos crecidos en matraz y en biorreactor. Se evaluaron sus propiedades emulsificantes en un sistema aceite en agua a través de la actividad y estabilidad de las emulsiones y se calcularon el diámetro promedio de

las gotas de aceite ($d_{3,0}$) y el coeficiente de coalescencia en las emulsiones (C). Los resultados fueron contrastados contra GM proveniente de árboles silvestres.

A continuación se describen los métodos utilizados en el desarrollo del presente trabajo.

4.2 Escarificación, desinfección y germinación de semillas

Las semillas utilizadas en este trabajo se colectaron de árboles maduros de *Prosopis laevigata* con una edad de entre 6 y 15 años, ubicados en los alrededores del Ejido Llanos de la Angostura en la localidad de Río Verde en el estado de San Luis Potosí. Las semillas se escarificaron mecánicamente según lo reportado por Buendía-González y col. (2007). Una vez escarificadas, bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar, se lavaron en una solución de detergente comercial al 5% (p/v) por 5 min, posteriormente se esterilizaron con una solución de etanol al 50% (v/v) por 5 min y subsecuentemente con una solución de hipoclorito de sodio (cloralex) al 10% (v/v) (solución < 5% de Cl libre) por 5 min. Entre cada paso, se lavaron con agua destilada estéril por 5 min. Para la obtención de plántulas, las semillas se colocaron para germinar en tubos de vidrio que contenían medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) con 3% (p/v) de sacarosa y como agente gelificante fitagel (Sigma) al 0.2% (p/v). El pH del medio se ajustó a 5.8 previo a la esterilización. Las condiciones de germinación se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, en iluminación con lámparas fluorescentes de luz blanca a una irradianza de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

4.3 Obtención de explantes e inducción de callo

Plántulas de *P. laevigata* de 15 d de edad, obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro*, se utilizaron como fuente de explante para la inducción de callo. Segmentos

de hipocótilo, cotiledón y hoja (1.5 cm de longitud aproximadamente) fueron transferidos a frascos de cultivo (2 explantes por frasco; 8 frascos por tratamiento; 2 replicas) que contenían 25 ml de medio MS con 3% (p/v) de sacarosa y 0.2% (p/v) de fitagel.

Se evaluaron doce combinaciones de RCV. i) sin RCV (control); ii) Cinétina (CIN); iii) 6-benzilaminopurina (BAP); iv) Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D); v) 2,4-D + CIN; vi) 2,4-D + BAP; vii) Acido α -Naftalenacético (ANA); viii) ANA + CIN; ix) ANA + BAP; x) Acido 2,4,5-Triclorofenoxiacético (2,4,5-T); xi) 2,4,5-T + CIN y xii) 2,4,5-T + BAP, a tres distintas concentraciones (0.5, 5, y 10 μ M). Los explantes se incubaron durante 30 días, bajo las mismas condiciones en que se llevó a cabo la germinación de semillas. El porcentaje de inducción de callos se obtuvo del total de explantes usados por tratamiento. Los callos que se indujeron exitosamente fueron separados del explante y transferidos a su correspondiente medio fresco, se permitió su desarrollo por 4 semanas y después se mantuvieron por subcultivo cada mes.

Los datos se analizaron estadísticamente a través de un ANDEVA multifactorial y una prueba de medias de Duncan ($p = 0.05$) utilizando el software Statgraphics Plus Ver. 4.1 para Windows (Statistical Graphics Corp., USA).

4.4 Establecimiento de las suspensiones celulares

El cultivo de células en suspensión se inicio de callos friables de 4 semanas de edad desarrollados a partir de hipocótilo con 5.0 μ M de 2,4,5-T + 5.0 μ M de CIN. Se transfirieron 3-5 g de células frescas a matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml medio de cultivo (MS) sin fitagel e incubados en una agitadora orbital a 110 rpm bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación que las usadas para los callos. Cuando se incrementó la biomasa, las células fueron seleccionadas por tamaño con una malla de nylon de 200 μ m, con la finalidad de obtener una suspensión fina y homogénea. Las suspensiones se mantuvieron por

subcultivo cada 15 días usando un tamaño de inóculo de 10% (v/v) en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio de cultivo.

4.5 Crecimiento en matraz

Se inocularon 5 g de células frescas, obtenidas de cultivos con 10 d de edad, en matraces Erlenmeyer de 150 ml que contenían 30 ml de medio MS líquido con 3% de sacarosa, 5.0 μM de 2,4,5-T + 5.0 μM de CIN, el pH del medio se ajustó a 5.8 y fue esterilizado en autoclave 20 min a 20 psi previo a la inoculación. Cada 2-3 días durante un período de 21 d, se tomaron tres matraces independientes y se utilizaron para determinar crecimiento, morfología, viabilidad y contenido de AGPs.

4.6 Crecimiento en biorreactor

Se realizaron 5 corridas en un biorreactor tipo tanque agitado de 2 l. (Applikon, Schiedam, Holanda) (figura 5a). Se utilizó un volumen de trabajo de 1 l y el mismo medio de cultivo descrito para los experimentos en matraces. El biorreactor se inoculó con células de 10 d de edad en una relación 10% (p/v) de biomasa fresca. La aireación del sistema fue de 0.1 vvm y la agitación se realizó con un impulsor Rushton a una velocidad de 400 rpm. El pH y la tensión de oxígeno disuelto se monitorearon en línea a través de electrodos específicos conectados a un biocontrolador ADDI 1030 (Applikon, Schiedam, Holanda) (figura 5b). El pH se controló en 5.8 ± 0.1 con la adición de NaOH 0.1 N a través de una bomba peristáltica conectada al biocontrolador. Para las determinaciones de crecimiento, morfología, viabilidad y contenido de AGPs, se tomó una muestra de 60 ml cada 2-3 días.

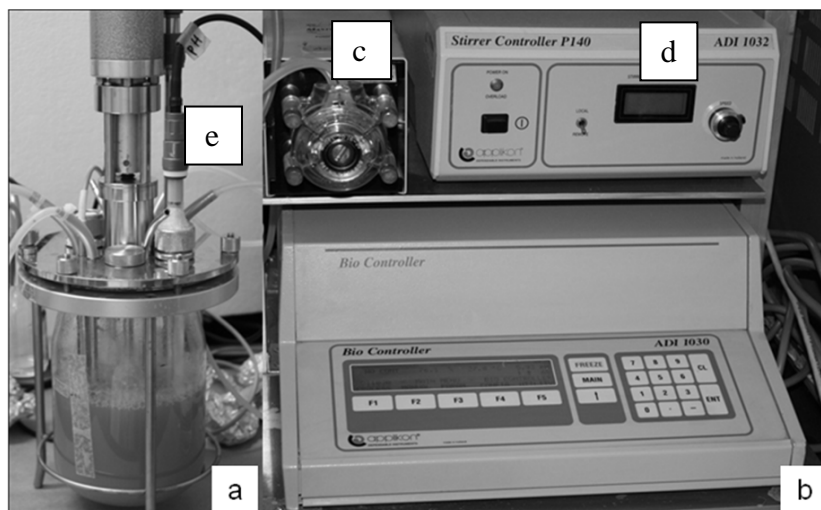


Figura 5 Sistema de cultivo para las suspensiones celulares de *P. laevigata* desarrolladas en biorreactor. a) Biorreactor tipo tanque agitado; b) Biocontrolador; c) Bomba peristáltica; d) Controlador de velocidad de agitación; e) Electrodo de pH.

4.7 Evaluación de los parámetros de transferencia de oxígeno (OTR y OUR)

El mezclado y aireación en el biorreactor son determinantes para el suministro de oxígeno a las células, por lo que estas variables resultan determinantes en el diseño y caracterización de los biorreactores. Con la finalidad de saber si las condiciones de operación del biorreactor (velocidad de agitación 400 rpm y aireación 0.1 vvm) fueron las adecuadas para evitar una limitación por oxígeno en el sistema, se midieron la OTR y OUR de acuerdo a lo reportado por Orozco-Sánchez (2009). Para la mediciones de tensión de oxígeno se utilizó el método dinámico (Doran 1995) y los datos obtenidos experimentalmente se usaron para calcular los valores de OTR y OUR con las siguientes ecuaciones:

$$OTR = K_L \alpha (C^* - C_L)$$

En donde:

OTR: Velocidad de transferencia de O₂ (Kg/m³d)

K_Lα: Coeficiente volumétrico de transferencia de O₂ (d⁻¹)

C^{*}: Solubilidad del O₂ en el medio (Kg/m³) (~ 0.008 Kg/m³ a 25°C y 1 atm)

C_L: Concentración de O₂ en el medio de cultivo (Kg/m³)

La OUR se determinó considerando la concentración celular en el reactor y la variación de OD con el tiempo, de acuerdo con siguiente ecuación:

$$\frac{dCO_2}{dt} = OUR = Q_{O_2} X$$

En donde:

dCO₂/dt: Variación de O₂ disuelto en el reactor en función del tiempo (Kg/m³d)

OUR: Velocidad de consumo de O₂ (Kg/m³d)

QO₂: Consumo específico de O₂ por el cultivo (Kg / (Kg(biomasa viable) m³d)

X: Concentración celular (Kg/ m³)

4.8 Determinación de crecimiento celular

Alícuotas de 3 ml se filtraron a través de papel filtro (Whatman No. 1) puesto con anterioridad a peso constante. La biomasa se determinó gravimétricamente a través del peso seco de la muestra, colocándola en estufa a 70 °C por 24 h. Se utilizaron datos provenientes de 2 experimentos independientes para matraces (n=6) y 5 corridas en biorreactor (n=5) y se calculó la media y error estándar. La velocidad específica de crecimiento celular (μ) se obtuvo utilizando un método gráfico: Los valores de biomasa de la fase exponencial de crecimiento se transformaron a Ln y se graficaron contra el tiempo, la gráfica se ajustó a una línea recta y la pendiente de esta correspondió a la μ y a partir de este dato se calculó el tiempo de duplicación (t_d).

4.9 Viabilidad celular

Se determinó de manera indirecta a través de la integridad de la membrana, medida por el método del azul de Evans reportado Rodríguez-Monroy y Galindo (1999). 2 ml de muestra con células de cada punto de muestreo se incubaron con 0.25% de azul de Evans durante 5 min y se analizaron microscópicamente. Se contaron 700 células en total y el porcentaje de viabilidad de la muestra se determinó tomando como base el número de células no teñidas (células viables).

4.10 Caracterización morfológica de las células crecidas en matraz y biorreactor

Se tomaron fotomicrografías de las células en suspensión para cada punto de muestreo de las cinéticas de crecimiento. Se utilizó un microscopio óptico Alphaphot-2 YS2 (Nikon, Tokio, Japón) equipado con una videocámara (DC330 DAGE-MTI, Inc., Michigan, IN) y la magnificación de las imágenes se realizó con el objetivo 4x. La

caracterización morfológica se llevó a cabo contando las células y agregados, midiendo su tamaño (área) y forma. Esta última definida como el factor de forma elíptica (FFE), que se calcula a través de la relación ancho/largo de las células y agregados celulares, en donde un valor del FFE de 1 representa un agregado redondo y valores mayores a 1 indican agregados alargados. Para la adquisición de imágenes, conteo y medición de los parámetros morfológicos se utilizó el software Meta Imaging Series para Microsoft Windows (versión 4.0, Universal Imaging Corporation, Downingtown, Pennsylvania, USA).

4.11 Purificación de Gomas

Goma de mezquite (GM) proveniente de árboles silvestres, las gotas del exudado tipo goma (GMc) provenientes de callos de 90 d de edad y la goma de las cinéticas en matraz (GMm) y biorreactor (GMb) se purificaron de acuerdo al procedimiento reportado por Orozco-Villafuerte *y col.* (2003). Primero, las muestras de gomas (GM y GMc) fueron disueltas en agua desionizada y las soluciones se filtraron con membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μm y por otro lado, se separó el medio de cultivo de las células por filtración con papel Whatman No. 1. Posteriormente tanto las muestras de gomas como el medio de cultivo libre de células, se dializaron por separado utilizando membranas de celulosa (Sigma) con un corte de peso molecular de 12 KDa, finalmente se concentraron por liofilización obteniendo las gomas purificadas y se almacenaron a -20°C para su posterior caracterización.

4.12 Contenidos totales de proteína, azúcares, y ac. glucurónico

Los métodos de Bradford (Bradford 1976), Fenil-sulfúrico (Dubois *y col.*, 1956) y del Carbazol (Randall *y col.*, 1989) fueron utilizados para determinar los contenidos totales de proteína, azúcares, y ac. glucurónico en las muestras de GM, GMc, GMm y GMb.

4.13 Azúcares neutros

La composición de azúcares neutros se determinó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Las muestras fueron preparadas de acuerdo con el método reportado por Vázquez Ortiz *et al.* (2006). Alícuotas de 0.05 g de GM, GMc, GMm y GMb se colocaron en tubos pyrex de 15 ml y a cada uno se adicionó 4% (p/p) de H₂SO₄. Se colocaron en baño maría a 100°C por 4 h y se llevaron al peso inicial con agua desionizada. Las soluciones se neutralizaron con BaCO₃ y se colocaron en agitación durante toda la noche. Los hidrolizados se filtraron y fueron analizados por HPLC en un cromatógrafo (Varian Pro Star) con un detector de índice de refracción, utilizando una columna “sugar SC1011” y agua (grado HPLC) como fase móvil a una velocidad de flujo de 0.25 ml/min y una temperatura de 85°C.

4.14 Identificación y cuantificación de AGPs

Se utilizó el método de difusión radial en gel de agarosa reportado por Van Holst y Clarke (1985). Este método se basa en la interacción específica y precipitación de las AGPs con el reactivo de Yariv. Se preparó una solución con 1% (p/p) de agarosa, NaCl (0.15M), NaN₃ (0.02%) y 10 mg/ml del reactivo de Yariv, esta solución se colocó uniformemente en un porta objetos y se dejó enfriar hasta gelificar. Se perforó la placa de gel formando pozos con un diámetro de 1mm y se colocó la muestra (1µL) en cada pozo. Después de 24 h se verificó la formación de un halo rojo alrededor de los pozos, lo que indica la presencia de AGPs en la muestra. Para la cuantificación de AGPs, se midió el diámetro del halo y esta medida se comparó con una curva de calibración preparada previamente. En las muestras de GM y GMc solo se realizó una medición cualitativa de los AGPs a través de la presencia o no, del halo rojo en el gel.

4.15 Preparación de emulsiones

Se prepararon emulsiones aceite en agua mezclando 50 mg de aceite mineral / aceite de naranja (50% w/w) con 5 ml de soluciones acuosas de GM, GMc, GMm y GMb (100 mg ml⁻¹) respectivamente. El mezclado se realizó con un procesador ultrasónico VCX 130PB (Sonics and materiales inc. Newtown, CT, USA) durante 5 min a 70% de amplitud. Inmediatamente después de formada la emulsión se tomaron alícuotas de 100 µl para su análisis y las emulsiones se almacenaron en refrigeración a -4°C.

4.16 Actividad y estabilidad emulsificante por densidad óptica

Las propiedades emulsificantes de la GM, GMc, GMm y GMb se evaluaron de acuerdo al método de Pearce y Kinsella (1978). Se midió la densidad óptica de las emulsiones diluidas (500 x) a una longitud de onda de 650 nm con un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 2). La actividad emulsificante correspondió al valor de la densidad óptica de la emulsión obtenida inmediatamente después de su preparación (tiempo (t) = 0 h) y la estabilidad emulsificante al valor de densidad óptica obtenido 24 h después.

4.17 Determinación de la tasa de coalescencia en las emulsiones

Para obtener la tasa de coalescencia de las emulsiones preparadas con GM, GMm y GMb se siguió la metodología reportada por Ruíz-Ramos y *col.* (2006). Las emulsiones fueron observadas en un microscopio óptico Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japón) con el objetivo 100x. Se tomaron imágenes con una video cámara (DC330 DAGE-MTI, Inc., Michigan IN, USA) acoplada al microscopio y conectada a una computadora. Las fotomicrografías de las emulsiones se obtuvieron a las 0, 24, 48 y 72 h, tiempo en que la emulsión permaneció sin que se apreciara una separación de fases. El procesamiento de las imágenes se realizó con el software libre ImageJ 1.4

(National Institutes of Health, USA) para medir el diámetro de Feret de las gotas de aceite y obtener el tamaño promedio de las gotas ($d_{1,0}$).

La tasa de coalescencia de las emulsiones puede representarse por la ecuación:

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-Ct}$$

En donde N_t es la concentración de gotas al tiempo t ; N_0 es la concentración de gotas al tiempo 0; y $-C$ es la constante de coalescencia.

La relación entre el número de gotas de la emulsión, N y el diámetro promedio de las gotas de aceite ($d_{3,0}$) está dado por:

$$N = 6\phi/\pi d_{3,0}^3$$

Donde ϕ es la fracción del volumen de la fase dispersa y $d_{3,0}$ es: $(\sum n_i d_{1,0}^3 / \sum n_i)^{1/3}$ donde $n_1, n_2, n_3, \dots, n_i$ son el número de gotas con diámetros $(d_{1,0})_1, (d_{1,0})_2, (d_{1,0})_3, \dots, (d_{1,0})_i$

Por lo tanto, al graficar N_t/N_0 contra el tiempo t , se obtiene una línea recta en donde la pendiente es la tasa de coalescencia $-C$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de plántulas e inducción de callo

En especies con semillas duras como *P. laevigata*, se requiere de estímulos externos que provoquen la ruptura de la testa, razón por la que se propuso la escarificación mecánica como una estrategia para promover la germinación en especies del género *Prosopis* (Vilela y Raveta 2001). Durante los ensayos no se presentó contaminación en las semillas y se obtuvo un porcentaje de germinación del 98%, además todas las semillas que germinaron lo hicieron entre los 5-7 d después de sembradas (figura 6a). Estos resultados son similares a los reportados por Buendía-González y col. (2007) quienes obtuvieron un porcentaje de germinación del 100% cuando se aplicó escarificación mecánica en semillas de *P. laevigata*. Lo anterior corrobora que la estrategia de escarificación y germinación desarrollada en este trabajo fue la apropiada. Las plántulas (figura 6b) se mantuvieron en la cámara de cultivo para su desarrollo durante 15 d y posteriormente se utilizaron como fuentes de explante para la inducción de callo.

Las respuestas de los tratamientos con diferentes combinaciones de RCV, su concentración y el tipo de explante sobre la inducción de callo, se muestran en el cuadro 1. Después de 8 d de iniciado el tratamiento los explantes colocados en el medio MS sin RCV (control) no produjeron callo y murieron. La desdiferenciación del tejido a callo, solo se observó con la presencia de algunos de los tratamientos probados (figura 6c), comportamiento que también ha sido reportado con otras especies como *Sterculia urens* (Sunnichan y col., 1998), *Rudgea jasminoides* (Stella y Braga 2002), *Saussurea obvallata* (Dhar y Joshi 2005) y *Buddleja cordata* (Estrada-Zuñiga y col., 2009). Esto se explica porque la inducción y desdiferenciación de los callos está determinada por los RCV (Luciani y col., 2006).

El análisis estadístico de los datos con un nivel de confianza del 95% indicó que la inducción de callo se vio afectada por los diferentes RCV probados, la concentración de estos y el tipo de explante utilizado. La auxina 2,4,5-T fue el componente de los tratamientos que promovió la inducción de callo de forma significativa (cuadro 1), alcanzando el mayor porcentaje de inducción de callo posible (100%) con las combinaciones de RCV 5.0 μM de 2,4,5-T+5.0 μM de CIN y 5.0 μM de 2,4,5-T+5.0 μM de BAP. Con relación a la concentración de los RCV (cuadro 1), de todos los tratamientos evaluados con 0.5 μM , solo se desarrollo callo con 2,4-D; 2,4-D+CIN; 2,4,5-T+CIN y 2,4,5-T+BAP, sin embargo los porcentajes alcanzados no rebasaron el 20% de inducción de callo. En contraste, con BAP a 5.0 y 10 μM se alcanzaron porcentajes importantes (68.75 y 62.5%, respectivamente), sin embargo estos fueron significativamente menores al 100% que se obtuvo con 2,4,5-T+CIN y 2,4,5-T+BAP a una concentración de 5.0 μM .

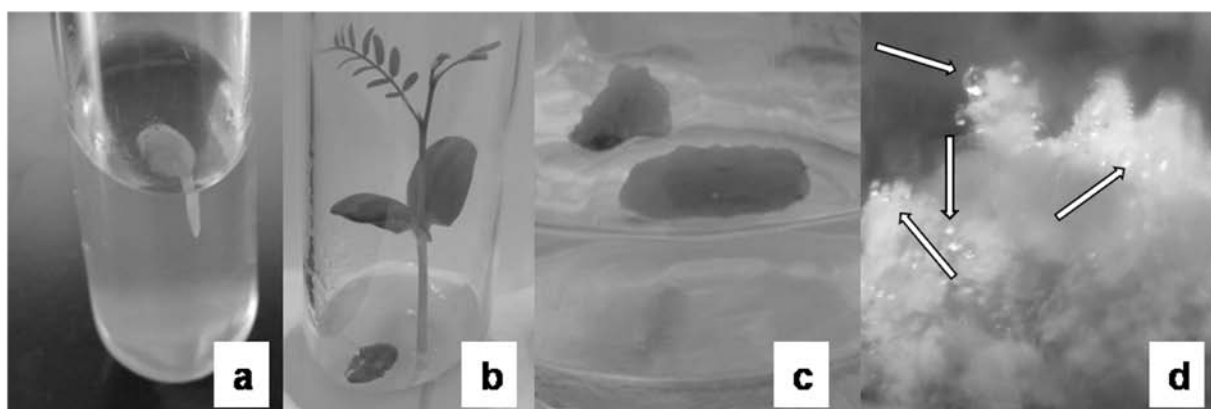


Figura 6 Inducción de callo de *Prosopis laevigata*. Germinación de semillas (a); Plantula de 15 días de edad (b); Explantes de hipocótilo formando callo (c); Presencia de exudado tipo goma (señalado por las flechas) en la superficie de callos de *Prosopis laevigata* (d).

Cuadro 1 Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal (RCV), su concentración y el tipo de explante sobre el porcentaje de inducción de callo de *P. laevigata*

RCV	Concentración de RCV (μM)								
	0.5			5.0			10		
	Explante								
	Hip	Cot	Hoja	Hip	Cot	Hoja	Hip	Cot	Hoja
Control	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
CIN	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	31.2 ^{ef}	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
BAP	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	31.2 ^{ef}	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
2,4-D	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	68.7 ^l	18.7 ^{cd}	43.7 ^{tg}	62.5 ^l	18.7 ^{cd}	0.0 ^a
2,4-D + CIN	0.0 ^a	18.7 ^{cd}	0.0 ^a	18.7 ^{cd}	0.0 ^a	25.0 ^{de}	18.7 ^{cd}	25.0 ^{de}	0.0 ^a
2,4-D + BAP	0.0 ^a	12.5 ^{bc}	0.0 ^a	75.0 ^k	0.0 ^a	0.0 ^a	31.2 ^{ef}	18.7 ^{cd}	0.0 ^a
ANA	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	62.5 ⁱ	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
ANA + CIN	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	62.5 ⁱ	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
ANA + BAP	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	25.0 ^{de}	0.0 ^a	31.2 ^{ef}	18.7 ^{cd}	31.2 ^{ef}	0.0 ^a
2,4,5-T	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	87.5 ^l	50.0 ^{gh}	43.7 ^{tg}	50.0 ^{gh}	31.2 ^{ef}	0.0 ^a
2,4,5-T + CIN	12.5 ^{bc}	6.2 ^{ab}	0.0 ^a	100 ^m	50.0 ^{gh}	75.0 ^k	50.0 ^{gh}	37.5 ^{ef}	0.0 ^a
2,4,5-T + BAP	18.7 ^{cd}	6.2 ^{ab}	0.0 ^a	100 ^m	87.5 ^l	93.7 ^{lm}	37.5 ^{ef}	25.0 ^{de}	0.0 ^a

Los porcentajes de inducción de callo son promedios de dos experimentos independientes. Letras distintas en columnas y renglones indican diferencia significativa. Comparación de medias por el método de Tukey ($P \geq 0.05$)

Algunos trabajos reportan intentos para inducir la formación de callo en especies del género *Prosopis* utilizando auxinas o citocininas de manera individual, e.g. ANA y BAP. Sin embargo no fue posible la inducción de callo en estas condiciones con *P. juliflora* (Nandwani y Ramawat, 1991) y *P. tamarugo* (Nandwani y Ramawat, 1992), siendo necesario, en ambos casos, el uso de una combinación de estos RCV para la inducción del callo.

Por su parte, los resultados muestran que el hipocotilo fue el mejor tipo de explante probado (cuadro 1). Esto concuerda con lo reportado por Nandwani y Ramawat (1991, 1992) quienes utilizaron exitosamente hipocotilo como explante para la inducción de callo de *P. tamarugo* and *P. juliflora*.

En suma, los tratamientos con 2,4,5-T+CIN y 2,4,5-T+BAP a concentraciones 5.0 μ M resultaron los más eficientes para inducir callo cuando se utilizó hipocótilo como fuente de explante. No obstante, los callos provenientes de la combinación 2,4,5-T+CIN se disgregaron fácilmente en medio de cultivo líquido, presentaron un color verde claro y una consistencia suave al tacto. De esta manera, estos cultivos de callos se sembraron en medio fresco cada 30 d y después de la cuarta resiembra se observó en la superficie la formación de un exudado tipo GM (goma de callo, GMc) (figura 6d) similar al que producen explantes nodales de *P. laevigata* cultivados *in vitro* (Orozco-Villafuerte y col., 2003 y 2005). Es difícil explicar este resultado, sin embargo podría relacionarse con el efecto combinado de la auxina 2,4,5-T y la Cinetina. En este sentido, Greenwood y Morey (1979) reportaron el uso de este RCV para inducir la producción de goma y la formación de pozos de goma en floema de árboles silvestres de *P. glandulosa*.

Con base en los resultados descritos anteriormente, se utilizaron los callos obtenidos con la combinación 2,4,5-T+CIN 5.0 μ M provenientes de hipocótilo para establecer el cultivo de células en suspensión de *P. laevigata*.

5.2 Cinéticas de crecimiento en matraz y Biorreactor

Las curvas de crecimiento y viabilidad de las suspensiones celulares de *Prosopis laevigata* cultivadas a nivel de matraz y biorreactor se muestran en la figura 7. Cuando las células fueron crecidas en matraz (figura 7a), se presentó un periodo de adaptación corto (fase lag) que duró 4 d, después de esto hubo un crecimiento exponencial hasta los 16 d de cultivo, tiempo en el que se alcanzo una biomasa máxima de 11.9 g de masa seca/L, después se detuvo el crecimiento y ya no se registro un aumento en la biomasa. Las células crecieron con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.14 d^{-1} y presentaron un tiempo de duplicación (t_d) de 6.6 d. Además, la viabilidad celular se mantuvo a lo largo del cultivo con valores alrededor del 72% de células viables, lo que confirma el establecimiento exitoso del cultivo de células en suspensión de *P. laevigata*. Un comportamiento similar fue reportado en el establecimiento de líneas celulares de otras especies (Azevedo y col., 2008; Estrada-Zuñiga y col., 2009).

En contraste, cuando las células crecieron en biorreactor (figura 2b), no se presentó una fase lag y el cultivo inició su crecimiento exponencial desde el primer día hasta llegar a una biomasa máxima de 16.6 g de masa seca /L a los 14 d de cultivo. La μ en el biorreactor fue de 0.08 d^{-1} y el t_d de 9 d. La viabilidad celular disminuyo del 70 al 60% sin que esto fuera un factor que afectara su crecimiento.

Las diferencias en biomasa máxima, perfil de crecimiento, viabilidad y parámetros cinéticos entre matraces y biorreactor se deben principalmente a los distintos tipos de mezclado y suministro de oxígeno que se presentan en ambos sistemas (Pan y col., 2000). Estas características, a su vez, promueven diferencias en la composición de los gases, la transferencia de masa y el nivel de estrés suministrado a las células.

Al respecto, Pan y col. (2000) reportan el escalamiento de cultivos de células en suspensión de *Taxus chinensis*. La línea celular fue cultivada en matraces Erlenmeyer de 250 mL y en un bioreactor tipo tanque agitado con un volumen de

trabajo de 1.3 L. La biomasa máxima fue de 16.75 g ms/L con una μ de 0.088 d⁻¹ para matraces y 16.2 g ms/L de biomasa máxima y una μ de 0.082 d⁻¹ para biorreactor. No se presentó una diferencia en biomasa, pero al igual que para *P. laevigata*, la μ fue 0.006 d⁻¹ menor en el cultivo a nivel de biorreactor. Los autores no reportan la viabilidad de los cultivos, pero siguieren que el recambio de gases a nivel de biorreactor puede ser un factor que afecte el crecimiento y la μ en los cultivos.

En contraste, Raposo y Lima-Costa (2006) reportan diferencias en biomasa máxima durante el cultivo de células en suspensión de *Centaurea calcitrapa* a nivel de matraz de 10 g ms/L y en el biorreactor tipo tanque agitado solo 8.5 g ms/L. Esto lo atribuyen a la sensibilidad de las células al estrés provocado por la aireación y agitación en el biorreactor. Los autores reportan que la viabilidad celular de los cultivos de *C. calcitrapa* tiene una caída desde el 80% hasta el 34%. Mientras que las células de *P. laevigata* mantienen una viabilidad celular del 60% (figura 7b).

Los resultados de la caracterización cinética demuestran que la línea celular de *P. laevigata* establecida en este trabajo, tiene la capacidad de crecer adecuadamente tanto a nivel de de matraz, como en biorreactor. Aun mas, se demuestra que esta línea celular es más resistente al estrés hidrodinámico que otras especies como *Centaurea calcitrapa* o *T. chinensis*, como lo indican los valores de viabilidad registrados y el mayor valor de biomasa alcanzado en el biorreactor.

5.3 Caracterización morfológica de las células crecidas en matraz y biorreactor

Los resultados obtenidos del análisis morfológico de las células en suspensión de *P. laevigata* durante su crecimiento en matraces se muestran en el cuadro 2. Los agregados celulares (figura 8a) presentaron un tamaño promedio cercano a los 0.07mm² durante los primeros 4 d de cultivo (fase lag), lo cual coincide con los valores de biomasa más bajos.

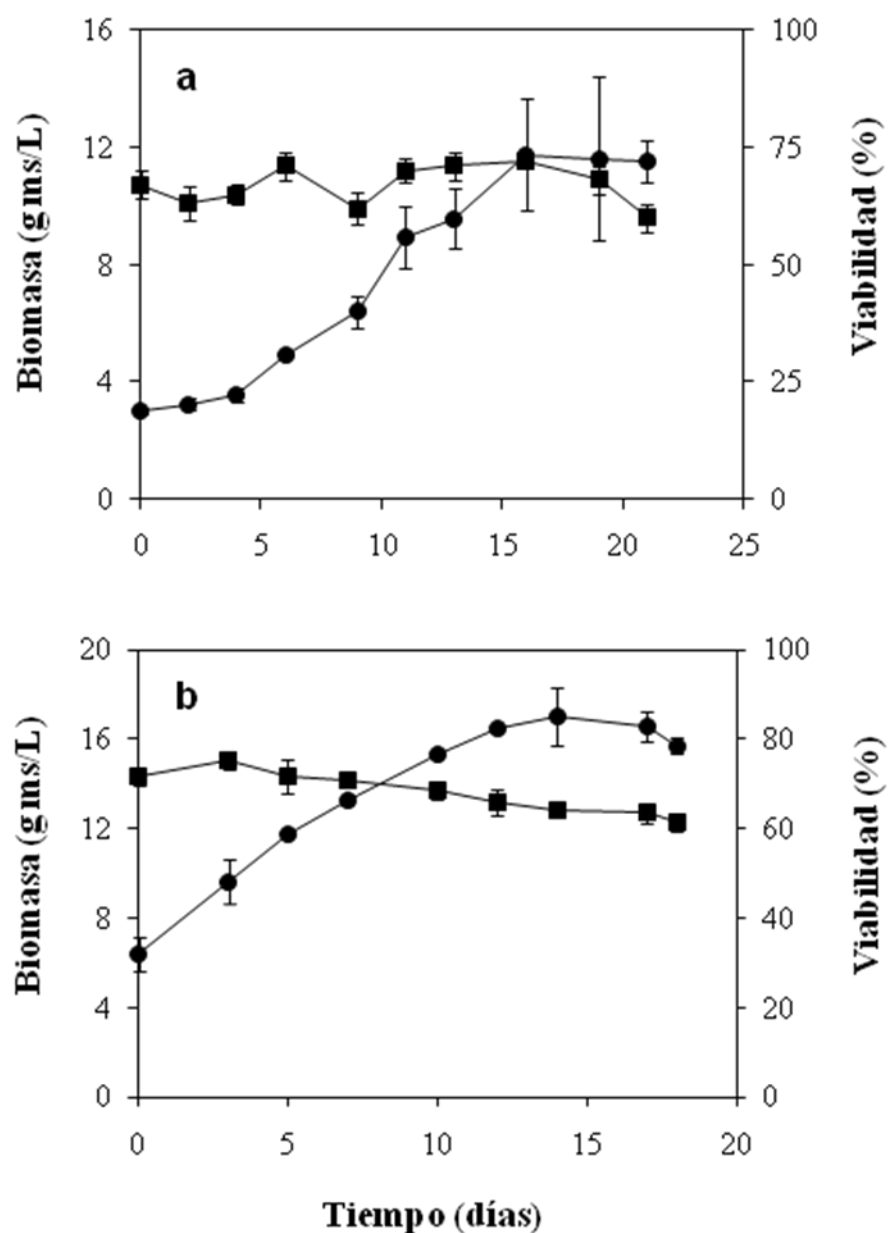


Figura 7 Cultivos de células en suspensión de *P. laevigata* crecidos a nivel de matraz (a) y biorreactor (b). Biomasa(●); Viabilidad (■).

Por el contrario, durante la fase exponencial de crecimiento y a medida que se presentó el aumento de la biomasa, también aumentó el tamaño promedio de los agregados hasta alcanzar valores cercanos a 0.1mm^2 . Este comportamiento difiere

con lo reportado por Raposo y Lima-Costa (2006) para *C. calcitrapa* crecida a nivel de matraz, quienes encontraron que no hay un cambio en tamaño de los agregados durante el cultivo. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Rodríguez-Monroy y col. (2004) con células de *Solanum chrysotrichum*, quienes demostraron que hay un aumento en el tamaño de agregados durante el cultivo y que este coincide con el incremento de la biomasa. En relación a tamaño de los agregados, los de *P. laevigata* son ca. del 25% menores a los de *S. chrysotrichum* y 35% menores a los de *C. calcitrapa*. La tendencia a formar agregados celulares durante el crecimiento de los cultivos es un comportamiento característico de los cultivos de células vegetales en suspensión (Zhong 2001) y esta característica probablemente está relacionada con las propiedades de cohesión presentes en la pared celular durante la división celular de los cultivos (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy 2007).

Cuadro 2 Tamaño (área mm²) y forma (Factor de Forma Eliptica) de los agregados celulares de *P. laevigata* crecida en matraces

Tiempo de cultivo* (días)	Biomasa (g ms L ⁻¹)	Area promedio (mm ²)	FFE
0	2.99 ± 0.113	0.0724 ± 0.013	4.08
2	3.21 ± 0.194	0.0693 ± 0.027	3.86
4	3.53 ± 0.246	0.0745 ± 0.039	3.74
6	4.89 ± 0.080	0.0823 ± 0.033	3.62.
9	6.38 ± 0.539	0.0832 ± 0.024	3.14
11	8.93 ± 1.050	0.0856 ± 0.036	3.28
13	9.58 ± 1.010	0.0861 ± 0.042	2.96
16	11.76 ± 1.907	0.0954 ± 0.029	2.74
19	11.62 ± 2.770	0.1067 ± 0.035	2.58
21	11.54 ± 0.699	0.0974 ± 0.042	2.60

*Las muestras corresponden a los días en que se tomaron las muestras de la cinética de crecimiento

De acuerdo con Kieran y col. (1997), en comparación con microorganismos, las células vegetales son mucho más grandes y tienen la característica de formar grandes agregados celulares, lo que las hace sumamente sensibles al estrés hidrodinámico cuando son cultivadas a nivel de biorreactor. Esto a su vez limita su crecimiento y en consecuencia no solo evita la formación de agregados celulares mayores a los obtenidos en matraces, sino que promueve su rompimiento provocando una disminución de tamaño durante su crecimiento. Este comportamiento difiere con los resultados encontrados en este estudio (cuadro 3) en donde se aprecia un ligero incremento en el tamaño promedio de los agregados durante su crecimiento. Es posible que este resultado esté relacionado con un menor tamaño de los agregados celulares, comparados con otras especies vegetales (*Centaurea calcitrapa*; Raposo y Lima-Costa 2006) y que esto a su vez le confiera una mayor resistencia al estrés hidrodinámico.

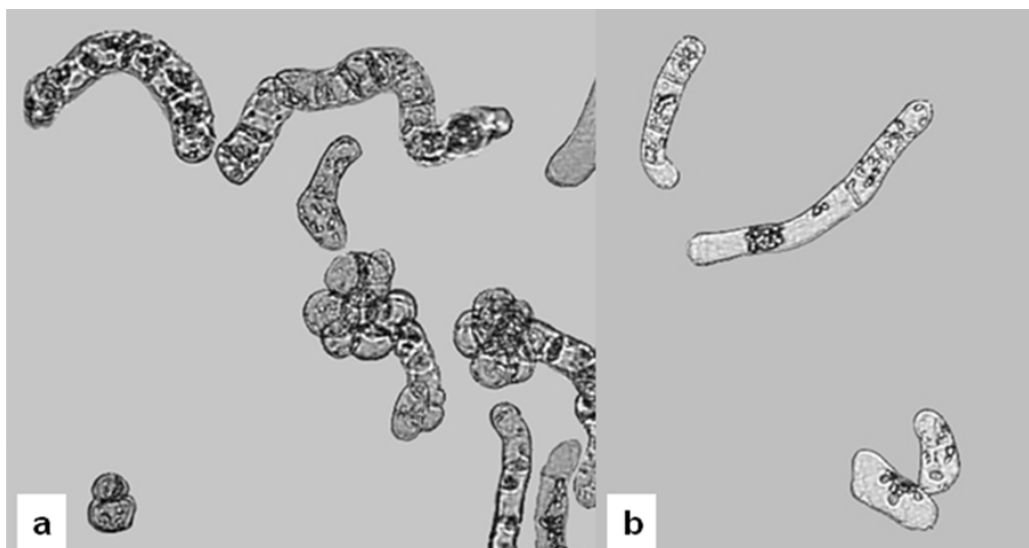


Figura 8 Fotomicrografías (10X) de células y agregados celulares de *P. leavigata* crecidas a nivel de matraz (a) y Biorreactor (B), después de 15 d de cultivo.

Por otro lado, el FFE que fue utilizado para caracterizar la forma de las células y agregados, presentó un comportamiento similar cuando estas fueron crecidas en matraz (cuadro 2) y biorreactor (cuadro 3). Al inicio del cultivo se presentaron los valores más altos, 4.08 y 3.98 y decrecieron hasta valores de 2.6 y 2.39 (para matraces y biorreactor, respectivamente) con el incremento de la biomasa hacia el final del cultivo.

Cuadro 3 Tamaño (área mm²) y forma (Factor de Forma Elíptica) de los agregados celulares de *P. laevigata* crecida en biorreactor

Tiempo de cultivo* (días)	Biomasa (g ms L ⁻¹)	Area promedio (mm ²)	FFE
0	6.39 ± 0.113	0.0664 ± 0.017	3.98
3	9.64 ± 0.194	0.0636 ± 0.011	3.52
5	11.65 ± 0.246	0.0657 ± 0.019	3.23
7	13.27 ± 0.080	0.0693 ± 0.023	3.02.
10	15.35 ± 0.539	0.0702 ± 0.018	2.84
12	16.52 ± 1.050	0.0708 ± 0.022	2.93
14	17.02 ± 1.010	0.0691 ± 0.012	2.86
17	16.58 ± 1.907	0.0714 ± 0.026	2.64
18	15.71 ± 2.770	0.0710 ± 0.015	2.39

*Las muestras corresponden a los días en que se tomaron las muestras de la cinética de crecimiento

Estos resultados indican que los agregados cambian de formas alargadas a redondas durante el tiempo de cultivo. Kieran y col. (1997) mencionan que existe una diversidad de formas que van desde agregados redondos (esféricos) a cilíndricos (alargados) y que estas dependen tanto de los factores ambientales a los cuales son sometidas las células, como a la edad del cultivo e incluso a la especie. Destacan

además, que por estas razones resulta importante caracterizar de manera individual a los cultivos si se tiene considerado escalarlos a nivel de biorreactor. Al respecto Curtis y Emery (1993) y Trejo-Tapia y col. (2001) reportan que la morfología de diferentes cultivos de células en suspensión afecta de manera importante la reología de los caldos de cultivo cuando son crecidos en biorreactor. Lo anterior, se torna importante porque este parámetro es primordial para determinar los requerimientos de potencia y de transferencia de masa en el biorreactor (Rodríguez-Monroy y Galindo 1999).

5.4 Transferencia y requerimientos de oxígeno en el biorreactor

En un cultivo de células vegetales a nivel de biorreactor se pueden alcanzar densidades celulares superiores a las encontradas en cultivo a nivel de matraz, lo que provoca cambios en la reología del sistema y en consecuencia se presenta una reducción significativa en la transferencia de gases y nutrientes en el sistema (Zhao y Verpoorte 2007). En general con el incremento en la velocidad de agitación y en la tasa de aireación se pueden mejorar tanto la transferencia de masa (oxígeno y nutrientes) como el mezclado. No obstante, esto puede derivar en un mayor consumo de potencia y en daño celular por efecto del estrés hidrodinámico (Doran 1995). Lo anterior, nos conduce a buscar las condiciones de aireación y agitación que proporcionen un balance adecuado entre mejorar la transferencia de masa y evitar el daño celular.

Existe en la literatura reportes de trabajos con células vegetales en suspensión crecidas en biorreactor tipo tanque agitado, en donde se muestra una gama de condiciones de agitación y aireación. Por ejemplo Raposo y Lima-Costa (2007) reportaron el cultivo de células en suspensión de *Centaurea calcitrapa* a nivel de biorreactor con velocidades de agitación entre 30 y 250 rpm y una tasa constante de aireación de 0.084 vvm. Por su parte Pan y col. (2000) crecieron células de *Taxus chinensis* con velocidades de agitación entre 150 y 300 rpm y flujos de aire entre

0.05 y 0.4 vvm. En un trabajo con varias especies Scragg y *col.* (1988) utilizaron velocidades de agitación hasta de 1000 rpm. En general todos concluyen que las mejores condiciones de cultivo en un tanque agitado están directamente relacionadas con la especie, sin embargo puntualizan que un nivel de agitación medio que evite la sedimentación, la pérdida de viabilidad celular y promueva un incremento en la biomasa es lo adecuado. Además dan particular importancia al nivel de oxígeno disuelto en el medio, el cual puede ser controlado a través de la velocidad de agitación junto con el flujo de aire. En este sentido, Schlatmann y *col.* (1994) reportan que el nivel de oxígeno adecuado para el desarrollo de un cultivo de células en suspensión de *C. roseus* está entre el 29% y el 43% de saturación de aire en el sistema. Esto es acorde con lo encontrado por Pareilleus y Vinas (1983) quienes reportan que en un cultivo de células en suspensión de *C. roseus* en biorreactor, la concentración crítica de oxígeno disuelto corresponde al 20% de saturación de aire en el tanque.

En consecuencia y después de llevar a cabo pruebas preliminares, para este trabajo se determinó utilizar una velocidad de agitación de 400 rpm y un flujo de aire de 0.1 vvm en el biorreactor para el crecimiento de células en suspensión de *P. laevigata*. Con estas condiciones de cultivo se aseguró que no se presentara una sedimentación celular y que la tensión de oxígeno disuelto se mantuviera a niveles superiores al 30% de saturación durante todo el tiempo de cultivo.

La velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y el consumo específico de oxígeno (QO_2X) se muestran en la figura 9. Al inicio del cultivo en biorreactor se presenta el máximo QO_2X (0.12 Kg O_2 / Kg msv d; figura 9a) lo que nos indica que las células están utilizando una gran cantidad de oxígeno probablemente como respuesta a las condiciones de estrés hidrodinámico al que fueron expuestas al pasar de matraz a biorreactor. Una vez que transcurre el tiempo de cultivo, los valores de QO_2X bajan hasta lograr una estabilidad y siguen una tendencia paralela al aumento de biomasa viable. Este

comportamiento ha sido descrito por Zhong (2001), quien menciona que al cambiar las células de un nivel de matraz a biorreactor, se presenta un cambio drástico en el medioambiente en el que se desarrollan las células obligándolas a adaptarse a las nuevas condiciones de cultivo.

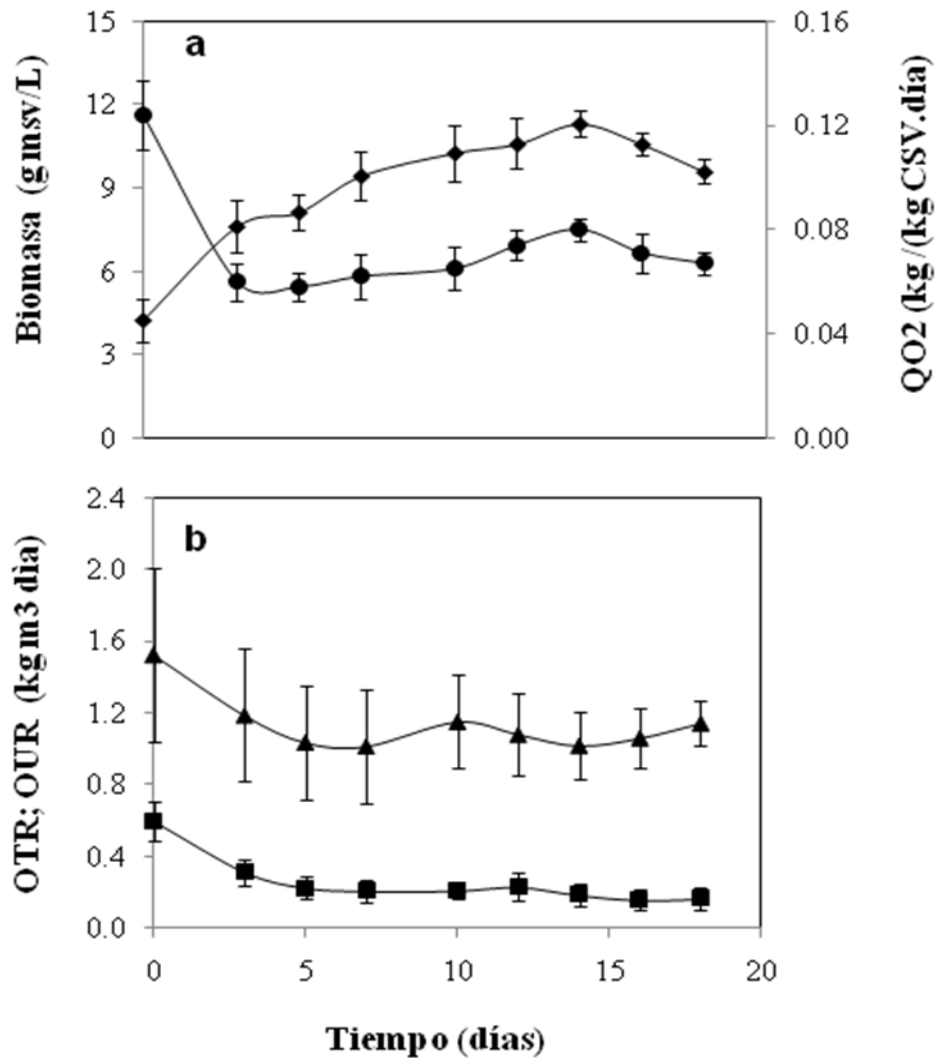


Figura 9 Transferencia de oxígeno en el biorreactor y requerimientos de oxígeno de las células de *P. laevigata*: a) Biomasa viable (♦) y QO₂X (•); b) OTR (▲) y OUR (■).

Los resultados de la determinación de OTR y OUR (figura 9b) muestran que durante toda la cinética del cultivo, la OTR siempre fue mayor a la OUR, garantizando que el cultivo no presentó limitaciones por oxígeno para el crecimiento celular.

Si se toman en cuenta los resultados de biomasa, viabilidad, morfología y el balance positivo entre transferencia y consumo de oxígeno de las células en suspensión de *P. laevigata* en el biorreactor, podemos precisar que la línea celular generada, tiene la capacidad para desarrollarse en un cultivo a nivel de biorreactor con condiciones de agitación y aireación en que otras especies no pueden hacerlo (e.g. *T. chinensis* Pan y col., 2000), lo que nos sugiere que es una especie resistente al estrés hidrodinámico.

5.5 Caracterización química de las gomas obtenidas *in vitro*

La comparación del análisis químico de la goma proveniente de las suspensiones celulares de *P. laevigata* crecidos en matraz (GMm) y bioreactor (GMb), con la goma de mezquite (GM) y el exudado tipo goma proveniente de callos (GMc) se presenta en el cuadro 4. Todas las muestras están formadas por dos fracciones principales, carbohidratos (70-90 %) y proteína (2-12%). Se encontró que los azúcares neutros detectados en la goma producida por los CCV de *P. laevigata* (GMc, GMm y GMb) corresponden a los azúcares mayoritarios que forman la fracción del polisacárido de la GM producida por árboles silvestres. Este resultado es similar al encontrado para muestras de goma de *P. vetulina* (López-Franco y col., 2008) de *P. laevigata* (Orozco-Villafuerte y col., 2005) y para GM producida *in vitro* con explantes nodales de *P. laevigata* (Orozco-Villafuerte y col., 2003). Sin embargo, aun cuando el perfil de azúcares neutros es similar, en lo que respecta a ácido glucurónico, galactosa y arabinosa, los porcentajes de estos cambian. El contenido de arabinosa es sustancialmente más bajo (17.8% y 15.4%) en GMm y GMb en comparación con la GM y GMc (62.2% y 67.2%).

Cuadro 4 Comparación química de la GM, de árboles silvestres y de GMc, GMm y GMb de CCV en suspensión de *P. laevigata*.

	GM	GMc	GMm*	GMb*
AGPs	+	+	+	+
Proteína Total ^a	6.9	1.9	11.7	8.1
Azúcares totales ^a	86.2	75.5	69.8	83.8
Acido glucuronico ^b	11.8	8.37	11.2	9.0
Galactosa ^b	22	24.3	28.1	30.3
Arabinosa ^b	65.2	67.2	17.8	15.4
Ramnosa ^b	ND	ND	ND	ND

ND: No detectado por el método; +: Positivo al Reactivo de Yariv; *: Obtenidos de las respectivas cinéticas en el último día de cultivo; a: Porcentajes en base seca; b: Porcentajes en base a los azúcares totales.

Con relación al contenido de proteína, existen diferencias entre todas las muestras, la GMm y GMb presentaron valores del 11.7% y 8.1 % respectivamente, mientras que la GM y GMc tuvieron valores de 6.9% y 1.9%. Las diferencias en porcentajes de los de polisacáridos y proteínas de los cultivos *in vitro* con los de la GM de referencia, indican que es posible que además de estos, se secreten también macromoléculas distintas a las de la goma, como ha sido reportado en cultivos de *Silene vulgaris* (Gunter y Ovodov 2007) y *Beta vulgaris* (Rodríguez-Monroy y Galindo 1999), respectivamente.

Las células en suspensión de *P. laevigata* secretan AGPs al medio de cultivo durante su crecimiento en matraces y biorreactor (figura 10). La secreción de AGPs también se ha reportada en cultivos de células en suspensión de otras especies como *Malus domestica* (Reid y col., 1999), *Daucus carota* (Immerzeel y col., 2004), *Silene vulgaris* (Günter y Ovodov 2007); *Silybum marianum* (Sánchez-Sanpedro y col., 2008) y *Beta vulgaris*. (Capataz-Tafur y col., 2010).

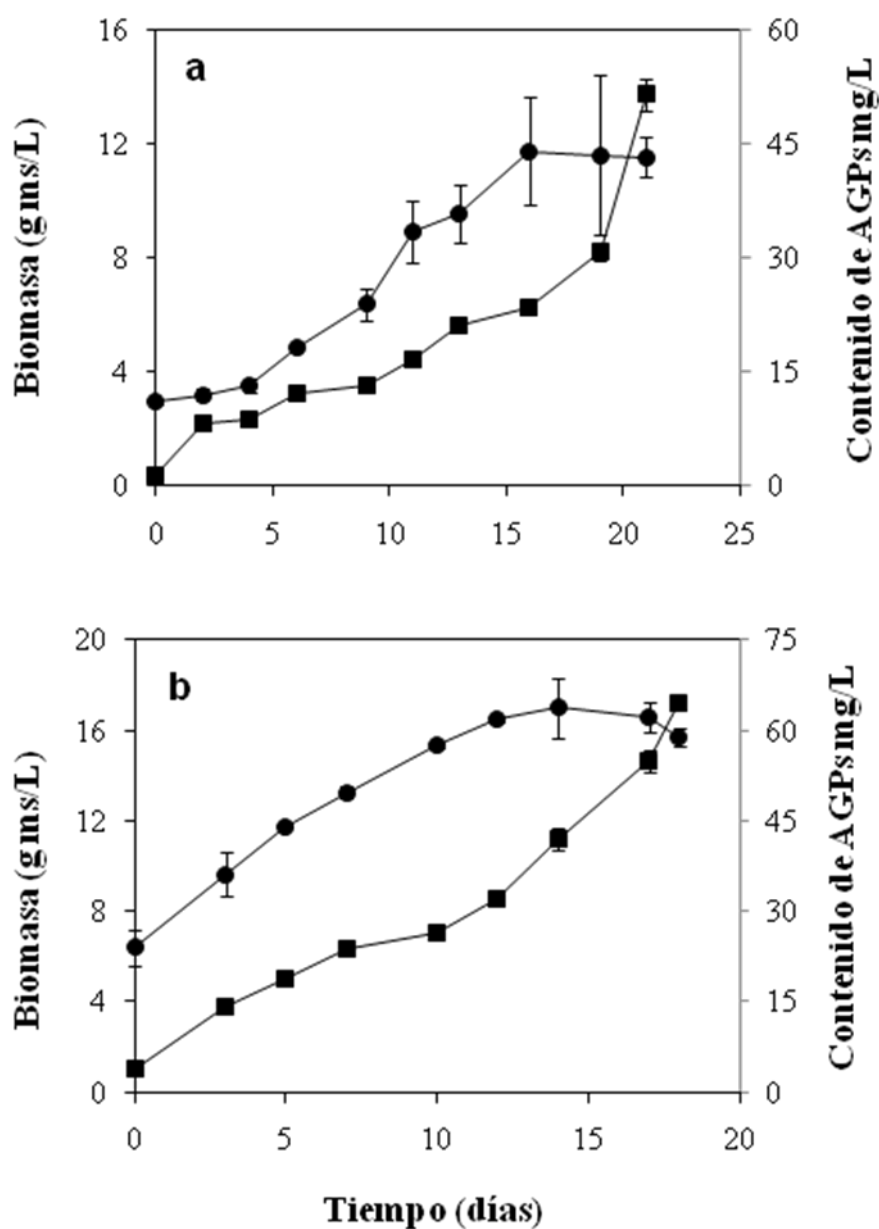


Figura 10 Perfiles de crecimiento (•) y contenidos de AGPs (■) en el medio de cultivo de suspensiones celulares de *P. laevigata* durante su desarrollo en matraces (a) y biorreactor (b).

De acuerdo con Classen (2007), la secreción de AGPs en los CCV en suspensión se explica si tomamos en cuenta que en los tejidos de las plantas, las AGPs son mayoritariamente secretadas a los espacios intercelulares, así de forma análoga, el medio de cultivo representa al espacio intercelular, lo que permite la acumulación de las AGPs.

La secreción de estas glicoproteínas se incrementó siguiendo el patrón de crecimiento de las células independientemente del sistema en que se desarrollaron (matraces o biorreactor). En los cultivos crecidos en matraz, se alcanzó un contenido máximo de AGPs de 53.5 mg/L en el día 21 que corresponde a la fase estacionaria de la cinética de crecimiento (figura 10a). Este comportamiento se repitió cuando las células fueron crecidas en el biorreactor (figura 10b) en donde se alcanzó un contenido máximo de AGPs de 64.5 mg/L en el día 18 de cultivo. Lo anterior sugiere que puede existir una relación entre el crecimiento celular y la secreción de AGPs, tal como ha sido reportado para *Arabidopsis thaliana* (Darjania et al. 2002) y *Beta vulgaris* (Capataz-Tafur et al. 2010).

Además de la presencia de AGPs en la goma de las suspensiones celulares, estas glicoproteínas también se detectaron en la goma colectada de árboles silvestres y en la producida en callos. Este hecho nos sugiere que las AGPs encontradas en los cultivos in vitro, pueden ser del mismo tipo que las de la GM.

El hecho de que los perfiles de azúcares neutros y la fracción proteica secretados al medio de cultivo sean los mismos que están presentes en forma mayoritaria en la GM, además de la presencia de AGPs, nos permite sugerir que los cultivos en suspensión de *P. laevigata* mantienen la capacidad de producir goma de mezquite.

5.6 Propiedades emulsificantes

Con base en los resultados anteriores, se planteo la hipótesis de que la GMc, GMm Y GMb poseen las características emulsificantes presentes en la GM proveniente de arboles silvestres de *P. laevigata*. Las emulsiones elaboradas con GM, GMc, GMm y (figura 11) no presentan diferencia significativa en la absorbancia medida inmediatamente después de formadas (figura 12). En este ensayo turbidimétrico de emulsificación, esto indica que todas las muestras poseen una actividad emulsificante, y en este caso, esta es independiente de las diferencias en el porcentaje de la proteína que poseen (cuadro 4). Lo anterior permite suponer que el componente polisacárido podría tener un papel determinante en las propiedades emulsificantes, tal como lo sugieren Xu y col. (2004) para la GA.

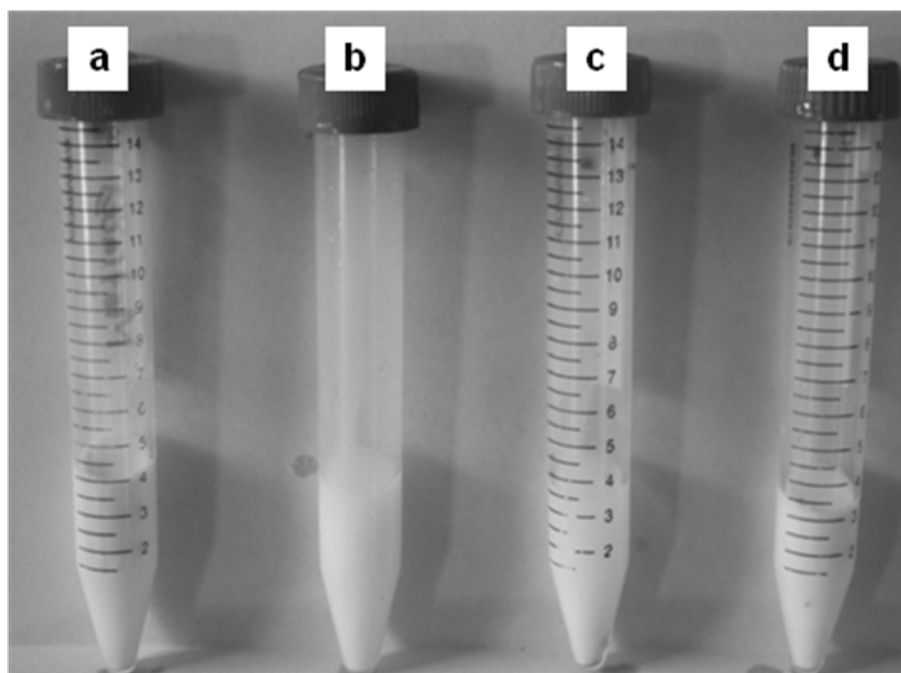


Figura 11 Emulsiones aceite en agua elaboradas con diferentes materiales como agentes emulsificantes. (a) Goma de mezquite; (b) Exudado tipo goma producido por callos de *P. laevigata*; (c) GM producida por de células de *P. laevigata* cultivadas en matraces; (d) GM producida por de células de *P. laevigata* cultivadas en biorreactor.

Por otro lado, todas las emulsiones presentan una disminución significativa en la absorbancia después de 24 h, lo que representa una pérdida de la estabilidad de las emulsiones. En particular, en la emulsión elaborada con GMc, se presentó una separación de fases (rompimiento de la emulsión) después de las 24 h.

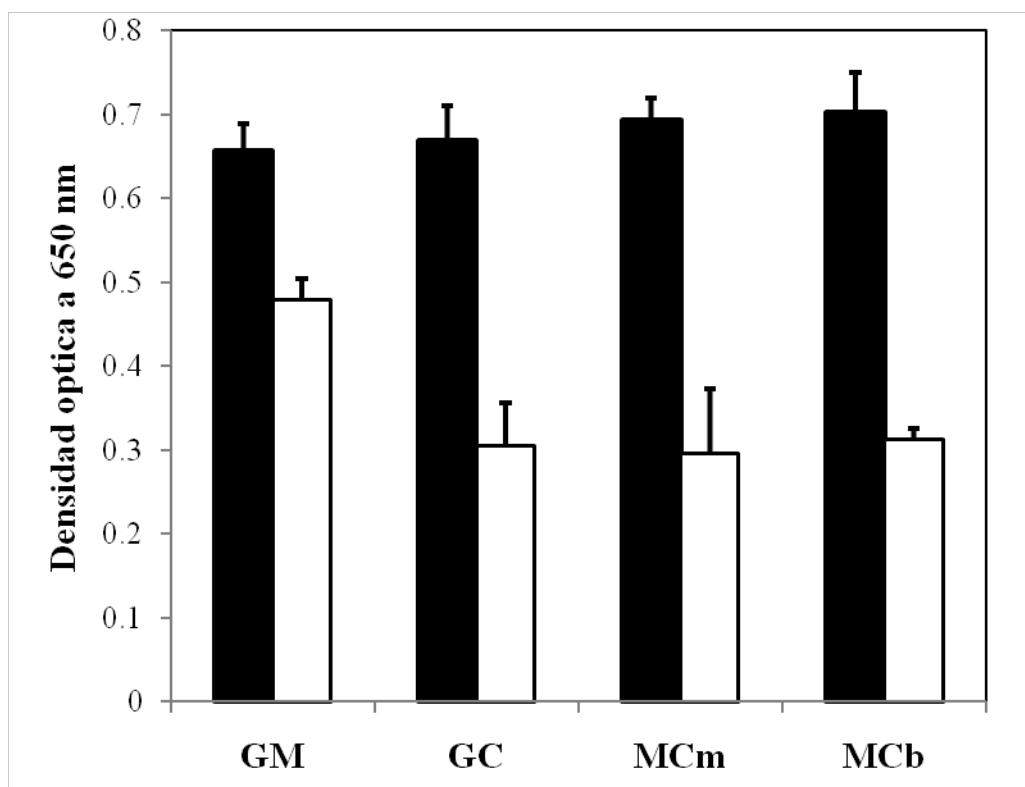


Figura 12 Determinación de la densidad óptica de las emulsiones como una medida para evaluar las propiedades emulsificantes. de la GM; GMc; GMm y GMb. Actividad emulsificante determinada inmediatamente después de formada la emulsión) (Estabilidad emulsificante determinada 24 h después de formada la emulsión). (Las barras de error representan el error estándar de la media de 3 mediciones.

De manera general, la pérdida de estabilidad puede atribuirse a un decremento en el número de gotas de aceite por unidad de volumen de la emulsión, probablemente debido a la coalescencia de estas. Lo que indica que la coalescencia es significativamente menor en la emulsión formulada con GM con respecto a las que se

formaron con GMc, GMm y GMb (figura 12). Con relación a las propiedades emulsificantes de la GM, Román-Guerrero *et al.* (2009) fraccionaron muestras de GM por métodos cromatográficos y reportaron que la GM se compone de tres fracciones que contienen distintos porcentajes de carbohidratos y proteína: GM 91% y 4.9%; F1 93.5% y 0.76%; F2 78.9% y 16.29%; F3 58.16% y 46.21% respectivamente. Evaluaron las propiedades emulsificantes de la GM y sus fracciones, reportando que la GM y F2 tienen mejores propiedades emulsificantes que F1 y F3. Lo anterior lo explican al alto contenido de polisacárido y proteína presente en dichas muestras, lo que permite que la fracción proteica presente una actividad superficial y una fuerte adsorción de la goma en la interfase aceite-agua, mientras que el polisacárido se proyecta dentro de la fase acuosa promoviendo fuerzas estéricas de repulsión que evitan la agregación de las gotas de aceite, confiriéndole estabilidad a la emulsión. Por lo anterior, resulta razonable asumir que la mayor capacidad para estabilizar emulsiones de la GM utilizada, se debe a un balance del contenido proteína/polisacárido más adecuado que el que presentan la GMm y GMb. De la misma manera, el bajo contenido de proteína de la GMc fue suficiente para que se formara la emulsión, sin embargo el balance de alto contenido de polisacárido, bajo contenido de proteína no favoreció la estabilidad.

5.7 Estabilidad de las emulsiones

La estabilidad de las emulsiones puede estudiarse a través de la evolución del tamaño de las gotas de aceite y su distribución. El incremento en el tamaño promedio de las gotas es un indicador de la pérdida de estabilidad de la emulsión y la tasa de crecimiento de las gotas revela el mecanismo responsable de esto. Un mecanismo característico que promueve dicha pérdida de estabilidad es la coalescencia de las gotas de aceite (Silva *et al.*, 2010).

A pesar de que la técnica turbidimétrica provee información confiable de la actividad y estabilidad de una emulsión, no es tan precisa como la caracterización de la emulsión a través del análisis del tamaño de partícula (Aoki *et al.*, 2005). Además no

proporciona información del fenómeno que pueda estar involucrado en la pérdida de estabilidad de la emulsión. En este sentido, la estabilidad de las emulsiones puede estudiarse a través de la evolución del tamaño de las gotas de aceite y su distribución. El incremento en el tamaño promedio de las gotas es un indicador de la pérdida de estabilidad de la emulsión y la tasa de crecimiento de las gotas revela el mecanismo responsable de esto. Un mecanismo característico que promueve la pérdida de estabilidad de una emulsión es la coalescencia de las gotas de aceite (Silva y *col.*, 2010). La coalescencia es la formación de una gota más grande como consecuencia de la fusión de gotas pequeñas. Para ello se requiere que las gotas pequeñas entren en contacto entre sí, luego de cambios a nivel de la interfase entre estas y la fase continua. La degradación de la emulsión por coalescencia se caracteriza por una ampliación en la distribución de tamaño de partículas, con un incremento en el tamaño promedio de gotas con el tiempo.

De las emulsiones elaboradas en este trabajo, aquella en la que se utilizó la GMc como emulsificante, presentó una separación de fases (rompimiento de la emulsión) dentro de las primeras 24 h de formada por lo que no se llevó a cabo un seguimiento de esta. Por otro lado, el cambio en la distribución del tamaño promedio de las gotas en las emulsiones a través del tiempo se muestra en la figura 13. Estos resultados demuestran que en todas las emulsiones se presenta un aumento en el porcentaje de gotas con mayor diámetro promedio con el tiempo. La emulsión que mostro mayor estabilidad fue la formada con GM, mientras que las formadas con GMm y GMb presentaron una estabilidad similar entre ellas y menor a la de la GM (Cuadro 5). No se encontraron diferencias en el tamaño promedio de las gotas ($d_{3,0}$) en las emulsiones recién formadas, sin embargo el tamaño promedio después de 72 h fue menor para la emulsión con GM ($2.1\mu\text{m}$) en comparación con las formadas con GMm y GMb (3.1 y $3.6\mu\text{m}$ respectivamente). Esto se reflejo en la tasa de coalscencia aparente de las emulsiones, en donde se tuvieron valores del orden de 10^{-6} s^{-1} para la emulsión con GM y de 10^{-5} s^{-1} para las emulsiones con GMm y GMb.

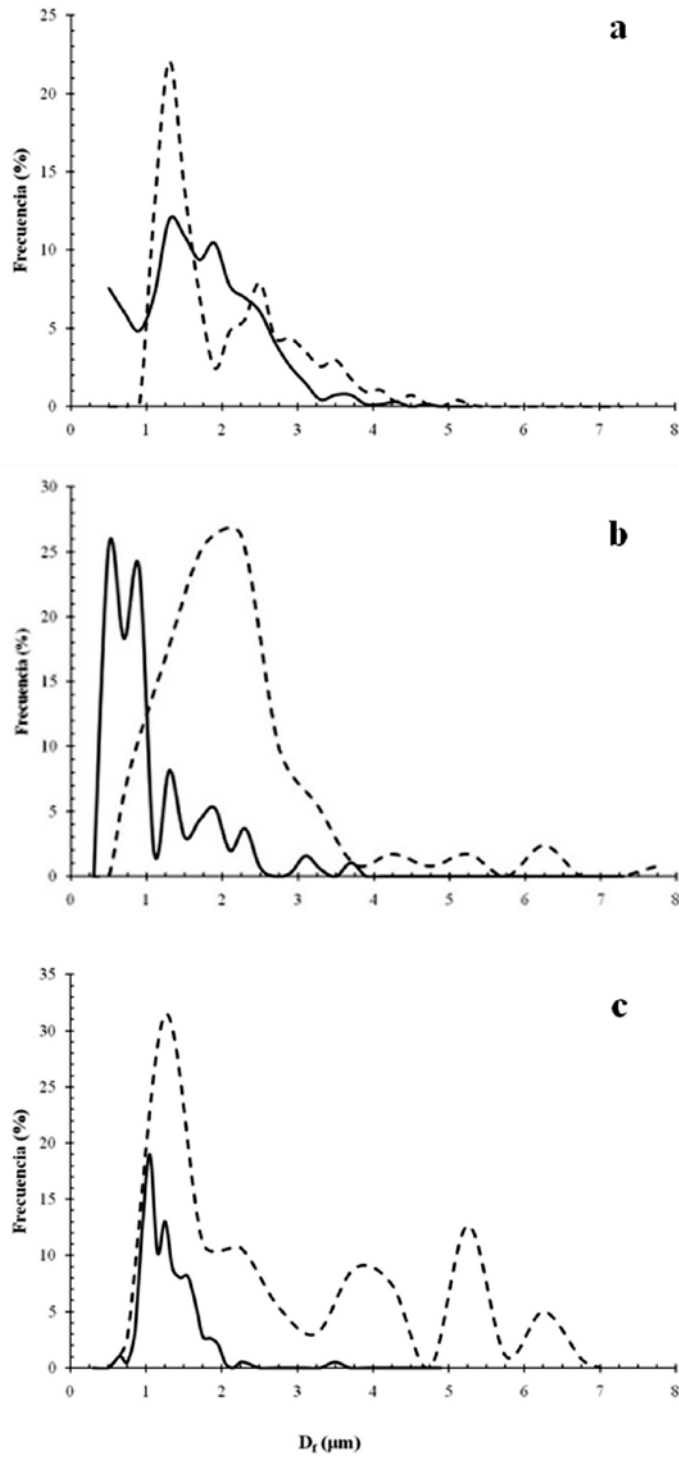


Figura 13 Distribución del tamaño de gotas en emulsiones aceite en agua, estabilizadas con GM (a); GMm (b) y GMb (c). Línea sólida 0 h; Línea punteada 72 h.

Cuadro 5 Tamaño promedio de las gotas de aceite ($d_{3,0}$) y tasa de coalescencia aparente (K_c) en emulsiones aceite en agua con GM, GMc, GMm y GMb como emulsificantes.

Emulsificante	$d_{3,0}$ (μm) t = 0 h	$d_{3,0}$ (μm) t = 72 h	K_c (s^{-1})	R^2
GM	1.6	2.1	6.02×10^{-6}	0.961
GMc	1.4	ND	ND	ND
GMm	1.5	3.1	2.39×10^{-5}	0.955
GMb	1.4	3.6	3.81×10^{-5}	0.879

La estabilidad de una emulsión contra la coalescencia se presenta debido al fuerte efecto estérico de barrera derivado de los bloques del polisacárido que van de la superficie de las gotas hacia la fase continua de la emulsión, a la vez que dichos bloques se anclan a través de la adsorción de la fracción proteica (hidrofóbica) de la goma en la interfase aceite agua (Dickinson 2003). En este sentido, la baja cantidad de proteína presente en la GMc (cuadro 4) resultó determinante para que la emulsión presentara un pobre estabilidad y se diera la separación de fases dentro de las primeras 24 h de haberse formado. De manera opuesta, la mayor cantidad de proteína en la GM, GMm y GMb promovió una mejora en la estabilidad de las emulsiones. Sin embargo, los valores de la K_c son dos (GM) y tres (GMm y GMb) órdenes de magnitud mayores a los reportados por Ruiz-Ramos y *col.* (2006) para emulsiones estabilizadas con GM y mezclas de GM y quitosano. Esta diferencia puede atribuirse principalmente a dos factores; La mayor cantidad de emulsificante utilizado (el doble) y a la combinación GM quitosano, polielectrólitos de cargas opuestas que forman un complejo que tiene la capacidad de promover una mayor estabilidad a las emulsiones.

6. Conclusiones

Las células en suspensión de *Prosopis laevigata* secretan al medio de cultivo azúcares, proteínas y AGPs cuando son cultivadas en matraces y en biorreactor. La comparación de estas macromoléculas con las que constituyen a la goma de mezquite producida por árboles silvestres nos permitió saber que se trata de los mismos monosacáridos que forman su componente polisacárido. Además de que hay también presencia de proteína y AGPs. La producción de este tipo de moléculas por las células son las responsables de las propiedades emulsificantes que presenta el medio de cultivo purificado (GMm y GMb).

REFERENCIAS

- Anderson, D.M., and Farquhar, J.G. 1982. Gum exudates from the genus *Prosopis*. The International Tree Crops Journal. 2: 15-24.
- Anderson, D.M., Howlett J.F. and MacNab, C.G.A. 1985. The amino acid composition of gum exudates from *Prosopis* species. Phytochemistry. 24(11): 2718-2720
- Aoki, T., Decker, E.A., and McClements, D.J. 2005. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes producer by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. Food Hydrocolloids. 19: 209-220.
- Aspinall, G.O. and Whitehead, C.C. 1970. Mesquite gum I. The 4-O-Methylglucuronogalactan core. Canadian Journal Chemistry. 48: 325-242.
- Azevedo, H., Dias, A. and Tavares, R.M .2008. Establishment and characterization of *Pinus pinaster* suspension cell cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 93:115-121.
- Baldwin, C.T., Concha, D., Schindler, T., Seetharaman, G., Stacey, N. and Roberts, K. 2001. DcAGP1, a secreted arabinogalactan protein, is related to a family of basic proline-rich proteins. Plant Molecular Biology 45: 421–435.
- Beristain, C.I., Azuara, E., García, H.S. and Vernon-Carter, E.J. 1996. Kinetic model for water/oil absorption of mesquite gum (*Prosopis juliflora*) and gum arabic (*Acacia senegal*). International Journal of Food Science and Technology. 31(5): 379-386.

- Bosques-Molina, E., Guerrero-Legarreta, I. and Vernon-Carter E.J. 2003. Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum-candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Research International*. 36: 885-893.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Chávez-Avila, V.M. and Vernon-Carter E.J. 2007. Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd M.C. Johnston). I. via cotyledonary nodes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 43:260–266.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Estrada-Zúñiga, M.E., Barrera-Díaz, C.E. and Vernon-Carter, E.J. 2010. *In vitro* lead and nickel accumulation in mesquite (*Prosopis laevigata*) seedlings, *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9(1): 1–9.
- Capataz-Tafur, J., Hernández-Sánchez, A., Rodríguez-Monroy. M., Trejo-Tapia, G. and Sepúlveda-Jiménez, G. 2010. Sucrose induces arabinogalactan protein secretion by *Beta vulgaris* L. cell suspension cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32(4): 757-764
- Classen, B. 2007. Characterization of an arabinogalactan-protein from suspension culture of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 88: 267-275.
- Curtis, W. and Emery, A. 1993. Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnology and Bioengineering*. 42:520-526.

- Darjania, L., Ichise, N., Ichikawa, S., Okamoto, T., Okuyama, H. and Thompson, G.A. 2002. Dynamic turnover of arabinogalactan proteins in cultured *Arabidopsis* cells. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:69–79.
- Dhar, U. and Joshi, M. 2005. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Reports* 24:195-200.
- Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*. 17:25-39.
- Dixon, R.A. 1995. Isolation and maintenance of callus and cell suspensions cultures. In: *Plant cell culture: a practical approach*. Dixon R.A. (ed.). IRL Press, Washington. pp: 1-20.
- Doran, P. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press. London UK.
- Doran, P. 2000 Design of mixing systems for plant cell suspension in stirred reactor. *Biotechnology Progress*. 15:319-335
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28:350-356.
- Estrada-Zuñiga, M.E., Cruz-Sosa, F., Rodríguez-Monroy, M., Verde-Calvo, J.R and Vernon-Carter, E.J. 2009. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 97:39-47.

- Figueiredo, A. 1990. Mesquite: history, composition and food uses. *Food Technology*. 44:118-128
- Garti, N. and Reichman, D. 1993. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Structure*. 12:411-426
- Goycoolea, F.M., Morris E.R, Richardson, R.K. and Bell, A.E. 1995. Solution rheology of mesquite gum in comparison with gum Arabic. *Carbohydrate Polymers*. 27: 37-45
- Goycoolea, F.M., Calderón de la Barca, A.M., Balderrama, J.G. and Valenzuela J.R. 1997. Immunological and functional properties of mesquite gum from northwestern mexican mesquite (*Prosopis spp*) in comparasion with gum Arabic. *International Journal of Biological Macromolecules*. 21: 29-36.
- Greenwood, C. and Morey, P. 1979. Gummosis in honey mesquite. *Botanical Gazette*. 140: 32-38
- Günter, E.A. and Ovodov, Y.S. 2007. Polysaccharides of cell cultures of *Silene vulgaris* *Applied Biochemitry and Microbiology* 43: 84-90.
- Heyser, J.W., Dykes, T.A., Demott, K.J. and Nabors, M.W. 1983. High frecuency, long-term regeneration of rice from callus culture. *Plant Science Letters*. 29: 175-182.
- Immerzeel, P., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. and de Vries, S.C. 2004. Different arabinogalactan proteins are present in carrot (*Daucus carota*) cell culture medium and in seeds. *Physiology Plant* 122:181-189.

- Kieran, P., MacLoughlin, P. and Malone, D. 1997. Plant cell suspension cultures: Some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*. 59: 39-52.
- López-Franco, Y., Valdez, M.A., Hernández, J., Calderón de la Barca, A.M., Rinaudo, M. and Goycoolea, F.M. 2004. Macromolecular dimensions and mechanical properties of monolayer films of Sonorean mesquite gum and its fractions. *Macromolecular Bioscience* 4: 865-874.
- López-Franco, Y., Calderón de la Barca, A.M., Valdez, M.A., Peter, M.G., Rinaudo, M., Chambat, G. and Goycoolea, F.M. 2008. Structural characterization of mesquite (*Prosopis vetulina*) gum and its fractions. *Macromolecular Bioscience* 8(8): 749-757.
- Luciani, G.F., Mary, A.K., Pellegrini, C. and Curvetto, N.R. 2006. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 87: 139-143.
- Machackova, I., Zazimalova, E. and George, E.F. 2008. Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors In: Edwin F. George, Michael A. Hall y Geert-Jan De Klerk (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Volume 1. The Background*. The Netherlands: Springer, pp 175-204.
- Mollard, A. and J., Joseleau P. 1994. *Acacia senegal* cell culture in suspension secrete a hydroxyproline-deficient arabinogalactan-protein. *Plant Physiology and Biochemistry*. 35(5): 703-709.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473-497.

- Nandwani, D. and Ramawat, K.G. 1991. Callus culture and plantlets formation from nodal explants of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. Indian Journal of Experimental Biology. 29: 523-527
- Nandwani, D. and Ramawat, K.G. 1992. High frequency plantlets regeneration from seedling explants of *Prosopis tamarugo*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 29: 173-178.
- Ollien, C. and Martin, J. Bukovac. 1982. Ethephon-induced gummosis in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). Plant Physiology. 70: 547-555.
- Orozco-Sanchez, F. 2009. Efecto de la oferta de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de terpenoides con células de *Azadirachta indica* en un biorreactor. Tesis de Doctorado. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN.
- Orozco-Villafuerte, J., Ponce-Alquira, E., Cruz-Sosa, F. y Vernon-Carter, E.J. 2003. Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. Carbohydrate Polymers. 54:327-333.
- Orozco-Villafuerte, J., Buendía-González, L., Cruz-Sosa, F. y Vernon-Carter E.J. 2005. Increased mesquite gum formation in nodal explants cultures after treatment with microbial biomass preparation. Plant Physiology and Biochemistry. 54:327-333.
- Pan, Z.W., Wang, H.Q. and Zhong, J.J. 2000. Scale-up on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. Enzyme and Microbial Technology 27: 714–723.

- Pareilleus, A. and Vinas, R. 1983. Influence of aeration rate on the growth yield in suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L) G Don. Journal of Fermentation Technology. 61: 429-433.
- Pearce, K.N. and Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 26: 716-723
- Raposo, S. and Lima-Costa, M.E. 2006. Rheology and shear stress of *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures grown in bioreactor. Biotechnology Letters (2006) 28: 431–438
- Randall, R.C., Phillips, G.O. and Williams P.A. 1989. Fractionation and characterization of gum from *Acacia Senegal*. Food Hydrocolloids. 3: 65-75
- Reid, S, Sims, I.M., Melton, L.D. and Gane, A.M. 1999. Characterisation of extracellular polysaccharides from suspension cultures of apple (*Malus domestica*). Carbohydrates Polymers. 39: 369-376.
- Rodríguez-Monroy, M. and Galindo, E. 1999. Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. Enzyme and Microbial Technology. 24: 687-693.
- Rodriguez-Monroy, M., Trejo-Espino, J.L., Jimenez-Aparicio, A., Morante, M.L., Villareal M.L. and Trejo-Tapia, G. 2004. Evaluation of morphological properties of *Solanum chrysotrichum* cell cultures in a shake flask and fermentor and rheological properties of broths. Food Technology and Biotechnology. 42(3): 153-158.

- Román-Guerrero, A., Orozco-Villafuerte, J., Pérez-Orozco, J.P., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R. and Vernon-Carter, E.J. 2009. Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil. *Food Hydrocolloids*. 23: 708-713.
- Ruíz-Ramos, J.O., Pérez-Orozco, J.P., Báez-González, J.G., Bóquez-Molina, E., Pérez-Alonso, C. and Vernon-Carter, E.J. 2006. Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum-chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers* 64: 355-363
- Rumyantseva, N. I. 2005. Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 70(10): 1301-1317
- Sánchez-Sampedro, M.A., Peláez, R. and Corchete. 2008. An arabinogalactan protein isolated from medium of cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaernt. *Carbohydrate Polymers*. 71: 634-639.
- Schlatmann, J.E., Moreno, P.R.H., Vinke, J.L., ten Hoopen, H.J.G., Verpoorte, R. and Heijnen, J.J. 1994. Effects of oxygen and nutrients limitation on ajmalicine production and related enzyme activities in high density cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 44: 461- 468.
- Scragg, A.H., Allan, E.J. and Leckie, F. 1988. Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme Microbiology Technology* 10: 361-367.
- Silva, K.A., Rocha-Leao, M.H. and Coelho, M.A.Z. 2010. Evaluation of agin mechanisms of olive oil-lemon juice emulsion through digital image analysis. *Journal of Food Engineering* 97: 335-340.

- Skrzypek, E., Kensuke, M., Saniewski, M. and Junichi, U. 2004. Jasmonates are essential factors inducing gummosis in tulips: mode of action of jasmonates focusing on sugar metabolism. *Journal of Plant Physiology*. 162: 495-505.
- Staden, J., Zazimalova, E. and George, E.F. 2008. Plant growth regulators II: Introduction; cytokinins, their analogues and antagonists In: Edwin F. George, Michael A. Hall y Geert-Jan De Klerk (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Volume 1. The Background*. The Netherlands: Springer, pp 205-226.
- Stella, A. and Braga, M.R. 2002. Callus and suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 68: 271-276.
- Sunnichan, V.G., Shivanna, K.R., Mohan and Ram, H.Y. 1998. Micropropagation of gum Karaya (*Sterculia urens*) by adventitious shoot formation and somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 17: 951-956.
- Trejo-Tapia, G., Jiménez-Aparicio, A., Villareal, L., Rodríguez-Monroy, M. 2001 Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. *Biotechnology Letters*. 23: 1943-1946.
- Trejo-Tapia, G. and Rodríguez-Monroy, M. 2007. Cellular aggregation in secondary metabolite production in *in vitro* plant cell cultures. *Interciencia* 32:669-674
- Van Holst, G.J., Clarke, A. 1985. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial diffusion gel. *Analytical Biochemistry*. 148:446-450.
- Vázquez-Ortíz, F.A., López-Franco, Y. and Goycoolea, F.M. 2006. Fractionation and characterization of the monosaccharides from mesquite *Prosopis* spp. and

- arabic gum by normal, bonded phase, HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Techniques*. 29: 1991-1999.
- Verbeken, D., Dierckx, S., Dewettinck, K. 2003. Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63:10-21
- Vernon-Carter, E.J, Beristain, C.I. and Pedroza-Islas, R. 2000. Mesquite gum (*Prosopis* gum). In: Doxastakis G & Hiosseoglu V (Eds.) *Novel macromolecules in food systems, developments in food science*. The Netherlands: Elsevier, pp 217-238.
- Vilela, A.E. and Raveta, D.A. 2001. The effect of seed scarification and soil-media on germination, growth, storage, and survival of seedlings of five species of *Prosopis* L. (Mimosaceae). *Journal of Arid Environments*. 40: 171-184.
- Vilela, A.E. and Ravetta, D.A. 2005. Gum exudation in South-American species of *Prosopis* L. (Mimosaceae). *Journal of Arid Environments*. 60: 389-385.
- Xu, J., Shpak, E., Gu, T., Moo-Young, M. and Kieliszewski, M. 2005. Production of recombinant plant gum with tobacco cell culture in bioreactor and gum characterization. *Biotechnology and Bioengineering*. 90: 578-588.
- Zhao, J. and Verpoorte, R. 2007. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. *Phytochemistry Reviews*. 6: 435-457.
- Zhong, J.J. 2001. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures, in: J.-J. Zhong (ed.), *Plant*

Cells. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, vol 72, Springer, Germany, pp 1-26.

<http://www.rlc.fao.org/redes/sisag/arboles/Mex-pr-l.htm>

Artículos científicos producto de la tesis:

Trejo-Espino J.L., M. Rodríguez-Monroy, E.J. Vernon-Carter, F. Cruz-Sosa. (2010). Emulsifying properties of the gum produced by *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst (Mesquite) cells suspension culture in bioreactor. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 9(3): 251-260.

Trejo-Espino J.L., M. Rodríguez-Monroy, E.J. Vernon-Carter, F. Cruz-Sosa. (2010). Establishment and characterization of *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst. cell suspension culture: A biotechnological approach for mesquite gum production. *Acta Physiologiae Plantarum* (En revision).



**EMULSIFYING PROPERTIES OF THE GUM PRODUCED BY
PROSOPIS LAEVIGATA (HUMB. & BONPL. EX WILLD) M.C. JOHNST
(MESQUITE) CELLS SUSPENSION CULTURE IN BIOREACTOR**

**PROPIEDADES EMULSIFICANTES DE LA GOMA PRODUCIDA POR
CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *PROSOPIS LAEVIGATA*
(HUMB. & BONPL. EX WILLD) M.C. JOHNST. (MEZQUITE) EN UN
BIORREACTOR**

J.L. Trejo-Espino^{1,2}, M. Rodríguez-Monroy^{2*}, E.J. Vernon-Carter³ and F. Cruz-Sosa¹

¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, CP 09340, México DF, México

²Departamento de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, PO Box 24, CP 62730, Yautepec, Morelos, México

³Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, CP 09340, México DF, México

Received 27 of October 2010; Accepted 29 of November 2010

Abstract

The mesquite gum (MG) production from *Prosopis laevigata* cells suspension culture in a stirred tank type bioreactor, with characteristics similar to those of MG obtained from wild trees are reported. The cells showed a specific growth rate (μ) of 0.08 1/d and a viability of over 60 %, reaching a maximum biomass of 16.6 g dry mass (dm)/L after 14 d. The cells produced a gum made up by 83.5% of carbohydrates (L-arabinose, D-galactose and glucuronic acid) and 8.1% of protein, also detected arabinogalactan-proteins (AGPs) as constituents of the gum. Oil-in-water emulsions were prepared using as continuous phase aqueous solutions of MG obtained from wild trees and that produced in bioreactor (MGb). The emulsifying capacity of MGb was slightly superior, but the emulsion stability lower, than that obtained with MG.

Keywords: *Prosopis laevigata*, mesquite gum, stirred tank type bioreactor, arabinogalactan-proteins, emulsifying properties.

Resumen

Se reporta la producción de goma de mezquite (GM) en un cultivo de células en suspensión de *Prosopis laevigata* a nivel de biorreactor, cuyas características son similares a la GM obtenida de árboles silvestres. Las células mostraron una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.08 1/d y una viabilidad superior al 60%, alcanzando una biomasa máxima de 16.6 g en masa seca (ms)/L a los 14 d. Las células produjeron una goma compuesta de 83.5% de carbohidratos (L-arabinosa, D-galactosa y ácido glucurónico) y 8.1% de proteína, además se detectó la presencia de arabinogalactano-proteínas (AGPs) como constituyentes de la goma. Se prepararon emulsiones aceite-en-agua utilizando como fase continua soluciones acuosas de goma obtenida de árboles silvestres (GM) y producida en el biorreactor (GMb). La capacidad emulsificante de GMb fue ligeramente mayor, pero la estabilidad de la emulsión menor, que las obtenidas con GM.

Palabras clave: *Prosopis laevigata*, goma de mezquite, biorreactor tipo tanque agitado, arabinogalactano-proteínas, propiedades emulsificantes.

* Corresponding author. E-mail: mrmonroy@ipn.mx

1 Introduction

Several studies have established that mesquite gum (MG), the exudate from *Prosopis laevigata*, possesses emulsifying and microencapsulating properties (Beristain and Vernon-Carter, 1995; Vernon-Carter *et al.*, 1996, 1998; Rodríguez-Huezo *et al.*, 2004), forms dense films upon drying that limit oxygen diffusion through its matrix (Báez-González *et al.*, 2004), and mechanical properties (Villagómez-Zavala *et al.*, 2008) comparable or superior to those of gum arabic (GA), the exudate from *Acacia senegal*, which is considered as a benchmark commodity worldwide (Dickinson, 2003). MG is exuded in response to different environmental stress conditions, wounds, pathogen infection, or attack by insects (Verbeken *et al.*, 2003). MG is a complex proteoglycan, of which 90% is made up by a glycosidic part characterized by a central backbone of β -(1-3)-D-galactose, which has attached side chains of (1-6) L-arabinose (in both, pyranose and furanose forms), L-rhamnose, β -D-glucuronic acid and 4-O-methyl- β -D-glucuronic acid. It also contains a protein fraction that varies between 0.7 and 5.8 % of the total molecule (Vernon-Carter *et al.*, 2000). The main aminoacids of the protein fraction are: hydroxyproline, proline y serine (Anderson *et al.*, 1985). Thus, the MG molecule is considered a type II (protein attached covalently to polysaccharide) arabinogalactan-protein (AGP) (López-Franco *et al.*, 2004). MG has been fractionized by hydrophobic affinity chromatography (Orozco-Villafuerte *et al.*, 2003; Román-Guerrero *et al.*, 2009). Mesquite gum was separated in three main fractions (F_1 , F_2 , and F_3), whose average molecular masses ranged from 1.81×10^{-4} to $5.23 \times \text{Da}$; F_1 had 90% polysaccharide and 1% protein contents, while F_2 had 16% and F_3 46% protein, respectively, using hydrophobic affinity chromatography (Román-Guerrero *et al.*, 2009). F_2 produced films at the oil-water interface with higher interfacial viscosity and higher instantaneous elastic modulus, and provided orange peel oil-in-water emulsions with lower coalescence rates than whole MG, and the latter than F_1 and F_3 . Thus, the fraction imparting best emulsion stability and interfacial rheological properties was that having a relatively high protein/high polysaccharide balance, and was also mainly responsible for the functionality of whole MG.

Guaranteeing the supply of natural products is hazardous, as periodic shortages occur due to complex geo-global environmental, sociological, and political factors. Thus, an ongoing research topic is how to obtain natural products through novel biotechnological approaches such as the use of plant cell and tissue culture (PCTC) techniques (Kieran *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 2000). The efforts in this sense regarding *P. laevigata* have been few. Orozco-Villafuerte *et al.* (2003) established a nodal explants culture from *P. laevigata* stems and found that it was possible to induce secretion of a gum-like substance using elicitation. Later it was demonstrated that the gum-like secretion produced *in vitro* had similar chemical composition than the gum exuded by wild *P. laevigata* trees, and that it could be considered as a true gum (Orozco-Villafuerte *et al.*, 2005). Production of AGPs from several vegetable cells tissue cultures in Erlenmeyer flasks has been successful (Günter and Ovodov, 2007; Sánchez-Sanpedro *et al.*, 2008; Capataz-Tafur *et al.*, 2010), but very few reports have been published about their production in bioreactors. AGPs production in bioreactor has been reported for *Beta vulgaris* (Rodríguez-Monroy and Galindo, 1999) and tobacco (Xu *et al.*, 2005) cells cultures, among others.

The objective of this work was to establish *Prosopis laevigata* cells suspension culture in bioreactor, to chemically characterize the gum production and the presence of arabinogalactan-proteins, and to evaluate the emulsifying properties of the gum produced in bioreactor in comparison the gum produced by *P. laevigata* wild trees.

2 Materials and methods

2.1 Plant cell culture

P. laevigata cell suspension culture was initiated from 4 weeks old friable callus obtained previously from hypocotyls segments of *P. laevigata* plantlets. 3-5 g of callus were transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Murashige and Skoog (MS) medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 3% (w/v) of sucrose, 5.0 μM of kinetin (KIN) and 5.0 μM of 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-T). The cultures were maintained at 25 ± 2 °C under cool white fluorescent light at irradiance of 200 μmol

$m^{-2} s^{-1}$ and 16 h light/8 h dark photoperiod cycle, on an orbital shaker at 110 rpm. When the biomass increased, the cells were sieved through 200 μm nylon mesh filters in order to obtain a homogeneous and fine cell suspension culture. The culture was then maintained during 6 months, by sub-culturing every 12-15 days, using a cell inoculum size of 10% (v/v) in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of MS medium.

2.2 Stirred tank bioreactor cultures

A 2-L stirred tank bioreactor (Applikon, Schiedam, Netherlands) with a glass vessel, two baffle plates, multiport stainless heat plate and six-bladed disk turbine impeller operating at 400 rpm was used. The stirred tank bioreactor with a working volume of 1L was inoculated with cells (10% w/v) from 10-day-old suspension cultures. The stirred tank bioreactor was aerated through stainless-steel tube with sparger holes. The airflow rate was set at 0.1 vvm and the pH was maintained at 5.8 ± 0.1 with 0.1N NaOH. The pH and dissolved oxygen tension were monitored online by specific electrodes connected to a biocontrol ADDI 1030 (Applikon, Schiedam, Netherlands). Every 3 days over a 21 days period, aliquots of 30 mL from 5 independent runs were harvested for analytical measurements. The oxygen transfer rate (OTR) and the oxygen uptake rate (OUR) were calculated according to the procedure described by Orozco-Sánchez (2009). First, the volumetric oxygen transfer coefficient (K_La) using the dynamic method (Doran, 1995) was determined and with the experimental data of dissolved oxygen (DO) and biomass, the following equations were applied:

$$OTR = K_La(C^* - C_L) \quad (1)$$

Where OTR is the oxygen transfer rate (Kg/m^3d), K_La is the volumetric oxygen transfer coefficient (1/d), C^* is the saturated DO concentration (Kg/m^3) ($\sim 0.008Kg/m^3$ at $25^\circ C$ and 1 atm) and C_L is the actual DO concentration in the liquid (Kg/m^3)

$$\frac{dCO_2}{dt} = OUR = Q_{O_2}X \quad (2)$$

Where dCO_2/dt is the change in O_2 over time, OUR is the oxygen uptake rate (Kg/m^3d), Q_{O_2} is the specific oxygen uptake rate by the cells (Kg

$O_2/(Kg(\text{viable biomass}) d)$ and X is the biomass (Kg/m^3). Viable biomass (vm) is the dry mass multiplied by the cell viability.

2.3 Biomass

The biomass was filtered using pre-weighed cellulose filters (Whatman No. 1) and determined by dry mass (dm) measurement, oven drying the filters at $70^\circ C$ for 24 h. Data from stirred tank bioreactor (5 runs) was used to calculate means and standard error (SE) of the means. The specific cell growth rate (μ) was calculated by plotting cell growth data in the form of natural logarithm versus time. The slope of the linear part of the plot corresponds to the specific cell growth rate (Capataz-Tafur *et al.*, 2010). The time required for biomass to double (doubling time, t_d) was computed from the μ experimental data.

2.4 Cells viability

The cells viability was determined using Evan's blue staining test (Rodríguez-Monroy and Galindo 1999). A 2 mL sample from stirred tank bioreactor was incubated into 0.25% Evan's blue stain for 5 min and then at least 700 cells were counted. The viability was calculated taking in count the non-staining cells (viable cells).

2.5 Mesquite gum (MG) and Gum from cell suspension culture (MGb) purification

Mesquite gum (MG) from *P. laevigata* wild trees, and the gum from stirred tank bioreactor (MGb) were purified according the procedure reported by Orozco-Villafuerte *et al.* (2003). First, the MG samples were dissolved in deionized water and solutions were filtered through nitrocellulose membranes with a pore size of $0.45 \mu m$. On the other hand, cells were separated from the culture broth by filtration (Whatman No. 1). Subsequently samples of MG and MGb, were dialyzed separately using cellulose membranes (Sigma) with a cutoff molecular weight of 12 KDa. Samples were finally concentrated by lyophilization and stored at $-20^\circ C$ for further characterization.

2.6 Total protein, total and neutral sugars composition

The Bradford (Bradford, 1976) and phenylsulphuric (Dubois *et al.*, 1956) methods were used for determining total protein and total sugars contents of MG and MGb. Neutral sugar composition was determined by HPLC. The samples were prepared according to Vázquez-Ortiz *et al.* (2006). Aliquots of 0.05 g of the MG and MGb were weighed out accurately into tare 15 mL stopped Pyrex test tubes and 4% (w/w) sulphuric acid was added. The tubes were placed in a water bath at 100 °C for 4 h and then reweighed and made up to the own weight by addition of distilled water. The solutions were neutralized by adding 2.0 g BaCO₃ and shaking overnight. The filtered hydrolyzates were analyzed by HPLC (Varian Pro Star) fitted with a refraction index detector and a sugar SC 1011 column, using water (HPLC grade) as a mobile phase at a flow rate of 0.25 mL/min and a temperature of 85 °C.

2.7 AGPs quantification

AGPs contents in MGb were measured using the methodology reported by Van Holst and Clark (1985). This method is based on the specific interaction and precipitation of AGPs by the β -glucosyl Yariv reagent. Agarose gel (AG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 1% (w/w) containing NaCl (0.15 M), NaNO₃ (0.02%) and 10 μ g/mL- β -glucosyl Yariv reagent was prepared and wells of uniform diameter (1.2 mm) were punched in the gel using a Pasteur pipet. A standard curve (0.15–0.6 g/L) was obtained by filling the gel wells with 1 μ L of AG sample with different concentrations. Defined red halos were formed around the test wells. There is a linear relationship between the concentration of AGPs and the area of the halo formed in the gel. Gels were incubated overnight at room temperature in a wet chamber and the standard curve was used to calculate the AGPs content of the MGb samples. The MG from trees was assayed only the qualitative presence of AGPs by determining if the red halo in the gel occurred or not.

2.8 Emulsifying properties

Oil-in-water emulsions were prepared by mixing

50 mg of a 1:1 blend of white mineral oil/orange oil into 5 mL of aqueous solutions of MG and MGb (100 mg/mL) respectively. Mixing was done with a VCX 130PB ultrasonic processor (Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA) during 5 min at 70% amplitude. The emulsification properties of MG and MGb were measured as emulsifying activity and emulsifying stability according to the method of Pearce and Kinsella (1978). Emulsifying activity usually refers to a single chemical species that promotes emulsion formation and short-term stabilization by interfacial action. Emulsifying stability refers to a single chemical component conferring long-term emulsion stability, possibly by an adsorption mechanism, but not necessarily so (Dickinson 2003). The optical density of the diluted emulsions (500x) were measured at 650 nm with a spectrophotometer (Spectronic Genesys 2) immediately after preparation (time (t) = 0h) for the emulsifying activity and after 24 h for the emulsifying stability.

2.9 Emulsions rate of coalescence

The Oil-in-water emulsions were observed at 100x magnification with an Eclipse 80i optical microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and filmed with a video camera (DC330 DAGE-MTI, Inc., Michigan IN, USA) coupled to the microscope and linked to a PC. The image processing of the micrographs was done using the free software image J 1.4 (National Institutes of Health, USA). Ten different images of each emulsion were analyzed providing 600-700 droplets for each data point. A micrometer was used for determining the mean number-length droplet size ($d_{1,0}$).

The emulsions droplet rate of coalescence (C) can be represented by the following equation (Ruiz-Ramos *et al.*, 2006):

$$N_t/N_o = e^{-Ct} \quad (3)$$

Where N_t is the number concentration of droplets a time = t , N_o is the number concentration of freshly formed droplets ($t = 0$), and C is the rate constant. The relationship between the emulsion droplet number, N , and the mean volume average droplet diameter ($d_{3,0}$) is given by:

$$N = 6\phi/\pi d_{3,0} \quad (4)$$

where ϕ is the volume fraction of disperse phase, and $d_{3,0} = (\sum n_i d_{1,0} / \sum n_i)^{1/3}$, where n_1 , n_2 , n_3 ,

..., n_i are the number of droplets with diameters $(d_{1,0})_1, (d_{1,0})_2, (d_{1,0})_3, \dots, (d_{1,0})_i$.

If the kinetic plots of $\ln(N_t/N_0)$ versus t for the emulsions give a straight line, then the slope is $-C$.

3 Results and discussion

3.1 Bioreactor culture

The kinetics of *P. laevigata* cells suspension culture in the bioreactor did not show a lag phase, but an exponential growth was observed between 1 and 14 days. The culture displayed a specific growth rate (μ) of 0.08 1/d, reaching a maximum biomass of 16.6 gdm/L after 14 d (Fig. 1a). Cells viability at the beginning of culture was 65%, and was maintained throughout growth kinetics above 60% up to 18 d, time taken by cells to completely consume the medium sucrose (Fig. 1b). The yield of biomass per consumed sucrose ($Y_{X/S}$) was 0.45 g dm/g consumed sucrose. These results compare favorably with those for *P. laevigata* cultures grown in Erlenmeyer flasks where maximum biomass obtained was 12 g dm/L after 16 d, with a 70% viability (Trejo-Espino et

al., 2009), but differ with those reported for other vegetable species such as *Taxus chinensis* (Pan et al., 2000) and *Centaura calcitrapa* (Raposo and Lima-Costa, 2006), where a significant decrease in the above mentioned parameters occurred when scaling up the culture from flasks to bioreactor. These authors attributed their scaling up results to the cells fragility when exposed to the hydrodynamic stress in the bioreactor. On the other hand, some authors have reported significant increases in dry mass yield and survivability of cells when scaling up from flasks to bioreactor such as that occurring for *Beta vulgaris* (Rodríguez-Monroy and Galindo 1999), *Azadirachta indica* (Prakash and Srivastava, 2007) and *Uncaria tomentosa* (Trejo-Tapia et al., 2007). Some authors have suggested that probably some vegetable cells are resistant to hydrodynamic stress conditions occurring in bioreactors, while others are not (Meijer et al., 1994; Zhao and Verpoorte, 2007).

P. laevigata cells suspension secreted AGPs into the bioreactor culture medium (Fig. 1a). This phenomenon has also been documented for cell cultures of *Rosa spp.* (Serpe et al., 1994) and *Malva sylvestris* (Classen and Blaschek, 2002). As cells growth continued, so did AGPs production, reaching a maximum of 64.5 mg/L after 18 d.

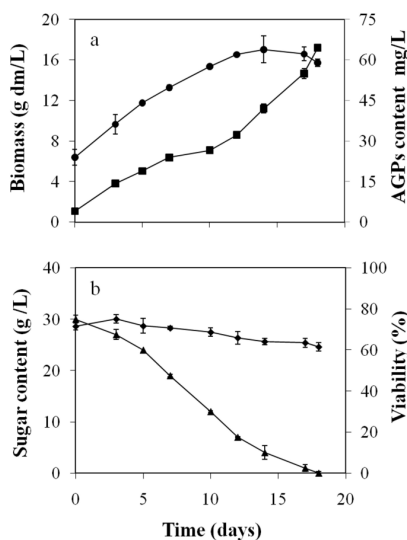


Fig. 1. Kinetics of cells growth and arabinogalactan-proteins (AGPs) secretion of the *P. laevigata* cells suspension culture in a 2-L bioreactor. (a) Biomass production (●); Extracellular AGPs content (■); and (b) Sugar content in the medium (▲); Cell viability (◆).

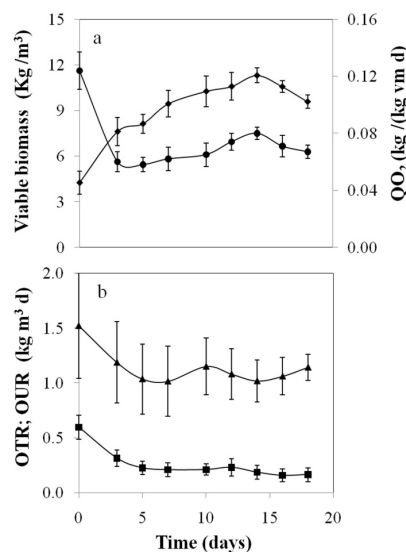


Fig. 2. Oxygen transfer and oxygen requirements by *P. laevigata* cells suspension in bioreactor: a) Viable biomass (vm) (◆) and specific oxygen consumption (Q_{O_2}) (●); b) Oxygen transfer rate (OTR) (▲) and oxygen uptake rate (OUR) (■).

Yield of produced AGPs per consumed sucrose ($Y_{AGPs/S}$) was of 5.43 mg AGPs/g sucrose. These results suggest that a direct relationship existed between cells growth and AGPs secretion, which has also been observed for other species cultured in flasks, such as *Arabidopsis thaliana* (Darjania et al., 2002) and *Beta vulgaris* (Capataz-Tafur et al., 2010). AGPs accumulation in culture medium may keep an analogy with what occurs in plant tissues, where AGPs are secreted to the apoplast and act as signaling molecules (Classen, 2007). Nevertheless, the definition of the biological function of AGPs in the growth and development of plants still requires more research (Ellis et al., 2010), and is beyond the scope of this study.

Dissolved oxygen tension was maintained above 30% saturation throughout culture time, due to the constant air flow of 0.1 vvm fed to the bioreactor (Fig. 2). At the beginning of the growth kinetics the cells showed a maximum QO_2 of 0.12 Kg O_2 /Kg vm d, indicative that the cells are consuming a great amount of oxygen in response to the hydrodynamic stress to which they were exposed when transferring the culture from flask to bioreactor. QO_2 diminished to a minimum of 0.055 Kg O_2 /Kg vm d after about 3 d of culture, and then tended to increase at a similar rate as viable biomass increased, up to about 14 d culture, followed by a drop of both parameters after 15 d culture. Similar behavior was observed for several cells cultures when transferred from flask to bioreactor, attributed to an adaptive mechanism of cells for overcoming the drastic change in environmental conditions (Zhong, 2001). OTR was always higher than OUR, confirming that oxygen supply to the bioreactor was adequate for cells growth. Schlattmann et al. (1994) reported that an adequate oxygen supply should fall between 29 and 43% of saturated air, and Pareilleus and Vinas (1983) reported that the critical concentration of dissolved oxygen should be 20% of saturated air, for achieving an adequate growth of *C. roseus* cells suspension culture in bioreactor.

The chemical compositions of mesquite gum obtained from *P. laevigata* wild trees (MG) and that produced in bioreactor (MGb) are presented in Table 1. AGPs presence was detected in both cases. Both gums presented similar carbohydrate content, but MGb had higher protein content than MG. Furthermore, the main carbohydrates

making up the gums were the same (L-arabinose, D-galactose, and glucuronic acid). However, the L-arabinose content in MGb (15.4 %) was considerably lower than in MG (62.2 %).

Table 1. Chemical comparison of MG from *P. laevigata* wild trees and produced in bioreactor (MGb).

	MG	MGb
AGPs	+	+
Total protein (%)	6.9 ± 0.28	8.1 ± 0.31
Total sugars (%)	86.2 ± 3.22	83.8 ± 2.7
Glucuronic acid (%)	11.8 ± 0.73	9.0 ± 0.67
D-Galactose (%)	22 ± 3.06	30.3 ± 2.69
L-Arabinose (%)	65.2 ± 2.06	15.4 ± 0.84
Rhamnose (%)	ND	ND

ND: Not detected by the method

+: Positive for Yariv's reagent; *: Obtained from growth kinetics after 20 days of culture

All percentages are expressed in dm basis

MG = mesquite gum from wild trees; MGb = mesquite gum produced in bioreactor; AGPs = arabinogalactan-proteins

± Standard error

3.2 Emulsifying properties

The emulsifying properties of GM and GMb were compared as they largely depend on chemical composition and molecular configuration (Xu et al., 2005). The emulsifying activity, measured as the absorbance of the emulsions immediately after formation was slightly higher for MGb than for MG, indicating that the surface activity of both gums was directly related to protein content (Table 2). However, the emulsion stability, estimated from the absorbance after 72 h of emulsion formation, was substantially higher for MG than for MGb. This result was confirmed by the higher droplet coalescence rate displayed by the emulsion stabilized with MGb compared to that stabilized by MG (Table 2). Once an emulsion of small droplets has been successfully prepared, considerations of surface activity or interfacial tension gradients are no longer relevant. What matters for long-terms stability it show well the molecular characteristics of the adsorbed biopolymer conform to the requirements of producing a robust molecular barrier at the interface. Droplets are prevented from aggregating or coalescing when strong steric

Table 2. Emulsifying properties of MG and MGb; Mean volume average droplet diameter ($d_{3,0}$) and coalescence rate (C).

Emulsifier	Absorbance t = 0 h	Absorbance t = 24 h	$d_{3,0}$ (μm) t = 0 h	$d_{3,0}$ (μm) t = 72 h	C (s^{-1})	R ²
MG	0.65 ± 0.032	0.48 ± 0.025	1.6 ± 0.09	2.1 ± 0.17	6.02 × 10 ⁻⁶	0.961
MGb	0.70 ± 0.047	0.31 ± 0.014	1.4 ± 0.11	3.6 ± 0.21	3.81 × 10 ⁻⁵	0.879

Absorbance at 650 nm

MG = mesquite gum from wild trees; MGb = mesquite gum produced in bioreactor

± Standard error

and electrostatic stabilization terms arise (Dickinson, 2003). From our results, it seems that although both gums had similar total carbohydrate content, the considerably higher amount of L-arabinose in MG, contributed to the formation of a thicker steric stabilizing layer formed around the oil droplets, and to increased emulsion stability.

Conclusions

In this work it was established that *P. laevigata* cells suspension culture in bioreactor operated under proper conditions was capable to produce a gum whose composition was chemically very close to that of the gum exuded by *P. laevigata* wild trees. Furthermore, the gum produced in bioreactor had an emulsifying activity slightly superior, but provided less long-term stability to oil-in-water emulsions than the gum from wild trees. This work provides the ground work for producing mesquite gum at an industrial level, contributing to encourage the use of this gum in diverse industrial applications, as for the moment the supply of this commodity cannot be ensured though wild tree production.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Instituto Politécnico Nacional (IPN) for the partial financing of this project through grant SIP 20100401. Author JLTE thanks, both IPN and el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the financing of his doctoral studies.

References

- Anderson, D.M., Howlett, J.F. and MacNab, C.G.A. (1985). The amino acid composition of gum exudates from *Prosopis* species. *Phytochemistry* 24, 2718-2720.
- Báez-González, J.G., Pérez-Alonso, C., Beristain, C.I., Vernon-Carter, E.J. and Vizcarra-Mendoza, M.G. (2004). Effective moisture diffusivity in biopolymer drops by regular regime theory. *Food Hydrocolloids* 18, 325-333.
- Beristain, C.I. and Vernon-Carter, E.J. (1995). Studies of the interactions of Arabic (*Acacia senegal*) and mesquite (*Prosopis juliflora*) gum as emulsion stabilizing agents for spray dried encapsulated orange peel oil. *Drying Technology* 13, 455-461.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Capataz-Tafur, J., Hernández-Sánchez, A., Rodríguez-Monroy, M., Trejo-Tapia, G. and Sepúlveda-Jiménez, G. (2010). Sucrose induces arabinogalactan protein secretion by *Beta vulgaris* L. cell suspension cultures. *Acta Physiologiae Plantarum* 32 (4), 757-764.
- Classen, B. and Blaschek, W. (2002). An arabinogalactan-protein from cell culture of *Malva sylvestris*. *Planta Medica* 68, 232-236.
- Classen, B. (2007). Characterization of an arabinogalactan-protein from suspension culture of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 88, 267-275.

- Darjania, L., Ichise, N., Ichikawa, S., Okamoto, T., Okuyama, H. and Thompson, G.A. (2002). Dynamic turnover of arabinogalactan proteins in cultured *Arabidopsis* cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 69-79.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* 17, 25-39.
- Doran, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, London.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Ellis, M., Ejelund, J., Shultz, C.J. and Bacic, A. (2010). Arabinogalactan-proteins (AGPs): Key regulators at the cell surface? *Plant Physiology* DOI: 10.1104/pp110.156000.
- Günter, E.A. and Ovodov, Y.S. (2007). Polysaccharides of cell cultures of *Silene vulgaris*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43, 84-90.
- Kieran, P., MacLoughlin, P. and Malone, D. (1997). Plant cell suspension cultures: Some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* 59, 39-52.
- López-Franco, Y., Valdez M.A., Hernández, J., Calderón de la Barca, A.M., Rinaudo, M. and Goycoolea, F.M. (2004). Macromolecular dimensions and mechanical properties of monolayer films of Sonorean mesquite gum and its fractions. *Macromolecular Bioscience* 4, 865-874.
- Meijer, J.J., Tenhoopen, H.J.G., Vangameren, Y.M., Luyben, K.C.A.M. and Libbenga, K.R. (1994). Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous-culture, *Enzyme and Microbial Technology* 16(6), 467-477.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15,473-497.
- Orozco-Sanchez, F. (2009). Efecto de la oferta de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de terpenoides con células de *Azadirachta indica* en un biorreactor. Ph.D. Thesis, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN, Yautepec, Mexico.
- Orozco-Villafuerte, J., Ponce-Alquira, E., Cruz-Sosa, F. and Vernon-Carter, E.J. (2003). Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydrate Polymers* 54, 327-333.
- Orozco-Villafuerte, J., Buendía-González, L., Cruz-Sosa, F. and Vernon-Carter, E.J. (2005). Increased mesquite gum formation in nodal explants cultures after treatment with microbial biomass preparation. *Plant Physiology and Biochemistry* 54,327-333.
- Pan, Z.W., Wang, H.Q. and Zhong, J.J. (2000). Scale-up on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxanediterpene. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 714-723.
- Pareilleus A. and Vinas R. (1983). Influence of aeration rate on the growth yield in suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L) G Don. *Journal of Fermentation Technology* 61, 429-433.
- Pearce, K.N. and Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 716-723.
- Prakash, G. and Srivastava, A.K. (2007). Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspension culture. *Process Biochemistry* 42, 93-97.
- Raposo, S. and Lima-Costa, M.E. (2006). Rheology and shear stress of *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures grown in bioreactor. *Biotechnology Letters* 28, 431-438.
- Rodríguez-Huezo, M.E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L.A., Beristain, C.I. and Vernon-Carter, E.J. (2004). Microencapsulation by spray-drying of

- multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science* 69, E351-E359.
- Rodríguez-Monroy, M. and Galindo, E. (1999). Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme and Microbial Technology* 24, 687-693.
- Román-Guerrero, A., Orozco-Villafuerte, J., Pérez-Orozco, J.P., Cruz-Sosa F., Jiménez-Alvarado, R. and Vernon-Carter, E.J. (2009). Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil. *Food Hydrocolloids* 23, 708-713.
- Ruíz-Ramos, J.O., Pérez-Orozco, J.P., Báez-González, J.G., Bóquez-Molina, E., Pérez-Alonso, C. and Vernon-Carter, E.J. (2006). Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum-chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers* 64, 355-363
- Sánchez-Sampedro, M.A., Peláez, R. and Corchete, P. (2008). An arabinogalactan protein isolated from medium of cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaernt. *Carbohydrate Polymers* 71, 634-639.
- Schlatmann J.E., Moreno P.R.H., Vinke J.L., ten Hoopen H.J.G., Verpoorte R. and Heijnen J.J. (1994). Effects of oxygen and nutrients limitation on ajmalicine production and related enzyme activities in high density cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 461- 468.
- Serpe, M.D. and Nothnagel, E.A. (1994). Effects of Yariv phenylglycosides on rosa cell-suspensions-evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193, 542-50
- Trejo-Espino, J.L., Rodríguez-Monroy, M. and Cruz-Sosa, F. (2009). Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Prosopis laevigata* (Mezquite) para la producción de goma. Presentation OII-12. June 21-26. Acapulco, Guerrero: *XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- Trejo-Tapia, G., Sepúlveda-Jiménez, G., Trejo-Espino, J.L., Cerda-García-Rojas, C.M., De la Torre, M. and Ramos-Valdivia A.C. (2007). Hydrodynamic stress induces monoterpenoid oxindole alkaloid accumulation by *Uncaria tomentosa* (Will) D.C. cell suspension cultures via oxidative burst. *Biotechnology and Bioengineering* 98, 230-238.
- Van Holst, G.J. and Clarke, A. (1985). Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial diffusion gel. *Analytical Biochemistry* 148, 446-450.
- Vázquez-Ortiz, F.A., López-Franco, Y. and Goycoolea, F.M. (2006). Fractionation and characterization of the monosaccharides from mesquite *Prosopis* spp. and arabic gum by normal, bonded phase, HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Techniques* 29, 1991-1999.
- Verbeken, D., Dierckx, S. and Dewettinck, K. (2003). Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 10-21.
- Vernon-Carter, E.J., Gomez, S.A., Beristain, C.I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R. y Moreno-Terrazas, R.C. (1996). Color degradation and coalescence kinetics of aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. *Journal of Texture Studies* 27, 625-641.
- Vernon-Carter, E.J., Pedroza-Islas, R. y Beristain, C.I. (1998). Stability of *Capsicum annuum* oleoresin-in-water emulsions containing *Prosopis* and *Acacia* gums. *Journal of Texture Studies* 29, 553-567.
- Vernon-Carter, E.J., Beristain, C.I. and Pedroza-Islas, R. (2000). Mesquite gum (*Prosopis* gum). In: *Novel Macromolecules in Food Systems*, (G. Doxastakis G and V. Hiosseoglu, eds.), Pp. 217-238. Elsevier, Amsterdam.

- J.L. Trejo-Espino. et al./ Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 9, No. 3 (2010) 251-260
- Villagómez-Zavala, D.L., Gómez-Corona, C., San Martín-Martínez, E., Pérez-Orozco, J.P., Vernon-Carter, E.J. and Pedroza-Islas, R. (2008). Comparative study of the mechanical properties of edible films made from single and blended hydrophilic biopolymer matrices. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7, 263-273.
- Xu, J, Shpak, E., Gu, T., Moo-Young, M. and Kieliszewski, M. (2005) Production of recombinant plant gum with tobacco cell culture in bioreactor and gum characterization. *Biotechnology and Bioengineering* 90, 578-588.
- Zhao, J. and Verpoorte, R. (2007). Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. *Phytochemistry Reviews* 6, 435-457.
- Zhong, J.J. (2001). Biochemical Engineering of the Production of plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures. In: *Plant Cells Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, (J.J. Zhong, Ed.), Pp. 1-26. Springer, Germany.

Establishment and characterization of *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst. cell suspension culture: a biotechnology approach for mesquite gum production

J. L. Trejo-Espino · M. Rodríguez-Monroy ·
E. J. Vernon-Carter · F. Cruz-Sosa

Received: 12 May 2010 / Revised: 29 November 2010 / Accepted: 30 December 2010
© Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków 2011

Abstract This study presents a protocol for the establishment of *Prosopis laevigata* cell suspension culture as a strategy to obtain an in vitro mesquite gum productive cell line. The callus used for this purpose was obtained with hypocotyls from 15-day-old plantlets, placed on Murashige–Skoog medium with two different plant growth regulators (PGRs), 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-T; 5.0 μM) and kinetin (KIN; 5.0 μM). With this PGRs treatment, after four subcultures (30 days each) an exuded gum-like substance was observed on the callus surface. The growth kinetics of the cell suspension culture showed a specific cell growth rate (μ) of 0.14 d^{-1} and doubling time (t_d) of 6.6 days, respectively. The gum-like substance from callus culture and the broth from cell suspension culture were subjected to chemical analysis and compared with the mesquite gum exuded from wild trees. Both, gum-like substance from callus culture and the broth from cell suspension culture showed the presence of Arabinogalactan-proteins, and their polysaccharide fraction presented the

same monosaccharides as those isolated from mesquite gum. In addition, the emulsifying properties of gum-like substance from callus culture and the broth from cell suspension culture were compared to those of mesquite gum and all three samples exhibited similar emulsifying capacity and emulsification stability.

Keywords Plant polysaccharides · Arabinogalactan-proteins · Emulsifying capacity · Mesquite

Introduction

Many plants exude gums in response to external stresses such as pathogen attack or wounding (Verbeke et al. 2003). One of these plants is *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) Johnston (Fabaceae) (mesquite), which produces an exudate known as mesquite gum. Mesquite gum is a natural polysaccharide whose chemical and functional properties are similar to those of Arabic gum (*Acacia senegal*), making it a possible substitute for Arabic gum (Goycoolea et al. 1995; Vernon-Carter et al. 2000; López-Franco et al. 2006) which is considered a benchmark as an emulsifying, microencapsulating, thickening, and stabilizing agent (Garti and Reichman 1993). Mesquite gum is mainly formed of L-arabinose, D-galactose, minor proportions of 4-O-methyl-D-glucuronate and L-rhamnose in a 2:4:1:1 ratio. It also contains a small protein fraction that varies from 2.0 to 4.8% (Vernon-Carter et al. 2000). Based on this chemical data, López-Franco et al. (2006) mentioned that the Arabinogalactan-proteins are important components of mesquite gum. Arabinogalactan-proteins are a family of extensively glycosylated hydroxyproline-rich glycoproteins that perform various important roles in

Communicated by B. Borkowska.

J. L. Trejo-Espino · F. Cruz-Sosa (✉)
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col.
Vicentina, CP 09340 México, DF, México
e-mail: cuhp@xanum.uam.mx

J. L. Trejo-Espino · M. Rodríguez-Monroy
Departamento de Biotecnología, Centro de Desarrollo de
Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, PO Box
24, CP 62730 Yauatepec, Morelos, México

E. J. Vernon-Carter
Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
CP 09340 México, DF, México

plant growth and development (Showalter 2001; Hernández-Sánchez et al. 2009) and are the responsible for the emulsifying activity of Arabic gum (Yadav et al. 2006).

Research works about in vitro mesquite gum production are scarce. Orozco-Villafuerte et al. (2003, 2005) showed the feasibility of in vitro mesquite gum production using stem segments of *P. laevigata* and demonstrated that the gum synthesis is stimulated by biotic (suspensions of dry bacterium cells) and abiotic (mechanical wounding and temperature) stress. In addition, they proved that the physicochemical characteristics of in vitro mesquite gum were very close to those of the gum produced by the wild trees. At this point, it is necessary to highlight that stems segments are differentiated tissues, and this fact is considered as a major hindering factor for the scale up production, and, eventually, for large scale production processes of mesquite gum. Cell suspension culture has been proposed as a biotechnological alternative to develop biological compounds production systems (Zhao et al. 2005). Because, Arabinogalactan-proteins are predominantly secreted into cell wall space, these macromolecules can be found in the suspension cell medium (Hernández-Sánchez et al. 2009; Capataz-Tafur et al. 2010) and furthermore, be responsible for the emulsifying activity observed in this type of glycoproteins (Xu et al. 2005).

The aim of this study was to establish *P. laevigata* cell suspension culture and to evaluate its capability to produce mesquite gum.

Materials and methods

Plant material

The seeds and mesquite gum used in this work were collected from 6 to 15-year-old trees of *P. laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd. M.C. Johnst.), located around the village of Ejido Llanos de la Angostura in the Mexican State of San Luis Potosí. The seeds were scarified mechanically as described by Buendía-González et al. (2007). The scarified seeds were washed in 5% (w/v) commercial detergent for 5 min, surface sterilized with 50% (v/v) ethanol for 5 min, and put into a 10% (w/v) sodium hypochlorite (solution < 5% active Cl) for 5 min. After each step, the seeds were rinsed (5 min per rinse) in autoclaved distilled water. The seeds were then germinated in culture tubes containing Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog 1962) with 3% (w/v) of sucrose and solidified with phytagel 0.2% (w/v). The pH of the medium was adjusted to 5.8 prior to sterilization and the germination conditions were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under cool white fluorescent light at irradiance of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 16 h light/8 h dark photoperiod.

Callus induction

Callus was induced from hypocotyl, cotyledon and leaf segments of *P. laevigata* seedlings; two explants (1.5 cm length explants sections) were transferred to each culture flask (8 per treatment, 2 replicates). Twelve treatments were assayed: (1) (Control) without PGRs; and with different PGRs as follows: (2) kinetin (KIN); (3) 6-benzylaminopurine (BAP); (4) 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D); (5) 2,4-D + KIN; (6) 2,4-D + BAP; (7) α -Naphthalene acetic acid (NAA); (8) NAA + KIN; (9) NAA + BAP; (10) 2,4,5-Trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-T); (11) 2,4,5-T + KIN; and (12) 2,4,5-T + BAP, each at concentrations of 0.5, 5.0, and $10 \mu\text{M L}^{-1}$ MS medium. Experiments were performed under the same conditions as those used for seed germination for 30 days. The callus induction was expressed as a percentage of the total explants (16) used per PGRs treatment. Afterwards, the successfully induced callus was separated from the explants and transferred to the corresponding fresh medium, allowed to develop for 4 weeks, and then was sub-cultured every 30 days.

The data were statistically analyzed with multifactorial ANOVA and Duncan's range test (both of them $p = 0.05$) using the software Statgraphics Plus Ver. 4.1 for Windows (Statistical Graphics Corp., USA).

Establishment of cell suspension culture and growth kinetics

P. laevigata cell suspension culture was initiated from 4-week-old friable callus, obtained from hypocotyl in the 2,4,5-T $5.0 \mu\text{M}$ + KIN $5.0 \mu\text{M}$ treatment, by transferring 3–5 g to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of callus induction medium (without phytagel) and incubated under the same conditions on an orbital shaker at 110 rpm. After subculturing every 15 days for 3 months, the cells were sieved through $200 \mu\text{m}$ nylon mesh filters in order to obtain a homogeneous and fine cell suspension culture. Then, the culture was maintained during 6 months by subculturing every 12–15 days using a cell inoculum size of 10% (v/v) in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of cultured medium. To determine the growth kinetics, 5 g of fresh cells harvested after 10 days were inoculated into 150 mL Erlenmeyer flasks containing 30 mL of liquid (MS) medium with 3% (w/v) of sucrose, 2,4,5-T $5.0 \mu\text{M}$ + KIN $5.0 \mu\text{M}$. Aliquots of 5 mL were obtained every 2–3 days over a 21 days period from culture flasks and used to determine cell growth, cell morphology, cell viability, and Arabinogalactan-proteins content. Experiments were done in duplicate with three replicates each ($n = 6$), and the results were used for calculating the means and standard error (SE) of the means.

The biomass was filtered using pre-weighed cellulose filters (Whatman No. 1) and determined by dry mass (DM) measurement, oven drying the filters at 70°C for 24 h. The specific cell growth rate (μ), defined as the increase in cell mass per unit time, was calculated by plotting the cell growth data in the form of natural logarithm versus time. This yields a straight line over the exponential phase growth. The slope of the linear part of the plot corresponds to specific cell growth rate and is given in 1 per units of time (Capataz-Tafur et al. 2010). The time required for biomass to double (doubling time, t_d) was computed from the μ experimental data.

Morphology of *P. laevigata* cell suspension culture

Photographic images of cells were done in order to characterize the morphology of the aggregate cell suspension cultures and for calculating the Elliptical Form Factor (EFF) of the cell aggregates. The images were obtained using an Eclipse 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with a charge-coupled video-camera (DC330 DADGE-MTI, Inc., Michigan, IN, USA). Magnification of the images was 4 \times . Basic image processing was used to count aggregates (~ 700) for measuring mean \pm SE of size, length, breadth, and EFF. The latter was calculated as the length/breadth ratio, where an EFF of 1 represents a round aggregate and whereas an EFF higher than 1 indicates an elongated aggregate. The software Meta Imaging Series for Microsoft Windows (version 4.0, Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA) was used.

Cells viability

The cells viability was determined by the Evan's blue staining test (Rodríguez-Monroy and Galindo 1999). Two mL sample from each flask was incubated into 0.25% Evan's blue stain for 5 min and then at least 700 cells were counted; this was repeated twice ($n = 6$). The viability was calculated taking in count the non-staining cells (viable cells).

Gum purification

Exuded mesquite gum samples were obtained from different *P. laevigata* wild trees. The gum was pooled together until ca. 1 kg was collected. Around 10 g of gum-like substance produced after the fourth callus subculture, were collected from the surface of the calluses with the help of a Pasteur pipette. All the samples were dissolved in 200 mL of deionized water, filtered through nitrocellulose membrane (0.45 μ M), separated by dialysis against running tap deionized water for 48 h (molecular weight cut-off 12 kDa), and freeze-dried (Orozco-Villafuerte et al. 2003).

Cell suspension culture broth

The cell suspension culture broth (75 mL) for each point of the growth kinetics curve of *P. laevigata* was used to recover the extracellular compounds. Cell-free medium was centrifuged at 10,000g during 15 min. The supernatant was separated by dialysis against running tap deionized water for 48 h (molecular weight cut-off 12 kDa) and freeze-dried. Arabinogalactan-proteins content was done by analyzing by separate each cell suspension culture broth. Total protein, total and neutral sugars composition, and emulsifying properties analyses were done on the pooled samples.

Analytical methods

Total protein, total and neutral sugars composition

The Bradford (Bradford 1976) and phenyl-sulfuric (Dubois et al. 1956) methods were used for determining total protein and total sugars contents of the mesquite gum, gum-like substance from callus culture, and cell suspension culture broth. Neutral sugar composition was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The samples were prepared according to Vázquez-Ortiz et al. (2006). Aliquots of 0.05 g of mesquite gum, gum-like substance from callus culture, and lyophilized cell suspension culture broth were weighed out accurately into tare 15 mL stopped Pyrex test tubes, 4% (w/w) sulfuric acid was added to each tube. The tubes were placed in a water bath at 100°C for 4 h and then reweighed and made up to the own weight by addition of distilled water. The solutions were neutralized by adding 2.0 g BaCO₃ and shaking overnight. The filtered hydrolyzes were analyzed by the HPLC system (Varian Pro Star) fitted with a refraction index detector and a sugar SC 1011 column, using water (HPLC grade) as a mobile phase at a flow rate of 0.25 mL min⁻¹ and a temperature of 85°C.

Arabinogalactan-proteins determination

The lyophilized cell suspension culture broth was assayed with the β -glucosyl Yariv reagent to quantify Arabinogalactan-proteins using the methodology reported by Van Holst and Clarke (1985). This method is based on the specific interaction and precipitation of Arabinogalactan-proteins by the β -glucosyl Yariv reagent. Agarose gel (1% w/w) containing NaCl (0.15 M), NaN₃ (0.02%) and 10 μ g mL⁻¹ β -glucosyl Yariv reagent was prepared and wells of uniform diameter (1.2 mm) were punched in the gel using a Pasteur pipet. A standard curve (0.15–0.6 g L⁻¹) using Arabic gum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as standard was obtained by filling

the gel wells with 1 μL of Arabic gum sample with different concentrations. Defined red halos were formed around the test wells; there is a linear relationship between the concentration of Arabinogalactan-proteins and the area of the precipitated, measured by the square of the outer diameter of the halo formed in the gel. Gels were incubated overnight at room temperature in a wet chamber to avoid drying of the gel and the standard curve was used to calculate the Arabinogalactan-proteins content of the cell suspension culture broth samples. The mesquite gum from trees and gum-like substance from callus culture samples were assayed only for their qualitative (Presence of the red halo in the gel) Arabinogalactan-proteins determination.

Emulsifying properties

Oil-in-water emulsions were prepared by mixing 50 mg of a blend of white mineral oil/orange oil (50% w/w) into 5 mL of aqueous solutions of mesquite gum, gum-like substance from callus culture, and cell suspension culture broth solutions (100 mg mL^{-1}), respectively. Mixing was done with a VCX 130 PB ultrasonic processor (Sonics and materials inc., Newtown, CT, USA) during 5 min at 70% amplitude. The emulsification properties of mesquite gum, gum-like substance from callus culture, and cell suspension culture broth were measured as emulsifying activity and emulsifying stability according to the method of Pearce and Kinsella (1978). Emulsifying activity usually refers to a single chemical species that promotes emulsion formation and short-term stabilization by interfacial action. Emulsifying stability refers to a single chemical component conferring long-term emulsion stability, possibly by an adsorption mechanism, but not necessarily so (Dickinson 2003). The optical density of the diluted emulsions (500 \times) was measured at 650 nm with a spectrophotometer (Spectronic Genesys 2) immediately after preparation (time (t) = 0 h) for the emulsifying activity and after 24 h for the emulsifying stability.

Results and discussion

Callus induction

All seeds germinated between 5 and 7 days after sown, the plantlets were maintained in a culture chamber for 15 days and then used in the induction callus experiments (Fig. 1a). After 8 days, green or light green callus were observed from some PGRs treatments only (Fig. 1b). According to the statistical analysis, the callus induction was affected by the different PGRs treatments at the 95% confidence level. The auxin 2,4,5-T was markedly the main component in the PGRs treatments that promoted callus induction,

reaching the highest percentage (100%) with 2,4,5-T 5.0 μM + KIN 5.0 μM and 2,4,5-T 5.0 μM + BAP 5.0 μM (Table 1). Also the PGRs concentration had a significant effect on callus induction, with concentrations of 0.5 and 10 μM only a few treatments had a positive effect, while with 5.0 μM the callus induction was observed in most of the treatments (Table 1). Some works report attempts to induce callus formation in related species using individual cytokinins and auxins, e.g. NAA or BAP alone failed to induce callus formation in *P. juliflora* (Nandwani and Ramawat, 1991) and *P. tamarugo* (Nandwani and Ramawat, 1992), in both cases being necessary to use a combination of these PGRs to obtain callus.

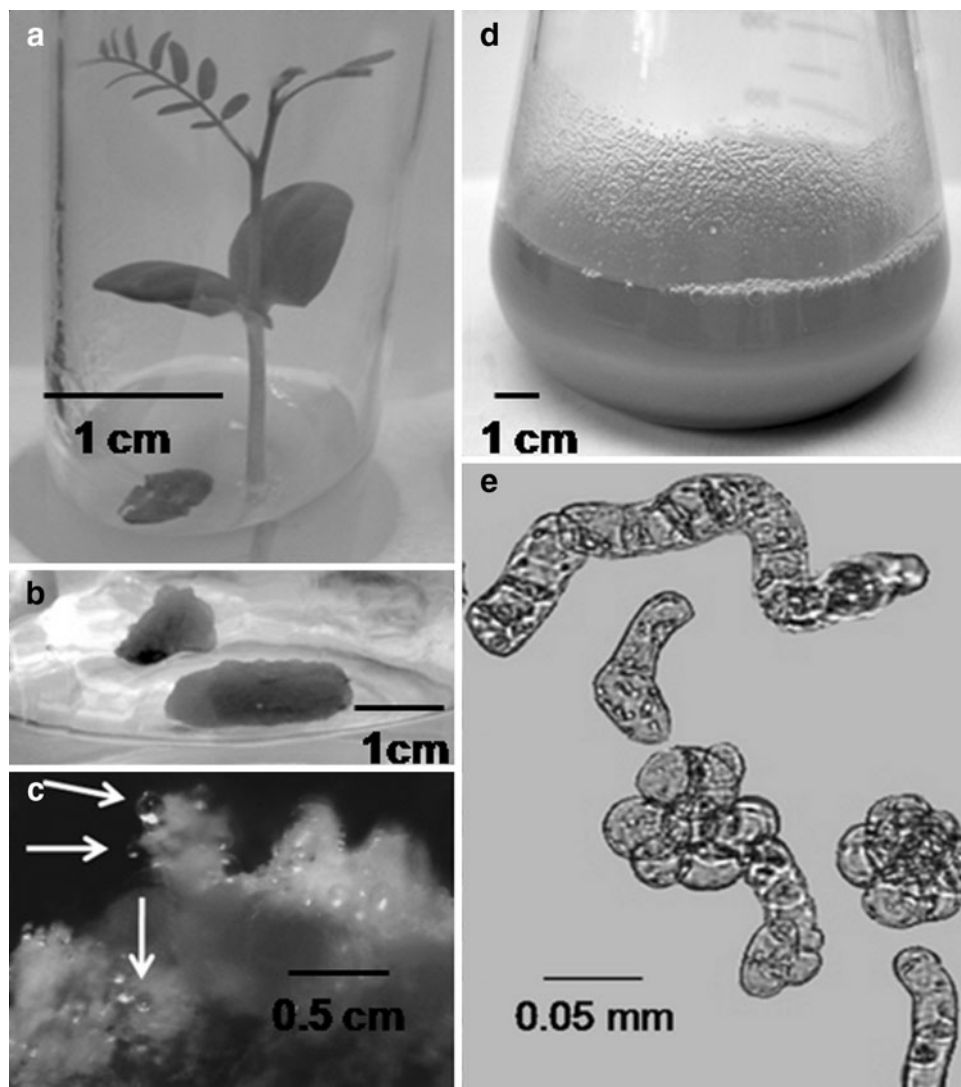
Callus induction was significantly affected by the type of explants (cotyledon, hypocotyl or leaf) used, the hypocotyl was the best source of explant (Table 1). And the callus biomass was initiated 1 week after start of the treatment. This is in agreement with the findings of Nandwani and Ramawat (1991, 1992) who reported the hypocotyl as explant source for callus induction from *P. tamarugo* and *P. juliflora*.

Thus, the 2,4,5-T + KIN or BAP treatments at a concentration of 5.0 μM each were the most efficient to induce *P. laevigata* callus (100%) when using hypocotyl as explant source. Nevertheless, in the 2,4,5-T + KIN treatment more friable callus was obtained. This callus line was the only one capable of producing a gum-like substance after four subcultures (Fig. 1c). Based on these results, we decided to use the callus obtained with the 2,4,5-T 5.0 μM + KIN 5.0 μM treatment, in order to establish the *P. laevigata* cell suspension culture. Greenwood and Morey (1979) reported that they used 2,4,5-T to induce phloem gum pockets and gum production in *P. glandulosa* wild trees.

Cell suspension culture establishment and growth kinetics

P. laevigata cell suspension culture was established (Fig. 1d). The growth curve of *P. laevigata* cell suspension culture is shown in Fig. 2. The lag phase lasted 4 days during which the biomass reached only 3.5 g DM L^{-1} , subsequently, the cells entered their exponential growth phase, which lasted 16 days, during this time, the maximum accumulated biomass was 11.9 g DM L^{-1} . The calculated t_d for the cell suspension culture was 6.6 days and their μ was 0.104 days^{-1} . A similar behavior was previously reported in the establishment of other cell suspension cultures (Azevedo et al. 2008; Estrada-Zuñiga et al. 2009). On the other hand, the cell viability remained around 70% throughout the 21 days of culture. When cell viability is lower than 50%, it is considered that suspension culture establishment has failed (Qui et al. 2009). This result

Fig. 1 Establishment of *Prosopis laevigata* cell suspension culture. **a** 15 days old plantlet; **b** callus from hypocotyls; **c** exuded gum-like substance from callus culture; **d** *Prosopis laevigata* cell suspension culture; **e** photomicrography of *Prosopis laevigata* cell suspension culture (10 \times)



confirms that the *P. laevigata* cell suspension culture was successfully established.

Cell suspension culture morphology

The results obtained from the morphological analysis are presented in Table 2. The aggregates of *P. laevigata* (Fig. 1e) had a more or less constant size (ca. to 0.07 mm²) during the first 4 days of culture (lag phase). During this growth phase, the biomass values were the lowest, but increased to values around 0.1 mm² with increase of biomass at the end of the culture. These phenomena probably are related with the cohesion properties that the cell wall presents during the cell division in plant cell culture (Trejo-Tapia and Rodríguez-Monroy 2007). In contrast, the EFF values were around 4.0 at the beginning of the culture and decreased to values of 2.5 with the increase of biomass at the end of the culture. These results indicated that the aggregates changed their shape from elongated to round

during the culture time, and this fact has important implications on the establishment of *P. laevigata* cell suspension culture when scaling up to bioreactor level. To this respect, Curtis and Emery (1993) and Trejo-Tapia et al. (2001) reported that the morphology of different plant cell suspension culture affected the rheology of plant cell broths during bioreactor culture. This parameter is also important in determining bioreactor power requirements and mass transfer characteristics (Rodríguez-Monroy and Galindo 1999).

Extracellular compounds and emulsifying properties

The *P. laevigata* cell suspension culture secreted Arabinoxylans in the broth during their growth as confirmed by assay with β -glucosyl Yariv reagent. Other species of cell suspension culture such as *Malus domestica* (Reid et al. 1999), *Daucus carota* (Immerzeel et al. 2004), *Silene vulgaris* (Günter and Ovodov 2007) and *Beta*

Table 1 Effect of different plant growth regulators (PGRs) treatments and explants sources on *Prosopis laevigata* callus induction percent

PGRs (μM)	% of explants forming callus								
	0.5			5.0			10		
	Hyp	Cot	Leaf	Hyp	Cot	Leaf	Hyp	Cot	Leaf
PGRs treatments									
Control	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
KIN	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	31.2 ^{ef}	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
BAP	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	31.2 ^{ef}	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
2,4-D	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	68.7 ^j	18.7 ^{cd}	43.7 ^{fg}	62.5 ⁱ	18.7 ^{cd}	0.0 ^a
2,4-D + KIN	0.0 ^a	18.7 ^{cd}	0.0 ^a	18.7 ^{cd}	0.0 ^a	25.0 ^{de}	18.7 ^{cd}	25.0 ^{de}	0.0 ^a
2,4-D + BAP	0.0 ^a	12.5 ^{bc}	0.0 ^a	75.0 ^k	0.0 ^a	0.0 ^a	31.2 ^{ef}	18.7 ^{cd}	0.0 ^a
NAA	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	62.5 ⁱ	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
NAA + KIN	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	62.5 ⁱ	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
NAA + BAP	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	25.0 ^{de}	0.0 ^a	31.2 ^{ef}	18.7 ^{cd}	31.2 ^{ef}	0.0 ^a
2,4,5-T	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	87.5 ^l	50.0 ^{gh}	43.7 ^{fg}	50.0 ^{gh}	31.2 ^{ef}	0.0 ^a
2,4,5-T + KIN	12.5 ^{bc}	6.2 ^{ab}	0.0 ^a	100 ^m	50.0 ^{gh}	75.0 ^k	50.0 ^{gh}	37.5 ^{ef}	0.0 ^a
2,4,5-T + BAP	18.7 ^{cd}	6.2 ^{ab}	0.0 ^a	100 ^m	87.5 ^l	93.7 ^{lm}	37.5 ^{ef}	25.0 ^{de}	0.0 ^a

Each value is the mean of two replicates. Each value sharing the same letter was non-significantly different

Duncan's range test ($p = 0.05$)

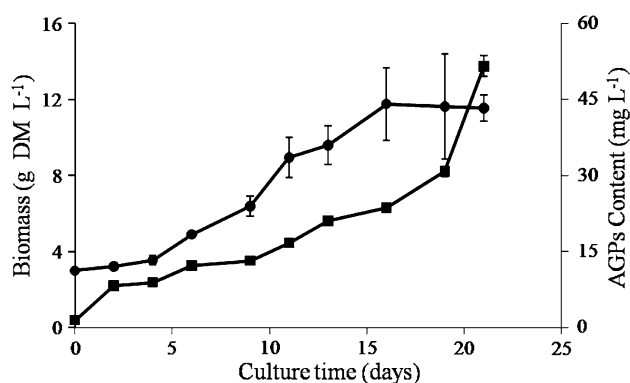


Fig. 2 Time course of cell growth and Arabinogalactan-Proteins content of *Prosopis laevigata* cell suspension culture. (filled circle) Biomass; (filled square) Extracellular Arabinogalactan-Proteins content. Error bars represent the standard error of the mean of measurements from six independent measurements

vulgaris (Capataz-Tafur et al. 2010) are known to produce Arabinogalactan-proteins. According to Classen (2007), this phenomenon may occur because cell suspension culture cell walls do not have a full barrier function. During the cell growth kinetics, the content of Arabinogalactan-proteins in the cell suspension culture broth increased (Fig. 2), reaching a maximum of 51.5 mg L⁻¹ after 21 days of culture, suggesting that a link may exist between cell growth and Arabinogalactan-proteins secretion. Similar results were reported for *Arabidopsis thaliana* (Darjania et al. 2002) and *B. vulgaris* (Capataz-Tafur et al. 2010). Arabinogalactan-proteins secretions were found in the samples of mesquite gum from wild trees and gum-like substance from callus culture.

Table 2 Aggregates size (area mm²) and shape (Elliptical Form Factor) of *Prosopis laevigata* cell suspension culture with culture time

Culture time (days) ^a	Aggregates mean area \pm SE (mm ²)	Elliptical form factor
0	0.0724 \pm 0.013	4.08
2	0.0693 \pm 0.027	3.86
4	0.0745 \pm 0.039	3.74
6	0.0823 \pm 0.033	3.62
9	0.0832 \pm 0.024	3.14
11	0.0856 \pm 0.036	3.28
13	0.0861 \pm 0.042	2.96
16	0.0954 \pm 0.029	2.74
19	0.1067 \pm 0.035	2.58
21	0.0974 \pm 0.042	2.60

^a Sampling was done the same days when cell samples for growth kinetics were taken

On the other hand, comparison of the analytical data of the *P. laevigata* cell suspension culture broth with gum-like substance from callus culture and mesquite gum collected from wild trees, and that reported in references are shown in the Table 3. All samples were formed basically by carbohydrate (70–90%) and protein (2–12%) residues. The polysaccharide fractions from gum-like substance from callus culture and cell suspension culture broth contained the same monosaccharides making up MG, and those reported in references for gum samples from *P. vetulina* (López-Franco et al. 2008) and *P. laevigata* (Orozco-Villafuerte et al. 2005). The mesquite gum, gum-like

Table 3 Chemical comparison of Mesquite gum, exuded gum-like substance from callus culture (CG) and *Prosopis laevigata* cell suspension culture (CSC) broth

Contents	<i>P. vetulina</i> ^a (mesquite gum)	<i>P. laevigata</i> ^b (mesquite gum)	<i>P. laevigata</i> ^c (mesquite gum)	CG	CSC broth ^d
Total protein (%)	3.73	2.7	6.9	1.9	11.7
AGPs	ND	ND	+	+	+
Total sugars (%)	96.27	87.3	86.2	75.5	69.8
Glucuronic acid (%)	ND	16.2	11.8	8.37	11.2
Galactose (%)	26.57	43.3	22	24.3	28.1
Arabinose (%)	73.19	40.4	65.2	67.2	17.8
Rhamnose (%)	–	1.3	ND	ND	ND

All percentages are expressed in DM basis

ND not determined, + positive for Yariv's reagent

^a López-Franco et al. (2008)

^b Orozco-Villafuerte et al. (2005)

^c This work

^d Obtained from pooled samples obtained during 21 days sampling

substance from callus culture, and cell suspension culture broth samples showed remarkably close sugar profile contents for glucuronic acid, galactose and arabinose, with the exception of cell suspension culture broth that showed a substantially lower arabinose content than mesquite gum and gum-like substance from callus culture. On the other hand, protein content was dissimilar in the three samples being higher for cell suspension culture broth (11.7%), followed by mesquite gum (6.9%) and gum-like substance from callus culture (1.9%), respectively.

Based on the chemical similarity of the components (Table 3) making up gum-like substance from callus culture, cell suspension culture broth and mesquite gum, we hypothesized that purified gum-like substance from callus culture and cell suspension culture broth probably possessed the emulsifying properties characteristic of mesquite gum obtained from *P. laevigata* wild trees. The three emulsions displayed non-significant differences in their absorbance at time = 0 h indicating that all possessed an equivalent emulsifying activity (Fig. 3), which on turn means that the three compounds contain an adequate protein content that provides them with good surface active capability (Table 3). On the other hand, the three emulsions exhibited a significant decrease in their absorbance at time = 24 h compared to their absorbance at time = 0 h (Fig. 3), indicative that the number of oil droplets per emulsion unit volume decreased (i.e., emulsion oil droplets coalesced). However, the degree of oil droplet coalescence was significantly lower for the emulsion containing mesquite gum than those containing gum-like substance from callus culture and cell suspension culture broth, which showed non-significant differences in their absorbance. Román-Guerrero et al. (2009) reported that whole mesquite

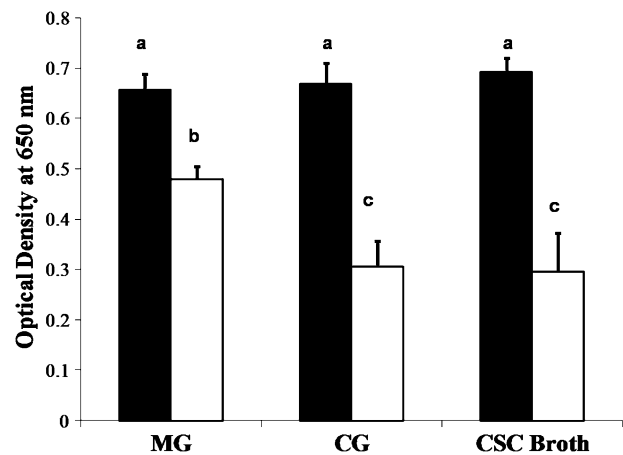


Fig. 3 Determination of the optical density of the emulsions as a measure for establishing the emulsifying properties of mesquite gum; exuded gum-like substance from callus culture and cell suspension culture broth. (filled square) Emulsifying activity was determined immediately after the emulsion was formed; (open square) Emulsifying stability was determined 24 h after the emulsion was formed. Error bars represent the standard error of the mean of three measurements. Means with the same letter were non-significantly different at $p \leq 0.05$

gum exhibited good emulsifying properties because it possessed an adequate protein/polysaccharide balance. The protein fraction allowed for good surface activity and strong adsorption of the gum at the oil–water interface, whereas the polysaccharide fraction projected into the aqueous phase provided strong repulsion steric forces that hindered emulsion droplets aggregation. These authors fractionated the mesquite gum in three fractions. Only that fraction having a protein/polysaccharide balance similar to that of the whole mesquite gum exhibited good emulsifying

activity and emulsifying stability. Thus, it is reasonable to assume that mesquite gum possesses a more adequate protein/polysaccharide balance than the gum-like substance from callus culture and the cell suspension culture broth.

In conclusion, in this work a protocol for establishing a *P. laevigata* cell suspension culture was achieved. The cells secreted extracellular compounds (Arabinogalactan-protein and polysaccharides) into the cell suspension culture broth, and possessed emulsifying properties comparable to those of mesquite gum.

Acknowledgments This work was financed by grant SIP 20100401 from IPN. Trejo-Espino JL is indebted to Instituto Politécnico Nacional (IPN) and CONACYT for the doctoral fellowship awarded.

References

- Azevedo H, Dias A, Tavares RM (2008) Establishment and characterization of *Pinus pinaster* suspension cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 93:115–121
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Buendía-González L, Orozco-Villafuerte J, Cruz-Sosa F, Chávez-Avila VM, Vernon-Carter EJ (2007) Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd M.C. Johnston). I. via cotyledonary nodes. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 43:260–266
- Capataz-Tafur J, Hernández-Sánchez A, Rodríguez-Monroy M, Trejo-Tapia G, Sepúlveda-Jiménez G (2010) Sucrose induces arabinogalactan protein secretion by *Beta vulgaris* L. cell suspension cultures. *Acta Physiol Plant* 32:757–764
- Classen B (2007) Characterization of an arabinogalactan-protein from suspension culture of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 88:267–275
- Curtis W, Emery A (1993) Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnol Bioeng* 42:520–526
- Darjania L, Ichise N, Ichikawa S, Okamoto T, Okuyama H, Thompson GA (2002) Dynamic turnover of arabinogalactan proteins in cultured *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol Biochem* 40:69–79
- Dickinson E (2003) Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocoll* 17:25–39
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356
- Estrada-Zuñiga ME, Cruz-Sosa F, Rodríguez-Monroy M, Verde-Calvo JR, Vernon-Carter EJ (2009) Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 97:39–47
- Garti N, Reichman D (1993) Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Microstruct* 12:411–426
- Goycoolea FM, Morris ER, Richardson RK, Bell AE (1995) Solution rheology of mesquite gum in comparison with arabic gum. *Carbohydr Polym* 27:37–45
- Greenwood C, Morey P (1979) Gummosis in honey mesquite. *Bot Gaz* 140:32–38
- Günter EA, Ovodov YS (2007) Polysaccharides of cell cultures of *Silene vulgaris*. *Appl Biochem Microbiol* 43:84–90
- Hernández-Sánchez AM, Capataz-Tafur J, Rodríguez-Monroy M, Sepúlveda-Jiménez G (2009) Arabinogalactan proteins in plant cell cultures. *Interciencia* 34:170–176
- Immerzeel P, Schols HA, Voragen AGJ, de Vries SC (2004) Different arabinogalactan proteins are present in carrot (*Daucus carota*) cell culture medium and in seeds. *Physiol Plant* 122:181–189
- López-Franco Y, Goycoolea FM, Valdez MA, Calderon de la Barca AM (2006) Goma de mezquite: una alternativa de uso industrial. *Interciencia* 31:183–189
- López-Franco YL, Calderón de la Barca AM, Valdez MA, Peter MG, Rinaudo M, Chambat G, Goycoolea FM (2008) Structural characterization of mesquite (*Prosopis vetulina*) gum and its fractions. *Macromol Biosci* 8:749–757
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nandwani D, Ramawat KG (1991) Callus culture and plantlets formation from nodal explants of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. *Indian J Exp Biol* 29:523–527
- Nandwani D, Ramawat KG (1992) High frequency plantlets regeneration from seedling explants of *Prosopis tamarugo*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 29:173–178
- Orozco-Villafuerte J, Ponce-Alquicira E, Cruz-Sosa F, Vernon-Carter EJ (2003) Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydr Polym* 54:327–333
- Orozco-Villafuerte J, Buendía-González L, Cruz-Sosa F, Vernon-Carter EJ (2005) Increased mesquite gum formation in nodal explants cultures after treatment with a microbial biomass preparation. *Plant Physiol Biochem* 43:802–807
- Pearce KN, Kinsella JE (1978) Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J Agric Food Chem* 26:716–723
- Qui JA, Castro-Concha LA, García-Sosa K, Peña-Rodríguez LM, Miranda-Ham ML (2009) Differential effects of phytotoxic metabolites from *Alternaria tagetica* on *Tagetes erecta* cell cultures. *J Gen Plant Pathol* 75:331–339
- Reid S, Sims IM, Melton LD, Gane AM (1999) Characterisation of extracellular polysaccharides from suspension cultures of apple (*Malus domestica*). *Carbohydr Polym* 39:369–376
- Rodríguez-Monroy M, Galindo E (1999) Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in stirred tank. *Enz Microb Technol* 24:687–693
- Román-Guerrero A, Orozco-Villafuerte J, Pérez-Orozco JP, Cruz-Sosa F, Jiménez-Alvarado R, Vernon-Carter EJ (2009) Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil. *Food Hydrocoll* 23:708–713
- Showalter AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* 58:1399–1417
- Trejo-Tapia G, Rodríguez-Monroy M (2007) Cellular aggregation in secondary metabolite production in *in vitro* plant cell cultures. *Interciencia* 32:669–674
- Trejo-Tapia G, Jiménez-Aparicio A, Villarreal L, Rodríguez-Monroy M (2001) Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. *Biotechnol Lett* 23:1943–1946
- Van Holst GJ, Clarke A (1985) Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Anal Biochem* 148:446–450
- Vázquez-Ortiz FA, López-Franco Y, Goycoolea FM (2006) Fractionation and characterization of the monosaccharides from mesquite *Prosopis* spp. and arabic gum by normal, bonded phase, HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 29:1991–1999
- Verbeken D, Dierckx S, Dewettinck K (2003) Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:10–21
- Vernon-Carter EJ, Beristain CI, Pedroza-Islas R (2000) Mesquite gum (*Prosopis* gum). In: Doxastakis G, Hiosseoglu V (eds) Novel

- macromolecules in food systems, developments in food science. Elsevier, The Netherlands, pp 217–238
- Xu J, Shpak E, Gu T, Moo-Young M, Kieliszewski M (2005) Production of recombinant plant gum with tobacco cell culture in bioreactor and gum characterization. *Biotechnol Bioeng* 90:578–588
- Yadav MP, Johnston DB, Hotchkiss AT, Hicks KB (2006) Corn fiber gum: a potential gum Arabic replacer for beverage flavor emulsification. *Food Hydrocoll* 21:1022–1030
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23:283–333