



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

Efectos de agentes oxidantes en la producción de  
enzimas pectinolíticas de *Aspergillus flavipes* FP-500.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS

**P R E S E N T A**

MAYAHUEL GARCÍA JIMÉNEZ

Asesor

Dr. José Jesús Guillermo Aguilar Osorio.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Prof. José Guillermo Aguilar Osorio.

Vocal: Prof. María Del Pilar Granada Macías.

Secretario: Prof. Agustín Reyo Herrera.

1er. Suplente: Prof. María Del Carmen Urzua Hernández.

2do. Suplente: Prof. Jorge Arturo Aburto Anell.

Sitio donde se desarrollo el tema: Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos, Lab 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.

---

Asesor: Dr. José Jesús Guillermo Aguilar Osorio.

---

Supervisor Técnico: M. en C. Carlos Eduardo Gómez Sánchez.

---

Sustentante: Mayahuel García Jiménez.

El presente trabajo se desarrollo con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Proyecto IN 209007.

## *Agradecimientos*

*Gracias por todo:*

*A mi amada familia, mis padres, Irineo y Rosalina, quienes han alimentado mi espíritu, los admiro y los amo. Mis hermosos hermanos, Tonantzin, Coatlicue y Ehecatl, que me han cuidado y amado, además de aguantar mis malos ratos y manías, les estoy agradecida por estar ahí en esos momentos de presión. A Tlacaelel\* al que amo más que al sol y a la luna, que afortunada soy de tenerte, miec tlazohcamati inic nochi, nimitztlazohtla.*

*A mis amigas del alma, “Las Chicas” más divertidas, alegres y que más quiero: Brenda, Carla, Cecilia, Esmeralda, Lucía, Magdalena, Melissa, Mónica y Wendy, tan lindas e incondicionales. No cambiaría por nada del mundo todo lo que he vivido con ustedes. Los verdaderos amigos se conocen en las buenas, en las malas y en la universidad, merci beaucoup pour tout!! Je les adore.*

*Igualmente a mis entrañables, queridos y guapos amigos, los chicos más simpáticos que siempre me roban veinte carcajadas: Martin, Moles y especialmente Daniel, grazie mille per tutto, ti voglio bene.*

*Sin olvidarme de mis queridos amigos que esta preciosa vida me presento: Arturo, Blanca, Cintya, Claudia C, David, Edson, Fidel, María, Mela, Paola,, Paty, Raul y Teresa, sin ustedes toda la carrera hubiera sido gris, continuemos con nuestras charlas interminables del ser o no ser, jajajaja, continuemos tan unidos como hasta ahora para seguir festejando esos días importantes. Muito obrigado por tudo meus amigos.*

*Y un especial e inmenso agradecimiento al Dr. Guillermo Aguilar Osorio, por toda su enseñanza, su apoyo y sus consejos, así como a Carlos Gómez Sánchez y a Rodrigo Gutiérrez, sin alguno de ellos, este trabajo no hubiera sido posible, gracias por hacerme parte del grupo de hongos filamentosos. Thanks for every things, I'm so glad to meet you.*

# Contenido

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
III.	Objetivo general	4
IV.	Objetivos particulares	4
V.	Hipótesis	4
VI.	Antecedentes	5
	1. Propiedades de la pared celular de las plantas	5
	1.1 Celulosa.	6
	1.2 Hemicelulosa.	6
	1.3 Pectina.	8
	2. Enzimas pectinolíticas	10
	2.1 Pectinesterasa	11
	2.2 Poligalacturonasas	12
	2.3 Liasas	13
	3 Estrés oxidativo	13
	3.1 Sistema antioxidante	16
	3.2 Catalasa	17
VII.	Materiales y Métodos	21
	Microorganismo	21
	Preparación del inóculo	21
	Inoculación en medio líquido.	22
	Inoculación en medio sólido.	22
	Medios de cultivo y condiciones de cultivo.	22
	Medio líquido	22
	Medio sólido	23
	Tratamiento con los agentes oxidantes	24
	Determinaciones experimentales	24
	Toma de muestra	24
	Fracción extracelular	24
	Fracción intracelular	24
	Determinación del crecimiento celular.	25
	Determinación de grupos reductores.	25
	Actividad de exo-pectinolítica.	25
	Actividad de endo-pectinolítica.	25
	Actividad de pectin liasa.	26

Actividad de catalasa	26
Cálculos necesarios	27
Concentración de esporas:	27
Ajuste de la concentración de esporas para inocular en medio líquido:	27
Actividad de una enzima	27
Actividad específica de una enzima	27
VIII.    Resultados y Discusión	28
1. Características del microorganismo.	28
Evaluación de la fuente de carbono.	28
Actividad de la catalasa sin condiciones de estrés oxidativo	28
2. Determinación de la concentración de los agentes oxidantes, en medio sólido	30
Efecto del peróxido de hidrogeno sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavipes</i> FP-500.	30
Efecto de la menadiona sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavipes</i> FP-500	35
3.- Determinación del efecto del estrés oxidativo sobre <i>Aspergillus flavipes</i> FP-500.	37
Crecimiento celular	37
pH	39
Azúcares reductores	40
Exo-pectinasas	42
Endo-pectinasas	45
Pectin liasas	48
Catalasas	50
Conclusiones	53
Bibliografía	54

## I. Resumen

Este trabajo tuvo como finalidad, conocer el efecto del estrés oxidativo, sobre la producción de enzimas pectinolíticas de la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500. Éstas enzimas son de suma importancia en la industria alimentaria, por lo que los factores que pueden modificar su producción, se deben estudiar con el fin de obtener mejores rendimientos.

La célula cuenta con un sistema de defensa antioxidante, el cual consiste en una parte enzimática y una no enzimática; la enzimática está conformada por la catalasa, la superóxido bismutasa y la peróxidasa, la no enzimática se constituye por moléculas como glutatión (GSH), ácido ascórbico, alfa-tocoferol, betacaroteno, vitamina A, flavonoides, ácidos fenólicos, manitol y trealosa. El estrés oxidativo se presenta, cuando hay un desequilibrio, a favor de las especies prooxidantes.

Para generar el aumento de los prooxidantes en el medio, se utilizó dos agentes oxidantes químicos, la menadiona y el peróxido de hidrógeno. El efecto de éste estímulo, se observó con la medición de la actividad de la catalasa, el crecimiento en peso seco, pH y las actividades pectinolíticas. Se obtuvo un descenso en las actividades pectinolíticas ante el efecto de los oxidantes así como un aumento en la actividad de la catalasa.

## II. Introducción

La microbiología industrial es la disciplina que utiliza a los microorganismos cultivados a gran escala, para obtener productos con valor comercial o para realizar transformaciones químicas importantes. Los principales microorganismos utilizados en los procesos biocatalíticos son los hongos microscópicos debido a su gran versatilidad bioquímica y metabólica. Esto se debe a sus mínimos requerimientos nutricionales; a que pueden crecer en ambientes muy diversos, con bajos valores de pH o temperaturas de hasta 62°C, además son grandes productores de sustancias de interés industrial, como las vitaminas, enzimas y antibióticos. (10,18).

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas son un grupo heterogéneo de enzimas que hidrolizan a la pectina, presente en las plantas. Éstas enzimas se utilizan en varios procesos convencionales de la industria, tienen gran importancia y un enorme potencial, especialmente en la industria de alimentos. Se aplican principalmente en la clarificación, la maceración y licuefacción de frutas y vegetales. Las enzimas pectinolíticas más utilizadas en la industria de alimentos procesados son la pectinmetilesterasa y la poligalacturonasa. Las especies microbianas más usadas para la obtención de estas enzimas pertenecen a la familia de *Aspergillus* por su alta actividad pectinolítica. Dado el notable desarrollo que tiene la industria alimentaria, la demanda de las enzimas pectinolíticas va en aumento en muchos países. En México, estas enzimas suelen ser importadas, siendo el precio cada vez más elevado, por lo que se recomienda buscar alternativas locales para su adquisición (10,24,25).

En los procesos de fermentación sumergida las condiciones de cultivo son de gran importancia debido a que de ellas depende la obtención de los productos deseados, los hongos filamentosos suelen presentar fluidos no -Newtonianos, provocando una inadecuada mezcla. En este sentido, el oxígeno juega un papel central porque es un elemento esencial para la existencia de los organismos aerobios. Sin embargo, es poco soluble en agua y en exceso tiende a generar especies reactivas (ERO), como el anión súperoxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Éstos son sumamente tóxicos para las células, pues causan el deterioro de diversas biomoléculas. Su

toxicidad se debe a que éstas especies carecen de un electrón y lo toman con avidez de las moléculas vecinas, que a su vez se convierten en radicales libres y así sucesivamente, ocasionando una reacción oxidativa en cadena. Bajo condiciones fisiológicas normales, los efectos tóxicos de las ERO son mínimos, debido a la protección del sistema antioxidante con el que cuenta la célula. Dentro de éste sistema, la catalasa es una de las enzimas más importantes para degradar el peróxido de hidrogeno, convirtiéndolo en agua y oxígeno. Se encuentra distribuida extensamente en la naturaleza, muchas bacterias, hongos y plantas cuentan con más de una, las provenientes de los hongos microscópicos son las que tienen mayor peso molecular y mayor estabilidad que las del resto de los organismos (9,21,22,34).

Cuando la concentración de pro-oxidantes se incrementa de tal forma que excede la capacidad celular para eliminarlos, las células comienzan a sufrir estrés oxidativo, por lo que la respuesta del organismo debe ser rápida para evitar el daño celular ocasionado por ERO. Una de las formas de inducir estrés oxidativo es mediante el uso de agentes oxidantes químicos, como el peróxido de hidrogeno y menadiona; estos agentes provocan aumento en las especies prooxidantes. El peróxido de hidrogeno al ser una ERO provoca un aumento de esta. La menadiona tiene dos mecanismos de acción, provoca un aumento en ERO por medio del ciclo de reducción de un solo electrón de NAD(P)H, generando dos moléculas de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o debido, a que logra que la mitocondria se vuelva permeable, permitiendo la salida de ERO, alterando el equilibrio de estas especies en la célula. Al utilizar menadiona las células se vuelven susceptibles a sufrir apoptosis (28,29,33).

### III. Objetivo general

- Conocer el efecto que tiene el estrés oxidativo en la producción de enzimas pectinolíticas extracelulares de *Aspergillus flavipes* FP-500.

### IV. Objetivos particulares

- Establecer las condiciones en las cuales *Aspergillus flavipes* FP-500 sufre estrés oxidativo.
- Identificar en cuales condiciones de estrés oxidativo *Aspergillus flavipes* FP-500 produce mayor actividad de catalasa.
- Conocer si el efecto del estrés afecta la producción de enzimas pectinolíticas.

### V. Hipótesis

Sí el uso de agentes oxidantes afecta el crecimiento celular, la producción de enzimas pectinolíticas se verán modificadas así como los niveles de catalasa presentes.

## VI. Antecedentes

### 1. Propiedades de la pared celular de las plantas.

La pared celular de las plantas es sumamente importante ya que le aporta su forma y las propiedades estructurales. Así mismo tiene el control del transporte intracelular, la protección en contra de otros organismos, el almacenamiento de reservas, el reconocimiento y la señalización celular. La pared celular contiene varios grupos de sustancias químicas: polisacáridos, glicoproteínas y compuestos derivados del fenol y minerales. Los polisacáridos que la componen son los compuestos orgánicos más abundantes, constituyen el 90% de su peso. En la parte externa presenta una estructura en capas, afuera de la membrana plasmática; en las plantas multicelulares, la pared celular se encuentra separada de las células adyacentes debido a una capa amorfa llamada *lamela* media (matriz gelatinosa). (13,14,16,31).

En términos generales, la pared celular de las plantas (figura 1), está constituida por un elemento fibroso, la celulosa, embebido a una matriz gelatinosa conformada por hemicelulosa, pectina y otros compuestos. La hemicelulosa y la pectina, así como los compuestos fenólicos (como la lignina), interactúan con las micro fibrillas de la celulosa por medio de enlaces de hidrogeno; de esta forma las estructuras se entrelazan como una red compleja. (13,14,16,32)

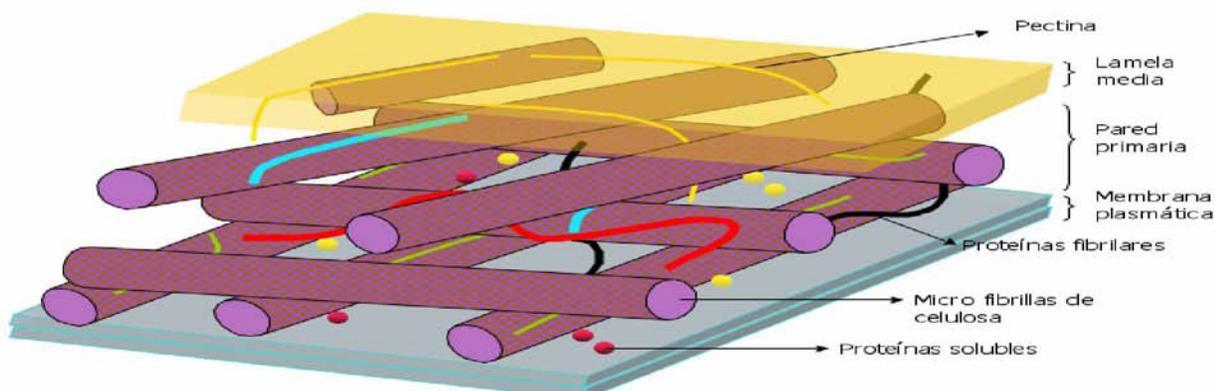


Figura. 1 Pared celular de las plantas

## 1.1 Celulosa.

Es el polisacárido más abundante y mejor conocido de la pared celular de las plantas, debido a su organización molecular le proporciona la mayor cantidad de elemento fibroso. Se estima que la mitad del CO<sub>2</sub> en la naturaleza es fijado en forma de celulosa en las plantas. Está constituida por cadenas lineales de glucosa con enlaces β-1,4-D-glucosa (figura 2). Dichas cadenas, al encontrarse unidas por medio de enlaces de hidrógeno, forman estructuras cristalinas estables de naturaleza micro fibrilar, llamadas micro fibrillas; de esta forma se proporciona rigidez y resistencia a la pared celular. Cada micro fibrilla mide 5-10nm de diámetro, constituidas por más de 250 cadenas de glucosa (13,16,32).

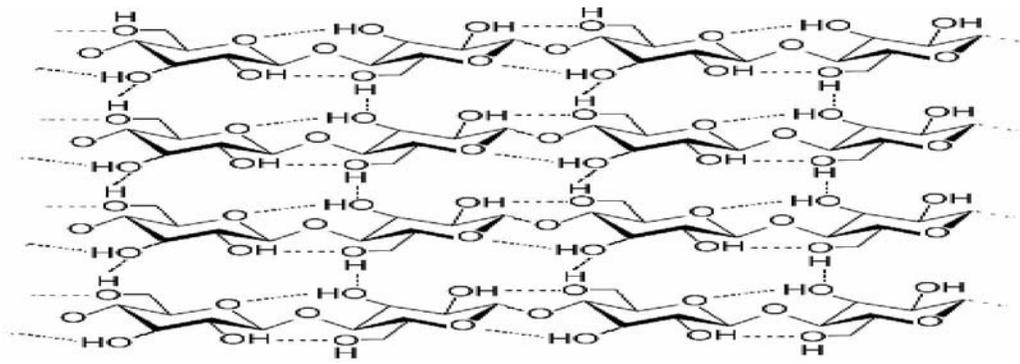


Figura. 2 Estructura micro fibrilar de la celulosa

## 1.2 Hemicelulosa.

La hemicelulosa es una familia de polisacáridos heterogéneos y la segunda estructura orgánica más abundante de la pared celular; se caracterizan por ser ramificados, se les clasifica de acuerdo al contenido de monosacáridos en su estructura principal y en sus ramificaciones, por ejemplo: D-xilanos, D-glucanos, D-mananos, xiloglucanos, glucomananos, galactomananos, glucuronomananos, glucuronoxilanos, arabinoxilanos y arabinogalactanos (13,16,31).

De las hemicelulosas, el polisacárido mayoritario en cereales y maderas duras es el xilano; el cual, presenta en su estructura enlaces de  $\beta$ -1,4-D-xilosa y ramificaciones que pueden ser sustituidas por L-arabinosa, D-galactosa, acetilo, ácidos ferúlicos, así como residuos de ácido glucurónico (figura 3) (31).

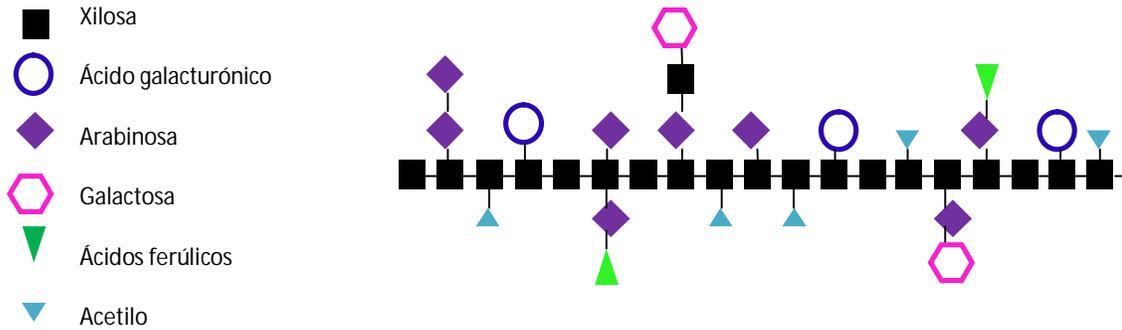


Figura. 3 Estructura de Xilano (Tomado de Vries R.P. et al, 2001)

La segunda estructura de hemicelulosas comúnmente encontrada en maderas suaves y duras (figuras 4 y 5), es el galacto-glucomanano, que está constituida por enlaces  $\beta$ -1,4-D-manosa y D-glucosa, con ramificaciones de D-galactosa (31).

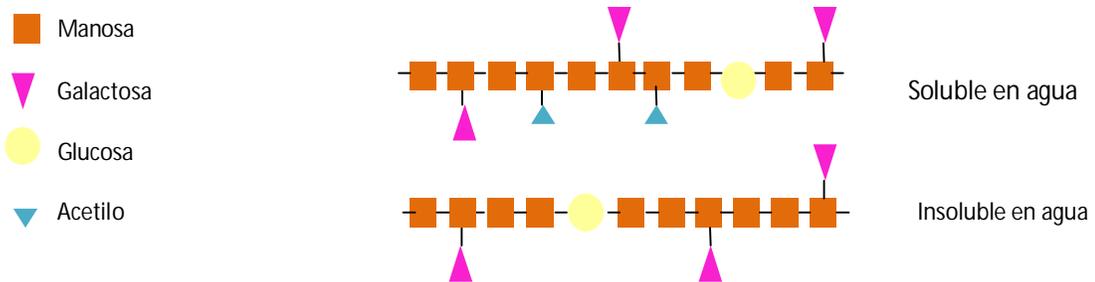


Figura. 4 Dos estructuras de Galactoglucomanano, que se encuentra comúnmente en maderas suaves y duras (Tomado de Vries R.P. et al, 2001)

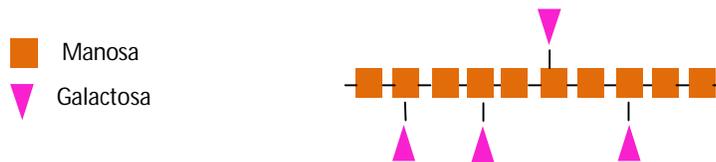


Figura. 5 Estructura del Galactomanano, que se encuentra comúnmente en maderas duras (Tomado de Vries R.P. et al, 2001)

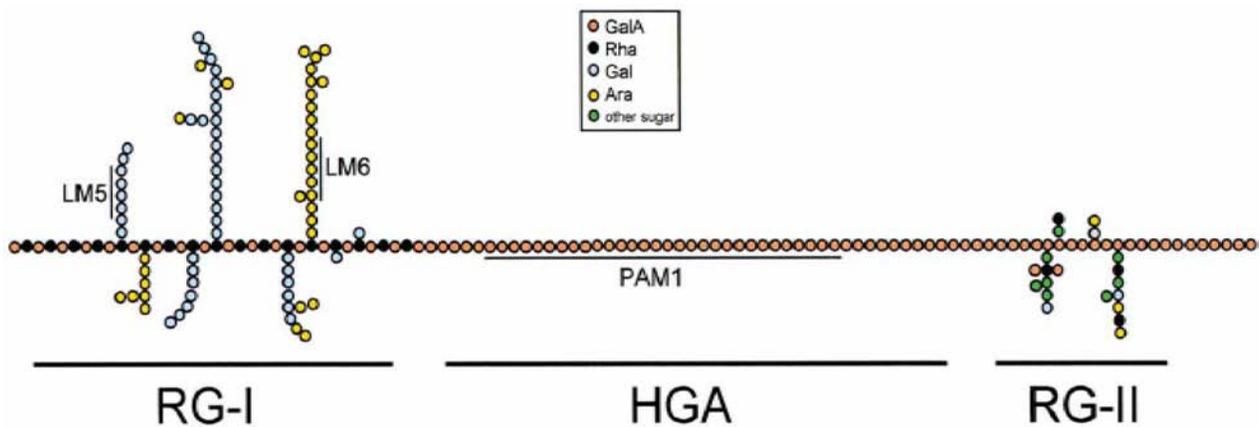
### 1.3 Pectina.

La pectina es la macromolécula mayoritaria de la *lamela* media en la pared celular de las plantas. Es un polisacárido heterogéneo, ácido y cargado negativamente; además es un compuesto rico en ácido galacturónico. Su peso molecular no está bien definido ya que depende de su origen y del estado de maduración de la planta, el rango es entre 25 y 360kDa. Debido a sus propiedades, la pectina juega un papel importante en la pared celular, atrapa agua para formar un extenso gel hidratado, el cual rellena los espacios que se forman entre los elementos fibrosos, ayudando a la hidratación celular y a la adhesión de las células adyacentes, así como en la plasticidad de la pared celular para la elongación de las plantas y maduración de los frutos. Está involucrada en el control de la porosidad de la pared celular y participa en el transporte intracelular de materiales. Cuando la planta llega a ser atacada por patógenos, fragmentos de pectina son liberados por la pared celular desencadenando la respuesta de defensa de las células. La mejor definición bioquímica de la pectina, es que se trata de un grupo de polisacáridos rico en ácido galacturónico. Su estructura se conforma por dos regiones bien definidas, la zona "lisa" y la zona "peluda", cada una con características diferentes y con tres dominios de polisacáridos: homogalacturonano, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II (figura 6) (10,11,12,13,14,15,31).

- Homogalacturonano (HGA): Consiste en una estructura lineal de homopolímero formado por residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4, conteniendo de 100-200 residuos de ácido galacturónico, esta estructura puede ser metilada en  $O_6$  o acetilada en  $O_2$  y  $O_3$ ; se conoce comúnmente como la región "lisa" (14,31).
- Ramnogalacturonano I (RGI): Es un polisacárido abundante y heterogéneo, está unido por enlaces glucosídicos al dominio de homogalacturonano, se distingue, debido a que la estructura principal de  $\alpha$ -1,4-ácido D-galacturónico se ve intercalada por enlaces  $\alpha$ -1,2-L-ramnosa, en donde se ramifican cadenas de galactosa y arabinosa, unidas en  $O_4$ . Las ramificaciones de las cadenas de arabinosa, consisten en una cadena principal de enlaces  $\alpha$ -1,5-L-arabinosa, la cual se puede ramificar por enlaces  $\alpha$ -1,3-L-arabinosa o por residuos de ferulol unidos al  $O_2$  terminal de L-arabinosa. Las ramificaciones de las cadenas de galactosa, consisten en una cadena principal de enlaces  $\beta$ -1,4-D-galactosa, la cual puede ser ramificada por residuos de ferulol en  $O_6$ . RGI puede contener grupos de acetilo unidos por

esterificación en O<sub>2</sub> o O<sub>3</sub> de los residuos de ácido galacturónico de la cadena principal. Debido a su estructura se le conoce como la región “peluda” (14,31).

- Ramnogalacturonano II (RGII): Es un polisacárido de aproximadamente 30 unidades de monosacáridos, el cual se encuentra unido a una estructura principal de enlaces α-1,4-ácido D-galacturónico, ésta es sustituida por cuatro tipos heteropolímeros, formando cadenas laterales. Las cadenas laterales contienen 11 diferentes azúcares, incluyendo D-apiosa, L-ácido acerico y ácido 2-ceto-3-desoxy-D-mano-octulosónico. Una importante característica de RGII es su capacidad de dimerizarse, es decir de formar uniones ester con el ion borato por medio de residuos de D-apiosa (14,31).



- Azúcares naturales en la cadena lateral
- Longitud de cadenas laterales
- Vínculos y ramificaciones de la cadena lateral.
- Distribución de la cadena lateral sobre la cadena principal de RG.
- Patrón y grado de metil-esterificación de residuos de ácido galacturónico.
- Patrón y grado de acetil-esterificación de residuos de ácido galacturónico

- Patrón y grado de metilesterificación.
  - Patrón y grado de acetilesterificación.
- Xilogalacturanos
- Grado de sustitución de xilosa
  - Longitud de la cadena lateral de xilosa
  - Distribución de los sustituyentes sobre la cadena principal.
- Apiogalacturonano
- Patrón y grado de metilesterificación.
  - Grado de sustitución de apiosa.
  - Longitud de la cadena lateral de apiosa.
  - Distribución de los sustituyentes sobre la cadena principal.
  - Patrón y grado de metilesterificación.

- Distribución en la cadena de pectina
- ¿Metil-esterificación en la cadena principal de HG?
- ¿Acetil-esterificación en la cadena principal de HG?

Figura 6. Estructura de la pectina. (Tomado de Knox J.P, et al, 2001)

Un aspecto que diferencia a las especies de pectina entre sí, es su contenido de ésteres metílicos, o grado de esterificación (GE), el cual disminuye al producirse la maduración de las plantas. El GE es definido como el número de residuos de ácido D-galacturónico esterificados sobre el total de ellos, expresado por tanto por ciento. La pectina posee un GE de 50. Las pectinas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria (7).

## 2. Enzimas pectinolíticas

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas se encargan de la degradación de la pectina. Estas enzimas se encuentran distribuidas en las plantas superiores y en microorganismos, como los hongos. En el caso de las plantas, éstas juegan un papel muy importante, debido a que son las responsables de la extensión de la pared celular y de la suavidad, maduración y almacenamiento de los frutos, en algunas plantas. Este tipo de enzimas ayudan a mantener el balance ecológico ya que causan la descomposición y el reciclaje de los materiales de desecho de la planta (10).

En la industria alimentaria, estas enzimas son ampliamente utilizadas debido a sus cualidades. Logran una degradación parcial de la fracción polimérica de la pared celular de las plantas, por lo que son sumamente útiles en los procesos de maceración, licuefacción y extracción de tejidos vegetales, además, reducen la viscosidad de la pulpa, ayudando en la filtración y clarificación de los jugos de fruta. En la industria de la madera conjuntamente con las celulasas, hemicelulasas y xilanasas, ayudan a remover la corteza de los troncos de los arboles, proceso que tradicionalmente consume una gran cantidad de energía. El uso de estas enzimas, facilita varios procesos industriales, proporcionando una buena alternativa a la industria (25,31).

Desde el punto de vista comercial, las enzimas pectinolíticas microbianas, conforman el 25% de la venta global de enzimas; casi todas las preparaciones comerciales de pectinasas son producidas por una fuente fungal, el microorganismo más ampliamente utilizado es *Aspergillus niger* por su gran capacidad de fermentación y su alto nivel de producción. En general *Aspergillus spp*, es ampliamente utilizado para la obtención de una gran cantidad de enzimas (10,31).

Las enzimas pectinolíticas se clasifican en dos amplios grupos: (10)

- Esterasas: Catalizan la desesterificación de la pectina, removiendo a los grupos metoxi ester.
- Despolimerasas: Catalizan la división de las uniones  $\alpha$ -1,4-ácido D-galacturónico, de las fracciones de pectina.

Además, pueden subdividirse en cuatro diferentes categorías, dependiendo de la preferencia de la enzima por el sustrato, el mecanismo y el lugar de ruptura de los enlaces glucosídicos. La poligalacturonasa (PG) y la polimetilgalacturonasa (PMG) logran rupturas por medio de la hidrólisis, es decir, la introducción de una molécula de agua. Mientras que la poligalacturonato liasa (PL) y la polimetilgalacturonato liasa (PGL) logran la división de los enlaces glucosídicos por medio de la  $\beta$  trans-eliminación, la ruptura del enlace se lleva a cabo sin la necesidad de incorporación de una molécula de agua. Dependiendo del lugar del corte de la enzima, ya sea al azar o en la parte terminal, se denomina enzimas endo o exo, respectivamente (10).

## 2.1 Pectinesterasa

La pectin-esterasa (PE, E.C. 3.1.1.11) cataliza la desesterificación de los grupos metil ester, unidos al ácido galacturónico (figura 7); actúa primero que las otras enzimas. Su modo de acción depende de la fuente de la que se obtenga, si proviene de un hongo actúa sobre múltiples cadenas, removiendo el grupo metilo en forma aleatoria. Si se trata de las obtenidas en plantas, actúan en el grupo final no reductor o en el siguiente grupo carboxilo libre y sobre una sola cadena (10).

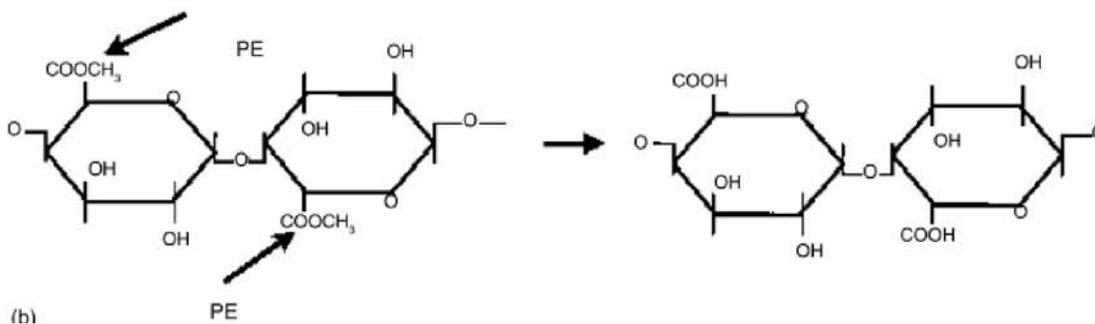
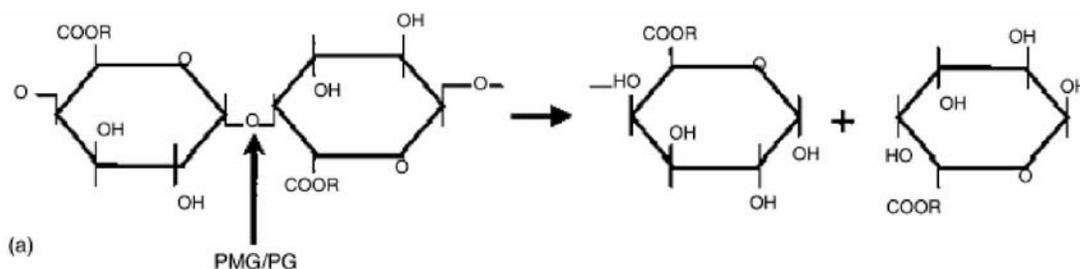


Figura. 7 Reacción catalizada por la pectinesterasa. (Tomado de Gupta R., et al, 2005)

Su rango de peso molecular es de 35-50kDa, su pH óptimo de actividad es 4.0-8.0. Las pectinesterasas fúngicas suelen tener un pH de actividad más bajo que las bacterianas, su temperatura óptima está entre 40-50°C(10).

## 2.2 Poligalacturonasas

Estas enzimas actúan por medio de hidrólisis sobre la cadena de ácido galacturónico (figura 8). Pueden ser endo-poligalacturonasa (E.C.3.2.1.15) y exo-poligalacturonasa (E.C.3.2.1.67). La endo-poligalacturonasa está ampliamente distribuida, se puede encontrar en hongos, bacterias, levaduras y plantas, la exo-poligalacturonasa no se encuentra tan frecuentemente; se han encontrado dos formas de acción de esta enzima, dependiendo de su origen. La de origen fungal produce ácido monogalacturónico como producto final, mientras que la de origen bacteriano producen ácido digalacturónico como producto final (10).



En caso de PMG R= CH<sub>3</sub> y de PG R= H

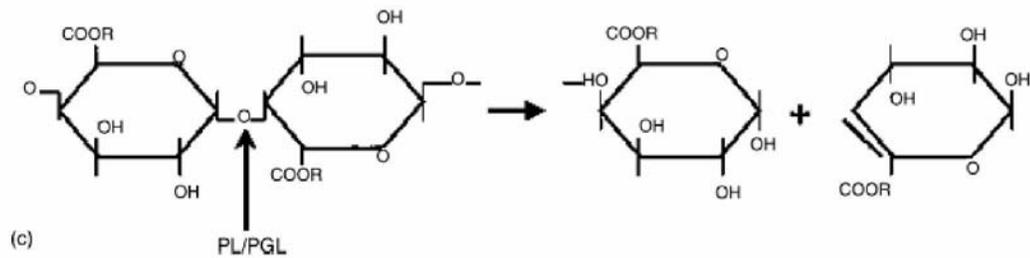
Figura8.- Reacción catalizada por las poligalacturonasas (Tomado de Gupta R., et al, 2005)

Estas enzimas han sido aisladas de diferentes fuentes microbianas, que le proporcionan características fisicoquímicas y biológicas particulares. En general su pH óptimo de actividad es ácido (3.5-5.5) y el rango de temperatura varía entre 30-50°C. Se han encontrado seis tipos de hidrolasas en la familia de *Aspergilli*. Varias endo-poligalacturonasas actúan dentro de la región lisa de la pectina, mientras que las exo-poligalacturonasas actúan en la misma región pero sobre la fracción terminal no reductora. *Aspergillus niger* tiene siete poligalacturonasas, éstas se diferencian por la especificidad de su mecanismo de acción, la actividad varía de 25-4,000 U/mg, dependiendo de la sensibilidad de la metilación del sustrato; cuatro de sus enzimas (endo-poligalacturonasa I, A, C y D) tienen un comportamiento procesivo, actuando en un múltiple

ataque, en una sola cadena. Además esta especie contiene otras tres enzimas (endo-poligalacturonasa II, B, y E) que actúan por medio de un ataque simple sobre una sola cadena(28). El pH óptimo de PG I y PG II es de 3.8-4.3 y 3.0-4.6 respectivamente (10, 31).

### 2.3 Liasas

Las liasas o trans-eliminadas, logran la ruptura del enlace glucosídico mediante un mecanismo no hidrolítico; rompen el enlace en el C4 y simultáneamente elimina hidrogeno de C5 produciendo un producto insaturado (figura 9) (10).



En caso de PL R= CH<sub>3</sub> y para PGL R= H

Figura 9.- Reacción catalizada por las liasas (Tomado de Gupta R., et al, 2005)

Estas enzimas usualmente se ven involucradas en la patogenicidad de las plantas, producidas por bacterias y/o hongos. Requieren calcio para su funcionamiento, la mayoría tienen un peso molecular de 30-40 kDa con un punto isoeléctrico de 7.0-11.0. Presentan un pH óptimo alcalino de 7.5-10.0 y su temperatura óptima varía entre 40-50°C (10).

### 3 Estrés oxidativo

Además de que el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) es necesario para la vida aerobia, también es un gas corrosivo y tiende a formar especies reactivas tóxicas (ERO), las cuales son causantes de estrés oxidativo celular (17,29).

Todos los organismos aerobios generan inevitablemente ERO, como subproductos de su metabolismo normal, se forman principalmente durante la cadena respiratoria, debido a una fuga de electrones en el último paso de su transporte electrónico, donde se lleva a cabo la reducción de cuatro electrones del oxígeno a agua. La citocromo oxidasa, transfiere electrones al oxígeno desde los iones metálicos que cambian sus estados de valencia con un electrón cada vez, como el hierro del hemo y el cobre en la citocromo oxidasa. Debido a que las interacciones de los transportadores de un electrón con los transportadores de dos electrones no tienen una eficiencia del 100%, las oxidasas generan a menudo especies de oxígeno reducidas de forma incompleta: superóxido ( $O_2^-$ ), que se forma a partir de una reducción de un electrón del oxígeno ( $O_2$ ); el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que se forma a partir de una reducción de dos electrones; y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) que se forma por una reducción de tres electrones. Estas especies reactivas también se pueden formar debido a la excitación del oxígeno singulete, el cual ha pasado a un estado alto de energía y es extremadamente reactivo, se forma por medio de la luz, produciendo una parcial reducción del oxígeno (figura 10) (1,19,26,29).

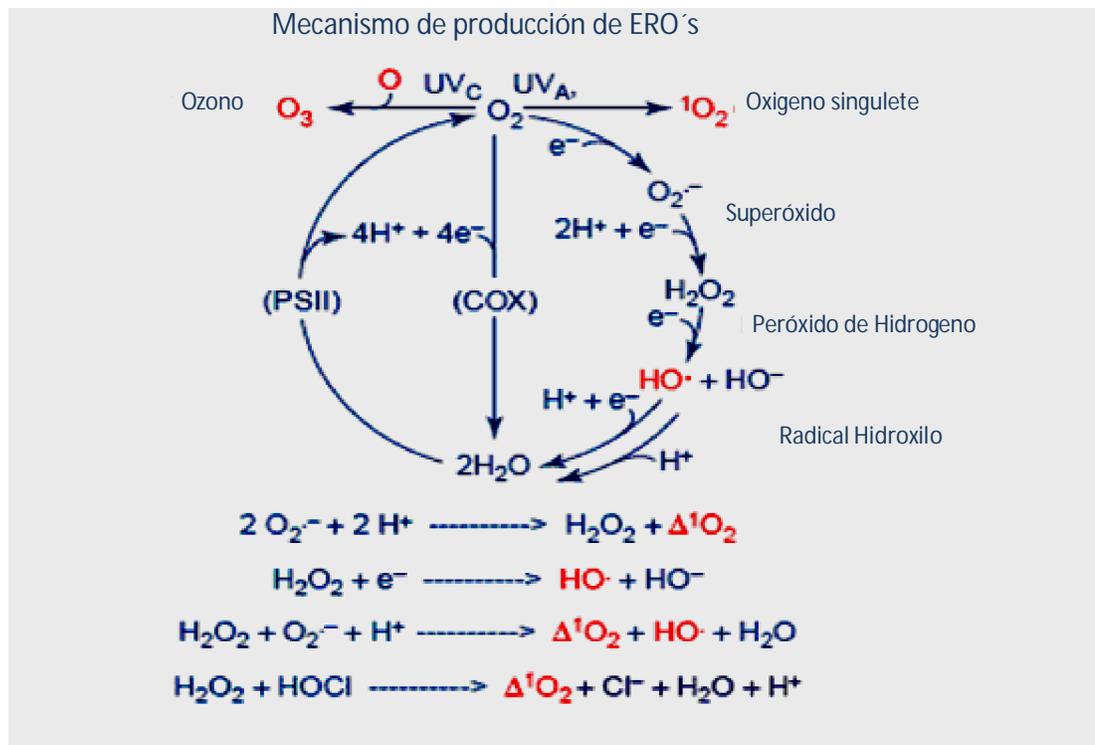


Figura. 10 Mecanismo de producción de ROS por medio de la luz (Tomado de Aguirre J., et al, 2005)

El radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) es el más reactivo de ERO; daña a las proteínas inactivándolas y a las membranas celulares iniciando la oxidación de los ácidos grasos, en un proceso denominado peroxidación lipídica, también daña a los ácidos nucleicos produciendo la ruptura de la cadena de polinucleótidos y cambiando la estructura de las bases del ADN. Éste radical se forma en el citoplasma de la célula, por efecto de radiaciones ionizantes y representa el mutagénico más activo que se deriva de esta exposición. También se produce en la reacción entre los radicales libres del ión superóxido y peróxido de hidrógeno (19,29).

El anión superóxido no es tan tóxico, sin embargo, como contiene un electrón desapareado se combina con facilidad con otro radical, el óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) un agente biológico de señalización que se produce en muchos tejidos, el producto que se forma peroxinitrito ( $\text{OONO}\cdot$ ), el cual se considera una especie reactiva del oxígeno, produce peroxidación lipídica y también da lugar a la nitración de los grupos hidroxilo de la tirosina de las proteínas, una reacción particularmente dañina para las proteínas de la membrana (19).

El peróxido de hidrógeno es universalmente citotóxico en altas concentraciones, esto se debe a la conversión que pueda sufrir transformándose en el oxidante más fuerte, el radical hidroxilo, debido a la reducción de los iones pertenecientes al sitio activo de la superóxido dismutasa (SOD) (2,20).

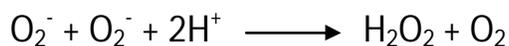
La toxicidad de ERO se debe a su carencia de electrones, por lo cual lo toman con avidez de las moléculas vecinas, que a su vez se convierten en radicales libres, y así sucesivamente; a menos que se detenga rápidamente esta reacción oxidativa en cadena, la célula puede resultar gravemente dañada. En el metabolismo celular normal se producen ERO en cantidades muy elevadas, se ha calculado que entre 1-2% de todos los electrones que entran en la cadena respiratoria no llegan nunca a la citocromo oxidasa, si no que se desprenden de los complejos I, II y III llevándose a cabo reducciones de un electrón de oxígeno a ión superóxido (19,29).

### 3.1 Sistema antioxidante

Debido a que las especies reactivas del oxígeno son inevitables en la vida aerobia, todos los organismos aerobios cuentan con un sistema de defensa para prevenir y reparar el daño oxidativo. Este sistema antioxidante está conformado por una parte enzimática y una no enzimática (3,19).

La protección no enzimática la proporcionan los compuestos antioxidantes como glutatión (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides, ácidos fenólicos, ácido úrico, manitol y trealosa que ayudan a eliminar a las especies reactivas del oxígeno antes de que puedan producir daños o evitan que se disperse el daño oxidativo. En general estos compuestos están constituidos por anillos aromáticos en los cuales se atrapan a los radicales libres. Las vitaminas E y A, así como el beta-caroteno, son de carácter lipofílico por lo que su función principal es la preservación de las membranas celulares frente a la agresión oxidativa. El glutatión es abundante dentro de las células, tiene como principal función evitar el daño celular a causa del peróxido de hidrógeno; la vitamina C es muy importante debido a su hidrosolubilidad y a su fácil oxidación en ácido deshidroascórbico. En los líquidos extracelulares las concentraciones de ascorbato son mucho mayores que las de glutatión; por tanto, el ascorbato desempeña el papel predominante en la protección antioxidante extracelular. Los datos más recientes sugieren que el principal cometido antioxidante del ácido úrico está en su capacidad de unirse al peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e inactivarlo (4,5,19,26).

Entre los mecanismos enzimáticos en la primera línea de defensa está la superóxido dismutasa, una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación del superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). La superóxido dismutasa transforma los radicales libres del anión superóxido en oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (19).



Por medio de la catalasa, una hemo proteína, el peróxido de hidrógeno se convierte inmediatamente en oxígeno y agua, con una tasa de recambio extraordinario de >40,000 moléculas por segundo; se le considera de las más importantes para la detoxificación celular, ya que el peróxido de hidrógeno se produce también en reacciones donde actúan oxidasas (18,19).



La peroxidasa es otra enzima que es capaz de transformar al peróxido de hidrógeno pero a diferencia de la catalasa no libera oxígeno en la reacción (19).



### 3.2 Catalasa

La catalasa (E.C.1.11.1.6) es una de las enzimas más eficientes, su centro activo está compuesto por hierro, ferriprotoporfirina IX, del grupo hemo. Para su función requiere que sus subunidades se encuentren unidas, de otra forma pierde su actividad (34).

La catalasa se forma en el citosol, es transportada al interior de la matriz del peroxisoma en donde se agrega el grupo hemo, proporcionándole actividad a la enzima; tiene una vida media de 14 minutos. Los peroxisomas son vesículas con cubierta de clatrina de 50-250nm, en donde se llevan a cabo las principales reacciones de formación y degradación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la catalasa representa hasta el 40% de la proteína total de éstos y además actúa como válvula de seguridad (27).

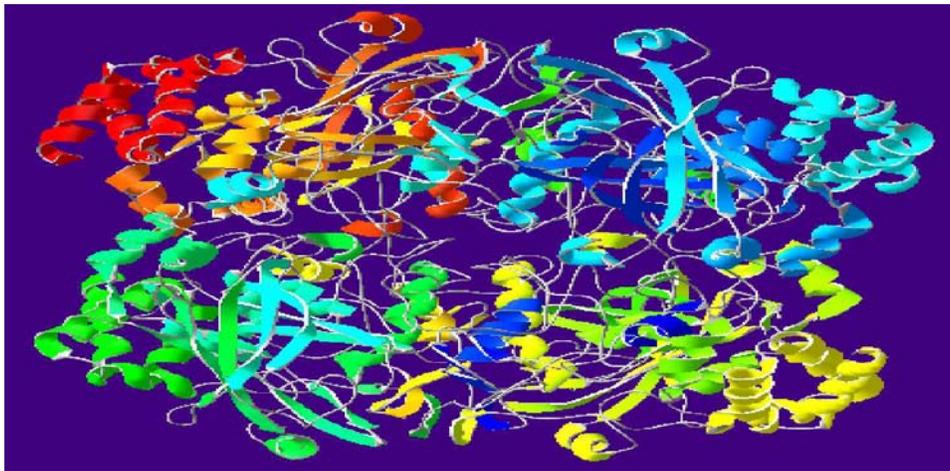


Figura11.- Estructura de una catalasa homotetrámerica

Debido a la gran diversidad de catalasas se les ha clasificado en tres subgrupos (34):

- Catalasa hemo monofuncional

En este subgrupo encontramos a las catalasas de casi todos los organismos con respiración aeróbica, muchos incluso tienen dos o más isoformas. La mayoría son homotetrámeras (figura 11), con peso molecular de 200-340kDa con cuatro grupos prostéticos hemo. En la mayoría de los casos ferriprotoporfirina IX se encuentra en el sitio activo. Se ha encontrado que este tipo de catalasas suele ser altamente eficiente, ya que se estimula su producción con la aparición de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, es decir, no se inhibe su actividad por medio del sustrato (34).

- Catalasas-peroxidasas

En este grupo las catalasas se encuentran en tres dominios; Procariontes, *Archea* y Eucariontes, sin embargo, en el último sólo se han detectado en los hongos. Su peso molecular es 120-340kDa y en general son homodímeros, aunque se han reportado homotetrámeros; existe una asociación reversible de dímero-tetramero. La característica más importante es su comportamiento catalítico bifuncional. Este tipo de enzima, en comparación con las catalasas homofuncionales, muestra una actividad catalítica menor y mayor sensibilidad de inactivación a altas temperaturas, pH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (34).

- Catalasa de Manganeso

Hasta ahora sólo se han encontrado tres de estas, una proviene de las bacterias lácticas y las restantes de los organismos termofílicos. A éstas enzimas se les llaman también pseudocatalasas debido a que utilizan manganeso en vez de un grupo hemo en su sitio activo. Su peso molecular es de 170-210kDa y forman estructuras inusuales oligoméricas (homopentámeros o homohexameros) (34).

Muchas bacterias, hongos y plantas tienen más de una catalasa, las provenientes de los hongos microscópicos son las que tienen mayor peso molecular y mayor estabilidad. Son reguladas de diferente forma y algunas se relacionan con la etapa de desarrollo en que se encuentra el hongo; creciendo en medio líquido las esporas asexuales (conidia) presentan 60 veces más actividad de catalasa que las hifas (11,15).

En *Aspergillus nidulans* G1059 se han encontrado cuatro catalasas A, B, C y D. En un estudio de dos de sus catalasas (A y B), se encontró que tienen regulación diferenciada que protege al hongo de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La catalasa A sólo es inducida durante la

esporulación y en respuesta a diferentes tipos de estrés; la catalasa B está presente en el micelio vegetativo, incrementa su actividad durante el proceso asexual de la formación de esporas (5).

Para *Aspergillus niger* N400 se han realizado estudios de localización de catalasa por métodos de inmunocitoquímica y electroforesis, se encontró que es capaz de producir cuatro diferentes catalasas (I, II, III y IV). En condiciones normales presenta actividad en el interior (catalasa I) y en el exterior de la célula (catalasa II). Cuando la cepa fue inducida a una producción mayor de glucosa oxidasa, se encontró una producción mayor de peróxido de hidrógeno, lográndose inducir a otras dos diferentes formas de catalasas, las cuales se localizaron intracelularmente (catalasa III) y extracelularmente (catalasa IV); la inducción de glucosa oxidasa, se realizó aumentando el nivel de oxígeno de 30 a 50% de aire saturado, en un fermentador, durante 4-5h antes de la cosecha del micelio, en condiciones normales el nivel de oxígeno es del 7% de aire saturado (30).

El efecto del estrés oxidativo en *Aspergillus niger* B1-D provocó diferencia en su morfología al ser expuesto a altos niveles de oxígeno disuelto, presentando hifas más pequeñas que en aquellas muestras que no fueron sometidas a estas condiciones. Además se encontró una relación entre elevar la temperatura del medio de cultivo y el estrés oxidativo; ya que al crear choques térmicos en las células, se causó daño oxidativo debido a que se aceleró la formación de especies de oxígeno reactivo provocando el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Se obtuvo una alta actividad catalítica por parte de la catalasa al realizar un choque térmico de 37°C a 50°C por 30 minutos de incubación (4).

Se ha reportado que el hongo termofílico, *Thermoascus aurantiacus*, produce una catalasa con alta termoestabilidad hasta 80°C y un amplio rango de resistencia en la escala de pH de 5-13 a 30°C. Esta enzima fue caracterizada por su acumulación extracelular, la cual se obtuvo al 4° día después de su incubación. La actividad se puede observar incluso después de su incubación, en una disolución de hidróxido de sodio por varias horas (9).

En el caso de *T. aurantiacus* IFO 31693 es capaz de producir catalasa extracelular, a 43°C con una agitación de 180rpm, en un medio que contenga como fuente de carbono almidón (1%) con

metanol (0.5%). Al utilizar el medio con metanol es oxidado por la alcohol oxidasa produciendo peróxido de hidrógeno. Es común que para el estudio de la actividad de la catalasa se combine el estudio paralelo de la actividad de una oxidasa, debido a que en las reacciones de las oxidasas se obtiene como producto peróxido de hidrogeno, por tanto la célula debe responder con una mayor producción de catalasa (8,19).

En *Aspergillus oryzae* OSI 1013 se observó que la catalasa A tiene actividad solamente en medios sólidos en donde el hongo se encontraba morfológicamente como espora, no se logró inducir su actividad con el peróxido de hidrógeno; en cambio la catalasa B se puede inducir con el peróxido de hidrógeno en cualquier tipo de medio. Estas diferencias se han observado con anterioridad en otros hongos, por tanto, se cree que la función principal de la catalasa B es reducir los efectos tóxicos del estrés oxidativo y la producción de la catalasa A se requiere durante la etapa de la germinación provocando una sensibilidad en las esporas al peróxido de hidrógeno (12).

## VII. Materiales y Métodos

Para alcanzar los objetivos planteados se realizaron tres etapas:

1. Características del microorganismo: Se evaluó el crecimiento en diferentes fuentes de carbono y la actividad de la catalasa sin condiciones de estrés. Esta etapa se realizó en medio líquido.
2. Determinación de la concentración de los agentes oxidantes en medio sólido: Se determinó la concentración adecuada de los agentes oxidantes para causar estrés oxidativo sin perder la viabilidad del microorganismo. Además se evaluó la fuente de carbono y la fuente mineral.
3. Determinación del efecto del estrés oxidativo sobre *Aspergillus flavipes* FP-500 en medio líquido: Se evaluó el efecto del estrés oxidativo sobre el crecimiento del microorganismo y las actividades pectinolíticas y de la catalasa.

- Microorganismo

Se utilizó la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 del cepario del laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos. La cepa fue sembrada en placa con medio Sabouraud e incubada a 37 °C durante 3 días; al término de este tiempo se almacenó a 4 °C, con resiembras mensuales para mantener la cepa viable.

- Preparación del inóculo

El microorganismo se sembró bajo condiciones asépticas en placas de medio Sabouraud y se incubó durante 3 días a 37 °C. Al término de este período, se realizó la recolección de sus esporas. Éstas se suspendieron en 10 mL de una solución salina Tween 80 estéril (0.9 % P/V solución salina y 0.005 V/V solución tween 80); se centrifugó a 4500 rpm por 10 min y se realizaron tres lavados

con la misma solución. Se utilizó una cámara de Neubauer para conocer la concentración de esporas en el inóculo y se conservó a 4°C.

#### Inoculación en medio líquido.

Se emplearon matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo, inoculados para alcanzar una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/mL.

#### Inoculación en medio sólido.

Las placas fueron inoculadas en series de tres colonias por concentración de esporas, las concentraciones fueron:  $1 \times 10^6$  esporas/mL,  $1 \times 10^5$  esporas/mL,  $1 \times 10^4$  esporas/mL y  $1 \times 10^3$  esporas/mL, en un volumen de 10  $\mu$ l.

- Medios y condiciones de cultivo.

#### Medios líquidos

Se realizaron cuatro diferentes medios de cultivo:

- 1) Glucosa: Medio basal (tabla I) como medio mineral, como fuente de carbono glucosa al 1 % y extracto de levadura a 0.1 %, con pH de 4.2
- 2) Pectina: Medio basal (tabla I) como medio mineral, como fuente de carbono pectina al 1 %; con un pH de 4.2.
- 3) Ácido galacturónico: Medio basal (tabla I) medio mineral, como fuente de carbono ácido galacturónico al 1 % y extracto de levadura al 0.1 %; con pH de 4.2.
- 4) Pectina: Medio Pontecorvo (tabla I) como medio mineral, como fuente de carbono pectina al 1 %, con pH de 4.2.

Tabla I. Composición de los medios minerales

Medio Basal de Fosfatos (MB)	Medio Pontecorvo (MP)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5%	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,40%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.15%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.2%	KCl 0.05%
-----	MgSO <sub>4</sub> 0.05%

Todos los reactivos utilizados fueron con grado analítico y se utilizó agua destilada, se esterilizaron a 121 °C a 15 lb durante 20 minutos. Se incubaron a 37 °C con una agitación de 200 rpm.

#### Medios sólidos

Se utilizaron 5 diferentes tipos de medio de cultivo (tabla I):

- 1) Medio Sabouraud.
- 2) Medio basal de fosfatos con glucosa al 1 % y agar al 1.5 %.
- 3) Medio basal de fosfatos con pectina al 1 % y agar al 1.5 %.
- 4) Medio basal de Pontecorvo con glucosa al 1 % y agar al 1.5 %.
- 5) Medio basal de Pontecorvo con pectina al 1 % y agar al 1.5 %.

Todos los reactivos utilizados fueron con grado analítico y se utilizó agua destilada, se esterilizaron a 121 °C a 15 lb durante 20 minutos. Se incubaron por tres días a una temperatura de 37 °C.

- Tratamiento con los agentes oxidantes

En los medios sólidos se utilizaron diferentes concentraciones de los agentes oxidantes (tabla II), estos se añadieron junto con la fuente de carbono, antes de inocular el microorganismo. En los medios líquidos se utilizaron diferentes concentraciones del agente oxidante (tabla II), se realizó una adición en dos diferentes lapsos del crecimiento del microorganismo, 0 hrs y 16 hrs.

Tabla II

Agentes oxidantes	Peróxido de hidrogeno	Menadiona
Concentraciones en medio sólido	50 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM y 1 mM	2 mM, 1 mM y 0.5 mM
Concentraciones en medio líquido	5 mM y 1 mM	2 mM, y 1 mM

Todos los reactivos utilizados fueron con grado analítico y se utilizó agua destilada estéril.

#### Determinaciones experimentales

- Toma de Muestra

#### Fracción extracelular

Se tomó 5mL de cada muestra en 5 diferentes tiempos de crecimiento del microorganismo, 16 hrs, 24 hrs, 36 hrs, 48 hrs y 72 hrs. Se determinó el pH, crecimiento, las actividades pectinolíticas correspondientes y actividad de la catalasa.

#### Fracción intracelular

Se colectó el micelio por filtración y se realizaron 3 lavados con solución salina isotónica al 0.9%. Al micelio lavado se pesó 0.1 g de micelio húmedo y se le trasladó a un tubo conteniendo perlas de

vidrio, se añadió 1 mL de buffer de fosfatos (PBS, 50 mM pH 7). Se utilizó Mini-beadbeater durante 3 ciclos a una velocidad de 4,800 rpm. Los ciclos se componen de un período de 30 segundos en agitación y 60 segundos en hielo. Se tomó 0.7 ml y se centrifugó a 10,00 rpm durante 15 minutos. Se desechó el botón y se conservó el sobrenadante para su posterior análisis de la actividad de la catalasa.

- Determinación del crecimiento celular.

Las muestras se filtraron a través de membranas Millipore, con 5  $\mu$ m de diámetro de poro a peso constante y pesadas. La biomasa y la membrana se secaron a una temperatura de 37 °C durante 72 hrs. Se pesó y por diferencia de pesos se obtuvo el valor en miligramos de microorganismo en peso seco. El filtrado de la muestra se conservó para las siguientes determinaciones, ya que ésta es la fracción extracelular.

- Determinación de grupos reductores.

Se utilizó el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)(23). Para la valoración se empleó una curva patrón hecha con ácido galacturónico con un rango de 0-1 mg/mL y se reportó en como mg/mL de ácido D-galacturónico.

- Actividad exo-pectinolítica.

Se determinó por la liberación de grupos reductores por efecto de las exopectinasas. La mezcla de reacción se conformó por 0.5 mL de una solución de pectina al 1 % (p/v) en agua destilada a pH 5, 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM pH 5 y 0.1 mL de la fracción extracelular, se incubó a 45 °C durante 20 min. Después, para cuantificar los grupos reductores obtenidos se añadieron 2 mL DNS (método de DNS). La actividad se expresó en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu$ mol de ácido D-galacturónico en las condiciones de ensayo.

- Actividad endo-pectinolítica.

La actividad de la enzima se determinó por el cambio de viscosidad que se produce en una solución de pectina al 1% (p/v) y una solución amortiguadora de acetatos 100 mM a pH 4.2 con NaCl (0.03 % p/v), se utilizó un viscosímetro de Oswald. La reacción se inició al adicionar 0.5 mL de fracción extracelular a 10 mL de la solución de pectina y se incubó a 30 °C, se midió el tiempo de

reacción así como el tiempo que tardó en fluir la solución. La actividad se expresó en unidades enzimáticas (U), se define como la cantidad de enzima que redujo en un 50 % la viscosidad relativa de la solución de pectina en las condiciones de ensayo.

- Actividad pectin liasa.

Se determinó por el incremento de la absorbancia (235 nm), debido a la formación de grupos con doble ligadura entre el átomo de carbono cuatro y cinco del ácido D-galacturónico. La mezcla de reacción consistió en 0.5 mL de solución de pectina al 1 % (p/v) a pH 5.7 y 0.5 mL de solución amortiguadora tris-acetatos 100 mM a pH 9.5 con CaCl (24 mM), el valor de pH de la mezcla fue de 8.8. La reacción se inició cuando se adicionó 0.2 mL de la fracción extracelular a la mezcla de reacción y se incubo durante 60 min a una temperatura de 40 °C. Se detuvo la reacción al añadir 0.1 mL de HCl 1 N. Para la lectura es necesario diluir la muestra, se tomó 0.2 mL de la mezcla de reacción y se añadió 1.8 mL de HCl 10 mM. El blanco se preparó de la misma forma solo que el filtrado se añadió después de parar la reacción. La actividad se expresó por unidades enzimáticas (U) definidas como la cantidad de enzima necesaria para formar 1 $\mu$ mol de producto en las condiciones de ensayo.

- Actividad de catalasa

La actividad de la catalasa se midió en una longitud de onda de 240nm, la reacción se realizo en una celda de cuarzo. Se adiciono a la celda 0.6 ml de la fracción intracelular, se incubo durante 1 min a una temperatura de 25.°C, después se añadió 0.4ml de la mezcla de reacción, que consistió en 0.34 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (Sigma) en 100 ml de buffer de PBS. Se leyó inmediatamente. El blanco estuvo constituido por 0.6mL de PBS y 0.4mL de la mezcla de reacción. La actividad se expreso por unidades enzimáticas (U), definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu$ mol de producto por minuto de reacción, en las condiciones de ensayo.

## Cálculos necesarios

Concentración de esporas:

$$\bar{x} \text{ esporas} * 16 (\text{N}^\circ \text{ cuadros CN}) * 4 (\text{N}^\circ \text{ cuadrantes CN}) * \frac{100}{1} \text{ FD} * 2500 \frac{\text{esp}}{\text{mL}} \text{ FC}$$

CN: cámara de Neubauer

FD: Factor de disolución.

FC: Factor de conversión.

Ajuste de la concentración de esporas para inocular en medio líquido:

$$\frac{10^6 \text{ esp}}{\text{mL}} * 100 \text{ mL} (\text{vol del medio}) = 10^8 \text{ esp totales a inocular}$$

Actividad de una enzima

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

U: es la cantidad de enzima necesaria para degradar o producir  $1 \mu\text{mol}/\text{min}$

Actividad específica de una enzima

$$\frac{\frac{U}{\text{mL}}}{\frac{\text{mg peso seco}}{\text{mL}}} = \frac{U}{\text{mg peso seco}}$$



## VIII. Resultados y Discusión

### 1. Características del microorganismo.

#### Evaluación de la fuente de carbono

El crecimiento del microorganismo en las tres fuentes de carbono: glucosa, pectina y ácido galacturónico, fue favorable (figura 12), sin embargo, la cepa tiene un mejor crecimiento en glucosa (4.71 mg peso seco/mL), esto se debe, a que se trata de una molécula de naturaleza sencilla y fácil de asimilar; el crecimiento en las otras fuentes de carbono es ligeramente menor. Sin embargo, no hay una gran diferencia entre el ácido galacturónico y la pectina (4.01 mg peso seco/mL y 4.13 mg peso seco/mL respectivamente).

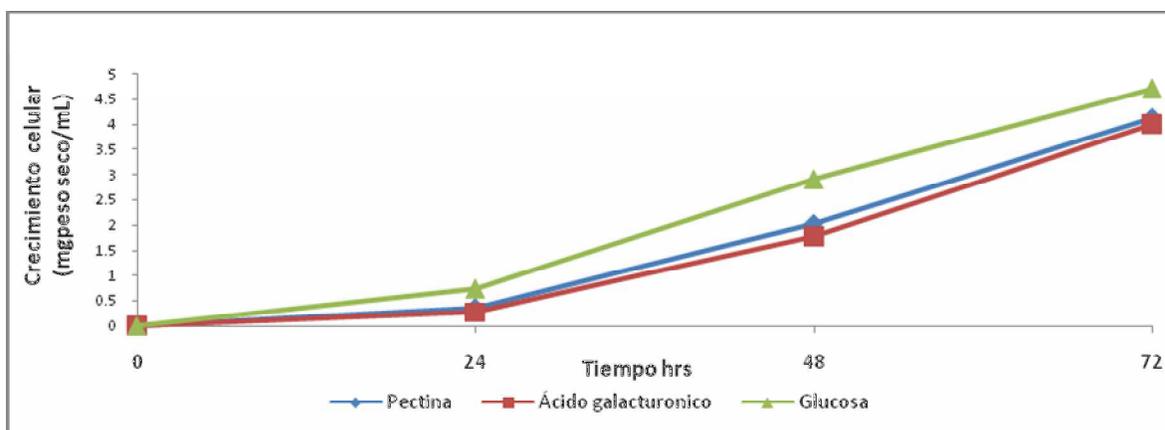


Figura 12. Crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500, creciendo en glucosa, ácido galacturónico y pectina, en medio basal; incubado a 37°C, 200 rpm y con pH<sub>i</sub> 4.2.

#### Actividad de la catalasa sin condiciones de estrés oxidativo

En estas mismas condiciones de crecimiento se determinó la actividad de la catalasa. Los valores mostrados de esta actividad pertenecieron exclusivamente a la fracción intracelular, en la fracción extracelular no se encontró actividad. La actividad se incremento a lo largo de la fermentación. La máxima actividad se obtuvo a las 72 hrs obteniéndose valores de 0.8 U/mL en pectina, 1.0 U/mL en ácido galacturónico y 0.63 U/mL en el medio con glucosa (figura 13). Estos datos muestran la producción de catalasa en condiciones donde no hay un reto oxidativo.

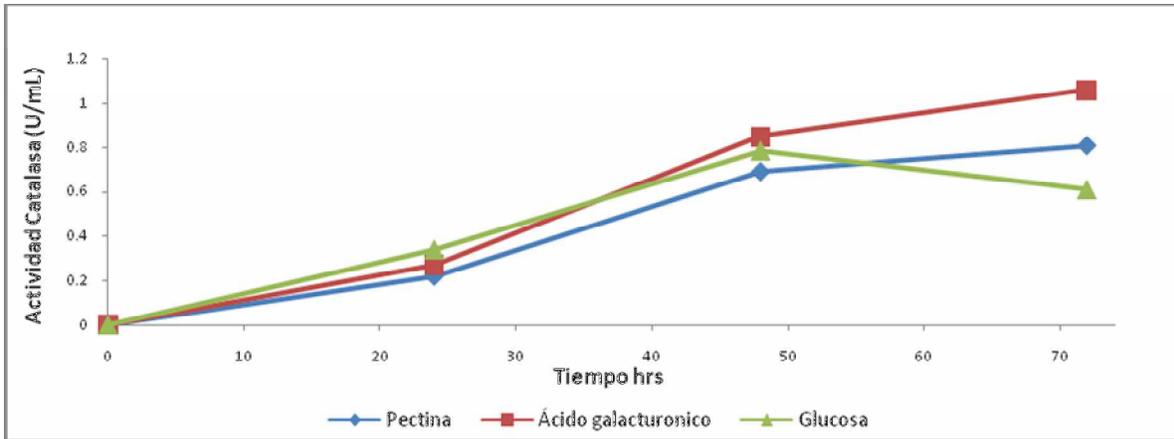


Figura 13. Actividad de catalasa intracelular de *Aspergillus flavipes* FP-500, creciendo en glucosa, ácido galacturónico y pectina, en medio basal, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

Dado que el crecimiento fue ligeramente diferente en las tres fuentes de carbono se calculó la actividad específica de la catalasa, encontramos que el máximo valor, en las tres fuentes de carbono, se obtuvo a las 24hrs de fermentación. Para pectina de 0.60 U/mg peso seco, 0.98 U/mg peso seco en ácido galacturónico y 0.45 U/mg peso seco en glucosa (figura 14). Aparentemente las células requieren mayor actividad de catalasa cuando la relación entre el grado de oxigenación y la biomasa es mayor.

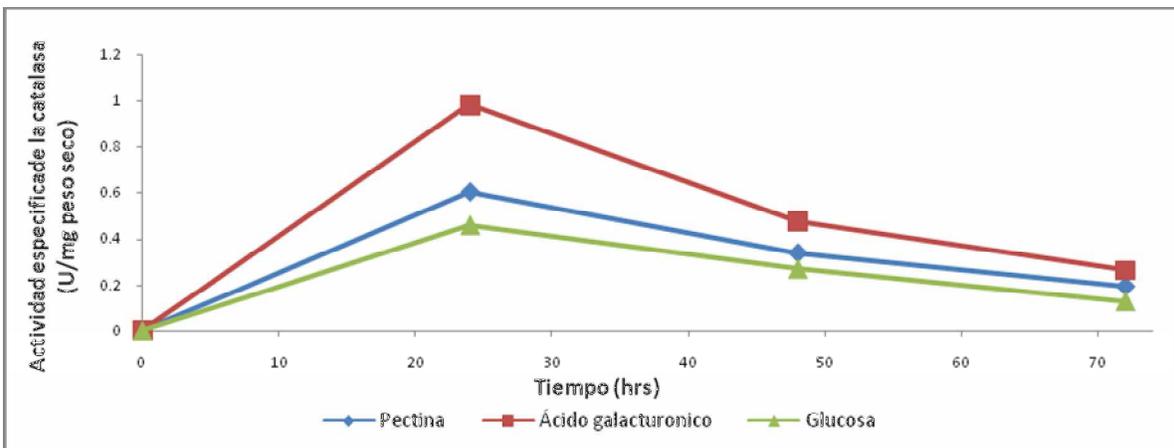


Figura 14. Actividad específica de la catalasa intracelular de *Aspergillus flavipes* FP-500, creciendo en glucosa, ácido galacturónico y pectina, en medio basal, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

## 2. Determinación de la concentración de los agentes oxidantes, en medio sólido

Se necesitó una concentración capaz de generar estrés en la cepa, sin ocasionar la pérdida de viabilidad; para su determinación se llevaron a cabo experimentos en medios sólido, con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y menadiona.

#### Efecto del peróxido de hidrogeno sobre el crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500

El efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se evaluó en 5 diferentes concentraciones, sobre cuatro diferentes concentraciones de esporas. Glucosa y pectina se utilizaron como fuentes de carbono, debido a que se ha mostrado que el microorganismo tiene un buen crecimiento en glucosa, y pectina porque este estudio tiene como objeto conocer el efecto que causan estos agentes, en la producción de enzimas pectinolíticas. Se considero importante evaluar el efecto de la composición mineral del medio y la fuente de nitrógeno, por esto, se emplearon dos diferentes medios, el medio basal de fosfatos y el medio Pontecorvo.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1 y en las figuras 15 y 16.

Tabla 1. Resultados del crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500

CONTENIDO DE LA CAJA	TRATAMIENTO	CRECIMIENTO
Medio Pontecorvo y Pectina	Control	Todas las colonias crecieron.
Medio Pontecorvo y Pectina	Peróxido 50 mM	Ninguna colonia creció
Medio Pontecorvo y Pectina	Peróxido 20 mM	Ninguna colonia creció
Medio Pontecorvo y Pectina	Peróxido 10 mM	Crecimiento en las colonias con concentración $1 \times 10^6$ esp/mL
Medio Pontecorvo y Pectina	Peróxido 5 mM	Crecimiento solo en las colonias con concentraciones $1 \times 10^6$ y $1 \times 10^5$ esp/mL
Medio Pontecorvo y Pectina	Peróxido 1 mM	Todas las colonias crecieron.
Medio basal de Fosfatos y Pectina	Control	Todas las colonias crecieron.
Medio basal de Fosfatos y Pectina	Peróxido 50 mM	Ninguna colonia creció
Medio basal de Fosfatos y Pectina	Peróxido 20 mM	Ninguna colonia creció
Medio basal de Fosfatos y Pectina	Peróxido 10 mM	Crecimiento en las colonias con concentración $1 \times 10^6$ esp/mL
Medio basal de Fosfatos y Pectina	Peróxido 5 mM	Crecimiento solo en las colonias con concentraciones $1 \times 10^6$ y $1 \times 10^5$ esp/mL
Medio basal de Fosfatos y Pectina	Peróxido 1 mM	Todas las colonias crecieron.
Medio Pontecorvo y Glucosa	Control	Todas las colonias crecieron.
Medio Pontecorvo y Glucosa	Peróxido 50 mM	Ninguna colonia creció
Medio Pontecorvo y Glucosa	Peróxido 20 mM	Ninguna colonia creció
Medio Pontecorvo y Glucosa	Peróxido 10 mM	Crecimiento en las colonias con concentraciones $1 \times 10^6$ y dos colonias en $1 \times 10^5$ esp/mL
Medio Pontecorvo y Glucosa	Peróxido 5 mM	Crecimiento solo en las colonias con concentraciones $1 \times 10^6$ y $1 \times 10^5$ esp/mL
Medio Pontecorvo y Glucosa	Peróxido 1 mM	Todas las colonias crecieron.
Medio basal de Fosfatos y Glucosa	Control	Todas las colonias crecieron.
Medio basal de Fosfatos y Glucosa	Peróxido 50 mM	Ninguna colonia creció
Medio basal de Fosfatos y Glucosa	Peróxido 20 mM	Ninguna colonia creció
Medio basal de Fosfatos y Glucosa	Peróxido 10 mM	Crecimiento en las colonias con concentraciones $1 \times 10^6$ y dos colonias en $1 \times 10^5$ esp/mL
Medio basal de Fosfatos y Glucosa	Peróxido 5 mM	Crecimiento solo en las colonias con concentraciones $1 \times 10^6$ y $1 \times 10^5$ esp/mL
Medio basal de Fosfatos y Glucosa	Peróxido 1 mM	Todas las colonias crecieron.

Con base en los resultados experimentales, se observó que no hay diferencia significativa entre el crecimiento obtenido en medio basal y el medio Pontecorvo, así mismo, en las fuentes de carbono. El crecimiento celular es similar en las muestras bajo condiciones control (Figura 15 A y 16 A).

Al utilizar glucosa como fuente de carbono en las concentraciones 50 mM y 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no hubo crecimiento, es demasiado toxico el medio para que el microorganismo se pueda desarrollar (Figura 15 B y 15 C.). Al emplear concentraciones de 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se presentó un bajo crecimiento, únicamente se observo en las concentraciones más altas de esporas (1x10<sup>6</sup> y 1x10<sup>5</sup> esp/mL) (Figura 15 D). En la concentración de 5 mM, el crecimiento obtenido es mayor, existió crecimiento casi en todas las concentraciones de esporas, a excepción de 1x10<sup>3</sup> esp/mL (Figura 15 E). Al adicionar 1mM, el crecimiento no se vio afectado, incluso se puede decir que es similar al de la muestra control (Figura 15 F).

En las placas con pectina, al adicionar concentraciones de 50 mM y 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se obtuvo crecimiento (figura 16 B y 16 C). En presencia de 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se encontró crecimiento únicamente en la concentración más alta de esporas (1x10<sup>6</sup> esp/mL) (datos no mostrados). Al emplear 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el crecimiento aun se observó afectado, obteniéndose solo en las concentraciones de 1x10<sup>6</sup> esp/mL y 1x10<sup>5</sup> esp/mL (Figura 16 D). Existió crecimiento en todas las colonias al utilizar 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 16 E).

En general al añadir concentraciones mayores de 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el microorganismo se observó gravemente dañado, por lo tanto, para el experimento en medio liquido se recomendó utilizar concentraciones de 5 mM y 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

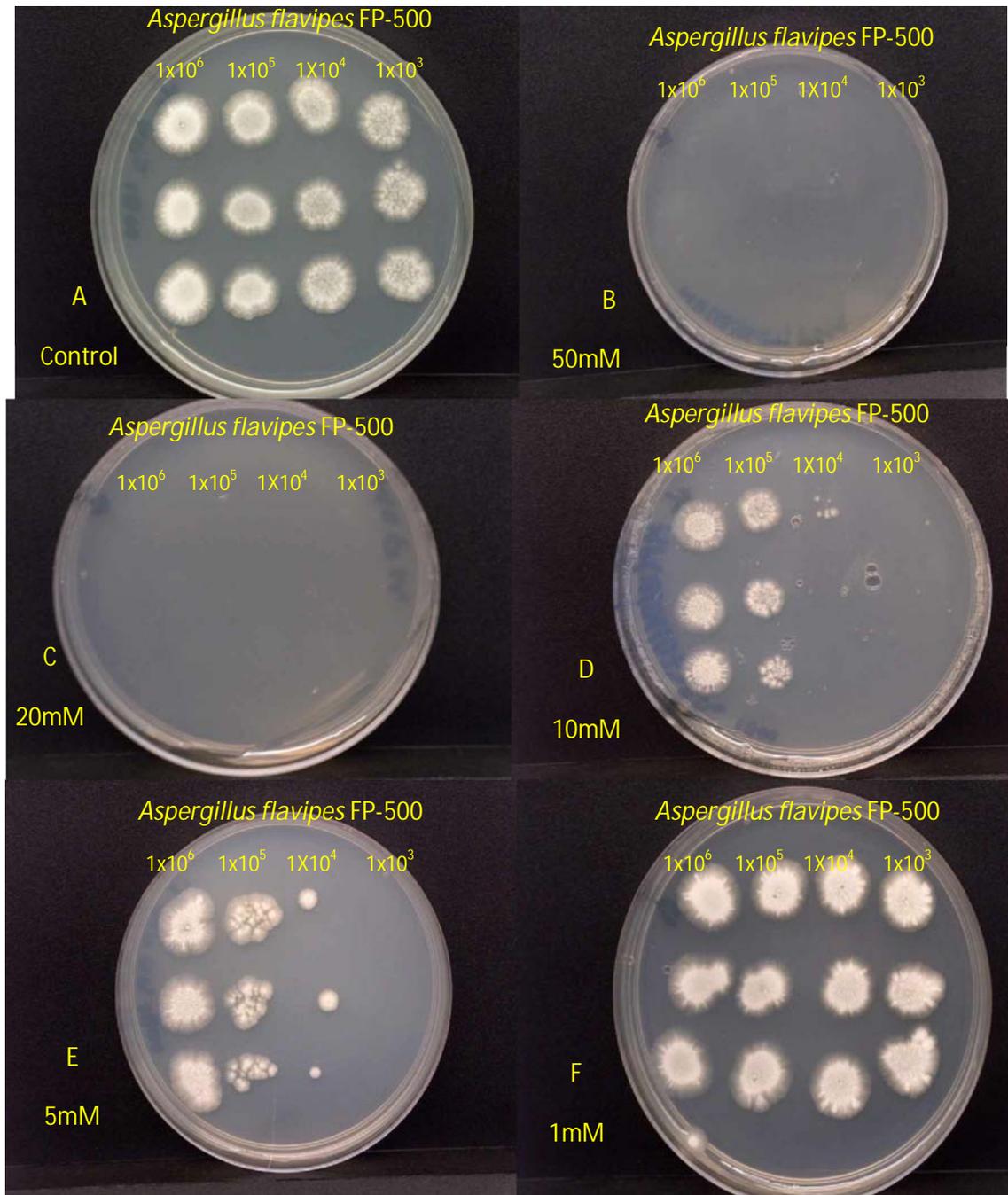


Figura 15.- Crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500 en placas de medio mineral Pontecorvo con glucosa, con un pH<sub>i</sub>4.2, inoculado con 4 diferentes concentraciones de esporas, de izquierda a derecha  $1 \times 10^6$  esp/mL,  $1 \times 10^5$  esp/mL,  $1 \times 10^4$  esp/mL y  $1 \times 10^3$  esp/mL, por triplicado. Incubado durante 5 días, a una temperatura de 37 °C. (A) No se adiciono peróxido de hidrogeno, control. (B) Adición de 50 mM de peróxido de hidrogeno. (C) Adición de 20 mM de peróxido de hidrogeno. (D) Adición de 10 mM de peróxido de hidrogeno. (E) Adición de 5 mM de peróxido de hidrogeno. (F) Adición de 1 mM de peróxido de hidrogeno.

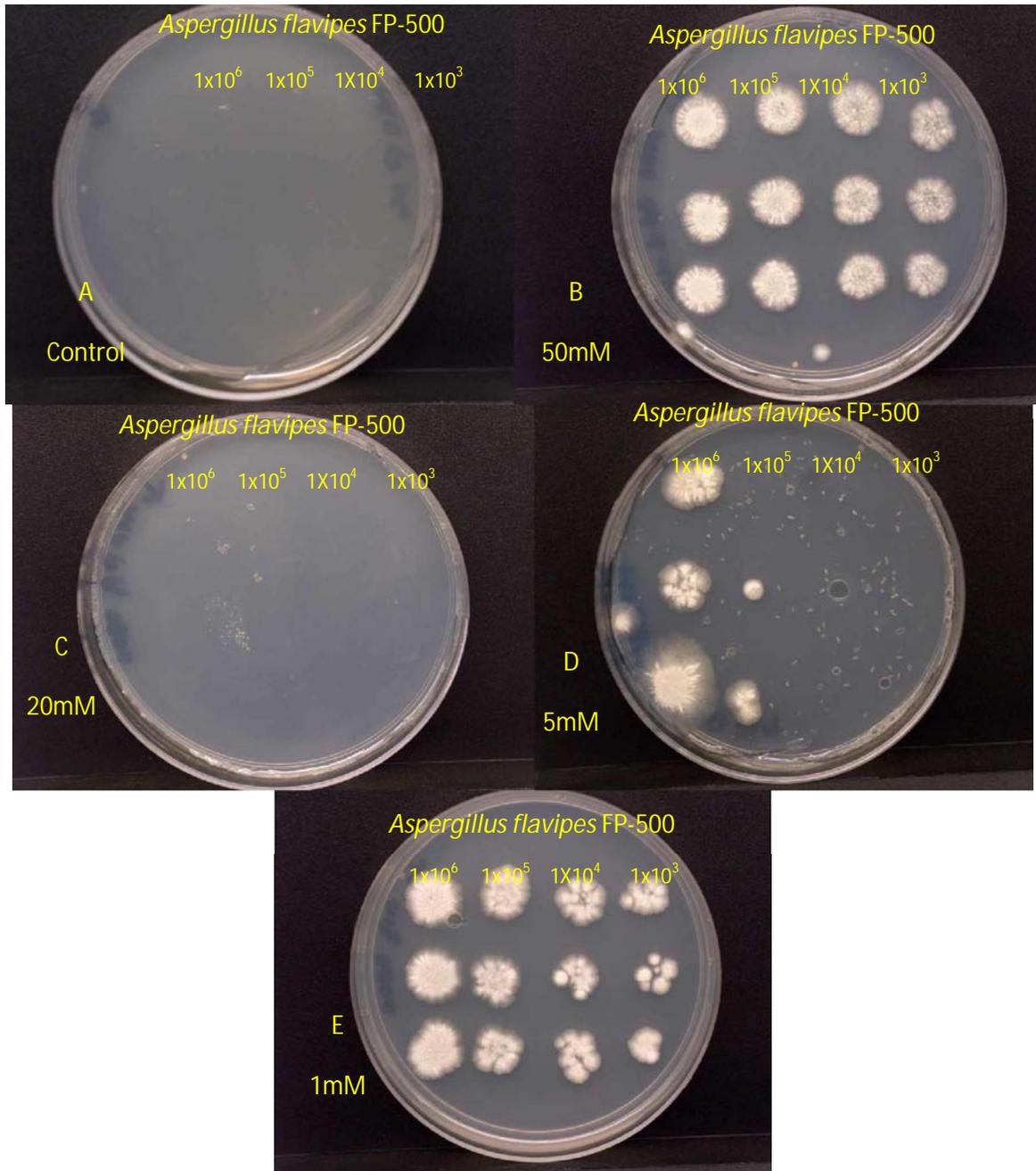


Figura 16.- Crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500 en placas de medio mineral Pontecorvo con pectina, con un pH<sub>i</sub>4.2, inoculado con 4 diferentes concentraciones de esporas, de izquierda a derecha  $1 \times 10^6$  esp/mL,  $1 \times 10^5$  esp/mL,  $1 \times 10^4$  esp/mL y  $1 \times 10^3$  esp/mL, por triplicado. Incubado durante 5 días, a una temperatura de 37 °C. (A) No se adiciono peróxido de hidrogeno, control. (B) Adición de 50 mM de peróxido de hidrogeno. (C) Adición de 20 mM de peróxido de hidrogeno. (D) Adición de 5 mM de peróxido de hidrogeno. (E) Adición de 1 mM de peróxido de hidrogeno.

### Efecto de la menadiona sobre el crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500

Se emplearon placas con medio Pontecorvo y pectina, para conocer la concentración adecuada de menadiona soluble en agua (2-Metil-1,4-naftoquinona vitamina K<sub>3</sub>). Se probaron tres diferentes concentraciones de este agente y cuatro diferentes concentraciones de esporas

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2 y en la figura 17.

Tabla 2 Resultados del crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500

Contenido de la caja	Tratamiento	Crecimiento
Medio Pontecorvo y Pectina	Control	Todas las colonias crecieron.
Medio Pontecorvo y Pectina	0.5 mM Menadiona	Todas las colonias crecieron.
Medio Pontecorvo y Pectina	1 mM Menadiona	Todas las colonias crecieron.
Medio Pontecorvo y Pectina	2 mM Menadiona	Crecimiento total en las colonias $1 \times 10^6$ y $1 \times 10^5$ esp/mL, así como dos colonias para $1 \times 10^4$ esp/mL y una colonia en $1 \times 10^3$ esp/mL

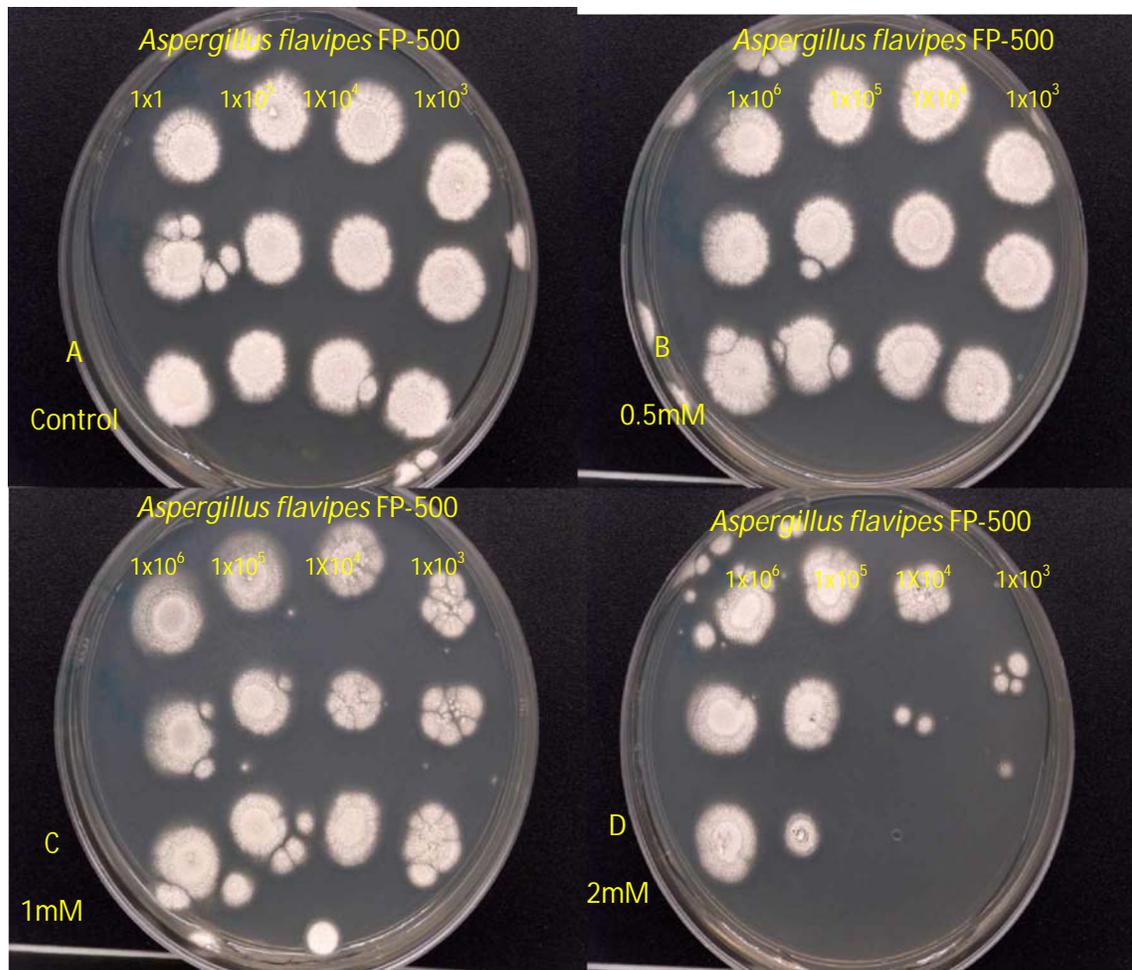


Figura 17.- Crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500 en placas de medio mineral Pontecorvo con pectin, con un pH 4.2, inoculado con 4 diferentes concentraciones de esporas, de izquierda a derecha  $1 \times 10^6$  esp/mL,  $1 \times 10^5$  esp/mL,  $1 \times 10^4$  esp/mL y  $1 \times 10^3$  esp/mL, por triplicado. Incubado durante 5 días, a una temperatura de 37 °C. (A) No se adiciono menadiona, control. (B) Adición de 0.5 mM de menadiona. (C) Adición de 1 mM de menadiona. (D) Adición de 2 mM de menadiona.

El efecto de menadiona en las placas, con concentraciones 0.5 mM y 1 mM, fue mínimo, (figura 17 B y 17C), todas las colonias crecieron. En la muestra adicionada con 2 mM, se obtuvo poco o nulo crecimiento en las concentraciones más bajas del microorganismo ( $1 \times 10^4$  esp/mL y  $1 \times 10^3$  esp/mL) (figura 17 D). Se recomendó utilizar las concentraciones 1 mM y 2mM para los experimentos en medio líquido.

### 3. Determinación del efecto del estrés oxidativo sobre *Aspergillus flavipes* FP-500

Utilizando los valores óptimos de concentraciones de los agentes oxidantes se procedió a probarlas en medio líquido, realizando una única adición de los oxidantes en diferentes tiempos de crecimiento del microorganismo ( $t_0$  y  $t_{16}$ ). Las concentraciones que se emplearon fueron: 1 mM y 5 mM de  $H_2O_2$  y 1 mM y 2 mM de menadiona. Como no existió diferencia entre los medios minerales, en los siguientes experimentos se empleó únicamente medio Pontecorvo. Las actividades pectinolíticas se midieron a lo largo de la fermentación (16 hrs, 24 hrs, 36 hrs, 48 hrs y 72 hrs) y la actividad de la catalasa al final (72 hrs).

- Crecimiento celular

El crecimiento se observó afectado por el reto oxidativo, al que fueron sometidos los cultivos. Los cultivos de *Aspergillus flavipes* FP-500 se ven afectados por el tiempo de adición, el tipo de agente oxidante y la concentración de éste, reflejándose en el escaso crecimiento de la cepa.

Al utilizar 1mM de los agentes oxidantes, las muestras tratadas con menadiona presentaron un mayor efecto del estrés oxidativo que al utilizar  $H_2O_2$ , sobre todo en aquellas muestras añadidas al  $t_0$ . Sin embargo, se observó un mínimo crecimiento en los cultivos tratados con 5 mM  $H_2O_2$ , indistintamente del tiempo de adición (figuras 18 y 19); el  $H_2O_2$  en altas concentraciones y en presencia de SOD puede generar al radical hidroxilo. Las muestras tratadas al  $t_0$ , tuvieron un crecimiento menor que aquellas tratadas a las 16 hrs (figuras 18 y 19). Al adicionar el agente oxidante a las 0 hrs, el microorganismo tiende a un crecimiento mucho más lento, en este lapso, el hongo se encuentra en espora, debe germinar y responder al estímulo al mismo tiempo, las ERO en concentraciones mayores de  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-5}$  M tienden a inhibir la germinación de las esporas. En cambio a las 16hrs el hongo ya se ha empezado a desarrollarse como micelio, el efecto del agente oxidante sobre el crecimiento celular es menor (figuras 18 y 19).

El crecimiento máximo fue a las 72 hrs, en el control fue de 4.3 mg peso seco /mL, el cultivo añadido con 1 mM  $H_2O_2$  a  $t_{16}$  su crecimiento fue de 4.2 mg peso seco/mL, mientras que 1 mM de  $H_2O_2$  a  $t_0$  fue

de 2.2 mg peso seco /mL, los cultivos con tratados con menadiona adicionados a las 16 hrs presentaron un crecimiento de 1.59 mg peso seco /mL 1 mM de menadiona y 0.82 mg peso seco /mL 2 mM de menadiona; el resto de los cultivos presentó un crecimiento mínimo, menor de 0.80 mg peso seco/mL (figura 18 y 19).

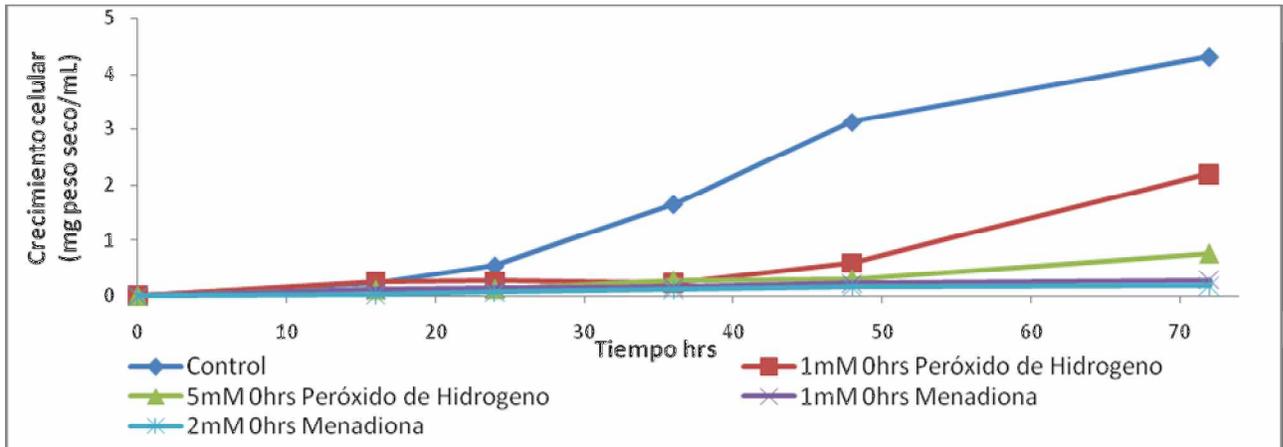


Figura 18.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_0$  sobre el crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo , incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

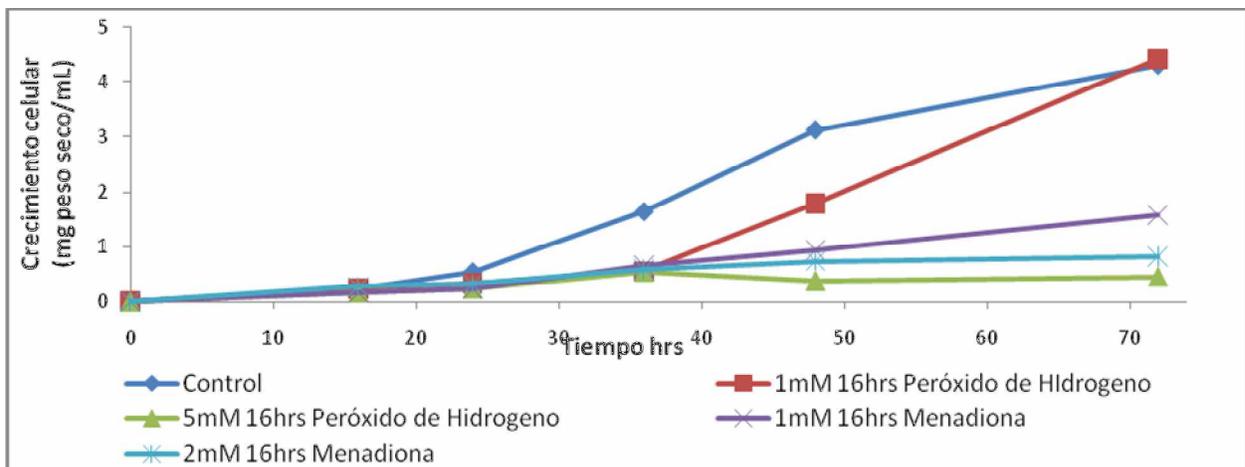


Figura 19.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_{16}$  sobre el crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

- pH

El comportamiento de pH en el cultivo de *Aspergillus flavipes* FP-500 en condiciones control, mostró un descenso a lo largo de la fermentación (figura 20). Los valores de pH para los cultivos tratados a las 0 hrs fueron diferentes entre los agentes oxidantes empleados. Los cultivos tratados con menadiona no presentaron ningún cambio de pH (figura 20). Este resultado concuerda con el obtenido en el crecimiento en peso seco, donde se obtuvo prácticamente un nulo crecimiento. En cambio los cultivos tratados con peróxido de hidrogeno mostraron un descenso de los valores de pH, de acuerdo al crecimiento presentado (figura 18).

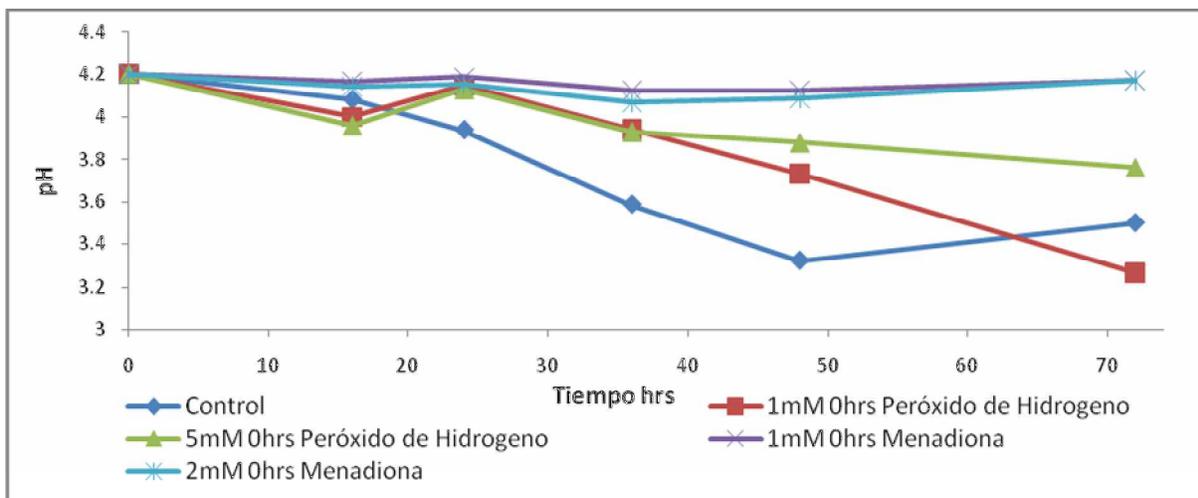


Figura 20- Evolución del pH de *Aspergillus flavipes* FP-500, tratados con peróxido de hidrogeno y menadiona a  $t_0$ . Con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y  $pH_i$  4.2

A las 16 hrs no se observó gran diferencia entre los cultivos tratados con menadiona y  $H_2O_2$ , el descenso del pH fue mayor que en las tratadas a las 0 hrs, a excepción de la muestra 1 mM de  $H_2O_2$  presentó un comportamiento muy similar al del control (figura 21). El crecimiento del microorganismo se ve relacionado con el descenso del pH, al sufrir estrés oxidativo, las funciones para su crecimiento celular son afectadas.

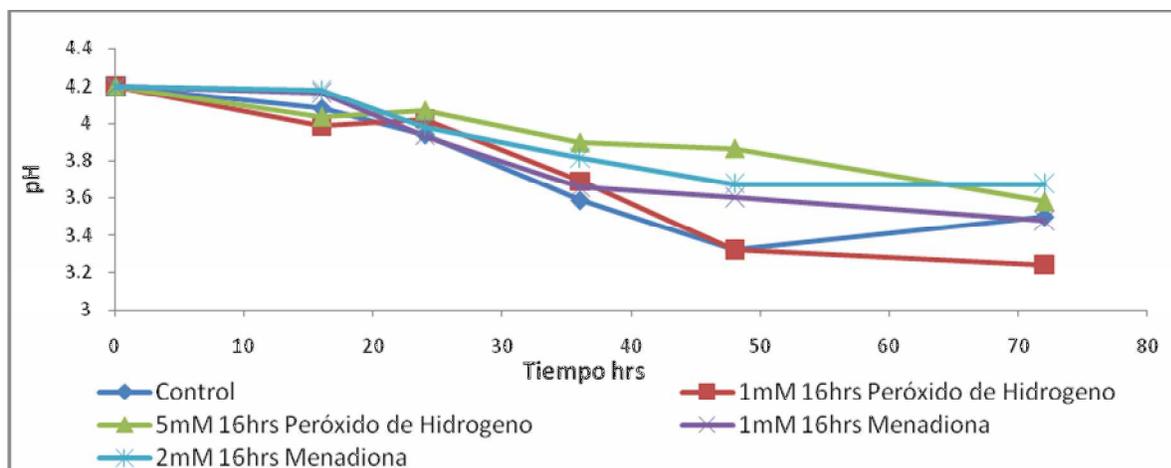


Figura 21- Evolución del pH de *Aspergillus flavipes* FP-500, tratados con peróxido de hidrogeno y menadiona a  $t_{16}$ . Con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2

- Azúcares reductores

La pectina está conformada principalmente por ácido D-galacturónico, el cual es un azúcar reductor. Cuando la pectina es degradada, la concentración de azúcares reductores aumenta y a medida que se utilizan por el microorganismo para el crecimiento, va disminuyendo la concentración de azúcares reductores. *Aspergillus flavipes* FP-500, en condiciones control, mostró una cinética en forma de campana (figura 22 y 23), al principio de la fermentación el sustrato se encuentra completo, obteniéndose valores bajos de azúcares reductores, conforme transcurre el tiempo la velocidad de degradación del sustrato es mayor que la velocidad de consumo por lo que se observa una acumulación de productos de degradación. Después de este punto de la fermentación la velocidad de consumo de sustrato es mucho mayor que la velocidad de degradación, obteniéndose menor cantidad de azúcares reductores, siendo la pendiente negativa de la campana. El comportamiento del microorganismo cambia dependiendo del tiempo de adición del agente oxidante así como de la concentración de éste.

Las muestras tratadas a las 0 hrs, presentaron diferencia en su comportamiento, dependiendo del agente oxidante utilizado, aquellas tratadas con menadiona, la concentración de azúcares reductores es alta, es decir la velocidad de degradación de sustrato a lo largo de la fermentación es siempre mayor a la velocidad de consumo (figura 22). En cambio las muestras tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentan un comportamiento diferente, debido a que la concentración de azúcares reductores es casi constante, en la muestra 1 mM la velocidad de degradación es mayor que la velocidad de consumo, la concentración

de azúcares no es tan alta como en el caso de menadiona, por tanto sabemos que el hongo estuvo consumiendo al sustrato, pero a una velocidad más lenta que la control, por eso obtenemos un crecimiento mucho menor (figura 18); en el caso de 5 mM hay una lenta liberación de azúcares que prácticamente no se consumen dado el escaso crecimiento obtenido (figura 22).

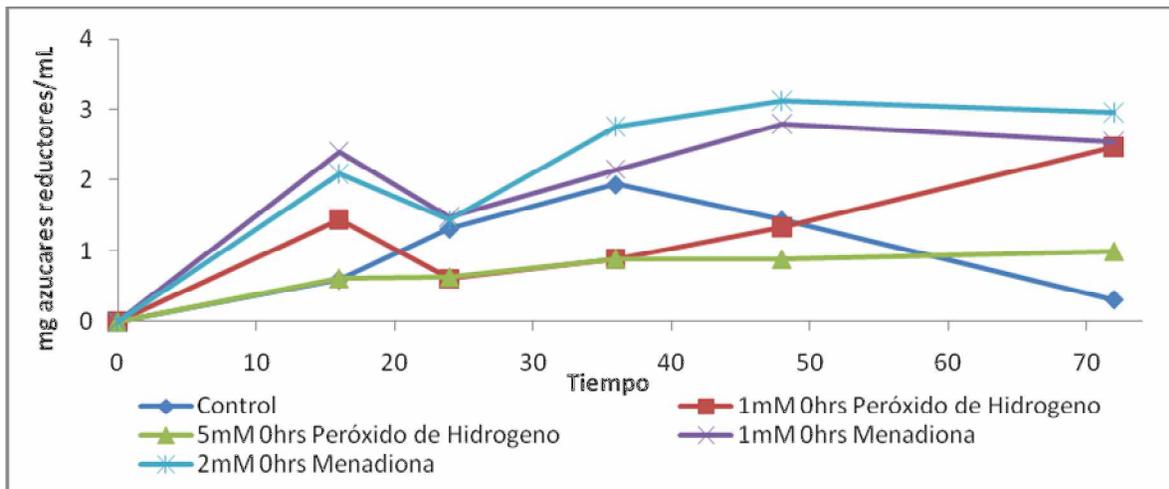


Figura 22.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_0$  sobre la producción de azúcares reductores de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH, 4.2.

A las 16 hrs los cultivos tuvieron un comportamiento similar al testigo, sin embargo, se observó una meseta entre las 16 hrs y las 24hrs, después de este punto las concentraciones de azúcares reductores fueron diferentes entre los cultivos (figura 23), la diferencia en la concentración de azúcares reductores depende de la velocidad de crecimiento del microorganismo. En la muestra tratada con 5 mM de  $H_2O_2$  se observó una velocidad de degradación mayor que la velocidad de consumo de sustrato (figura 23).

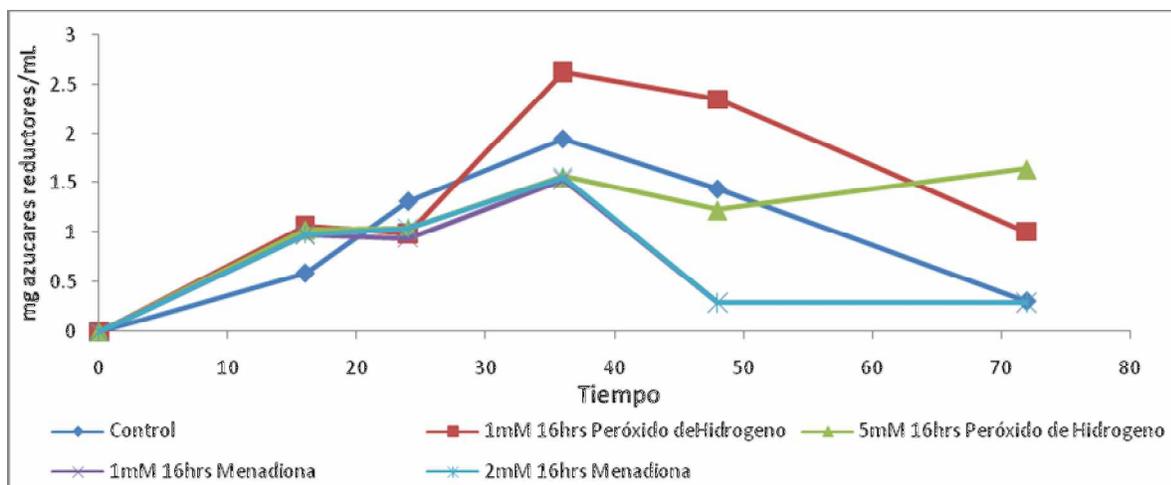


Figura 23.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_{16}$  sobre la producción de azúcares reductores de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

- Exo-pectinasas

La actividad de las exo-pectinasas se inició a partir de las 16 hrs, en todos los cultivos se observó una actividad similar hasta las 36hrs, el efectos de los oxidantes fue notorio en las muestras tratadas al  $t_0$  ya que la actividad se mantuvo constante a diferencia de la muestra control, la cual comenzó a incrementarse (figura 24); las muestras adicionadas al  $t_{16}$  muestran una actividad mayor que las del  $t_0$  pero aun así menor que las del control (figura 25), la actividad máxima se obtuvo a las 72hrs, ésta fue de 22.37 U/mL control, 6.76 U/mL 1 mM de  $H_2O_2$  a  $t_0$ , 14.89 U/mL 1 mM de  $H_2O_2$  a  $t_{16}$ , 8.15 U/mL 1 mM de menadiona a  $t_{16}$ , 8.91 U/mL 2 mM de menadiona a  $t_{16}$ , el resto de los cultivos presento una actividad menor a 4 U/mL (figura 24 y 25).

Las muestras tratadas a las 0 hrs, presentaron una disminución en su actividad a lo largo de la fermentación, el efecto de los agentes oxidantes en este lapso fue notable, el microorganismo se debió adaptar a un medio altamente toxico desde que se encuentra en forma de espora, afectando todas sus funciones celulares y reflejándose en un bajo crecimiento y una baja actividad exo-pectinasa (figura 24).

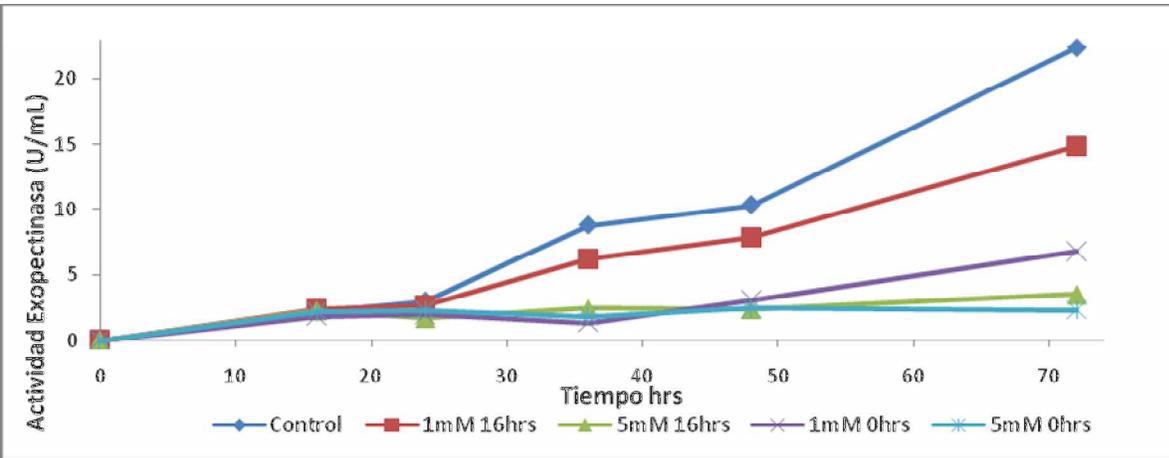


Figura 24.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_0$  sobre la actividad exo-pectinasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo , incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

La actividad de esta enzima se observó disminuida al utilizar los agentes oxidantes. La respuesta ante el estímulo, fue más eficiente cuando el microorganismo se ha desarrollado a micelio, causando un efecto menor que al tiempo cero, sin embargo, al emplear una concentración alta de oxidante el microorganismo no logro recuperarse del reto oxidativo al que fue expuesto. Al utilizar concentraciones como 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 25) la actividad fue muy baja y constante, concuerda con el escaso crecimiento presentado.

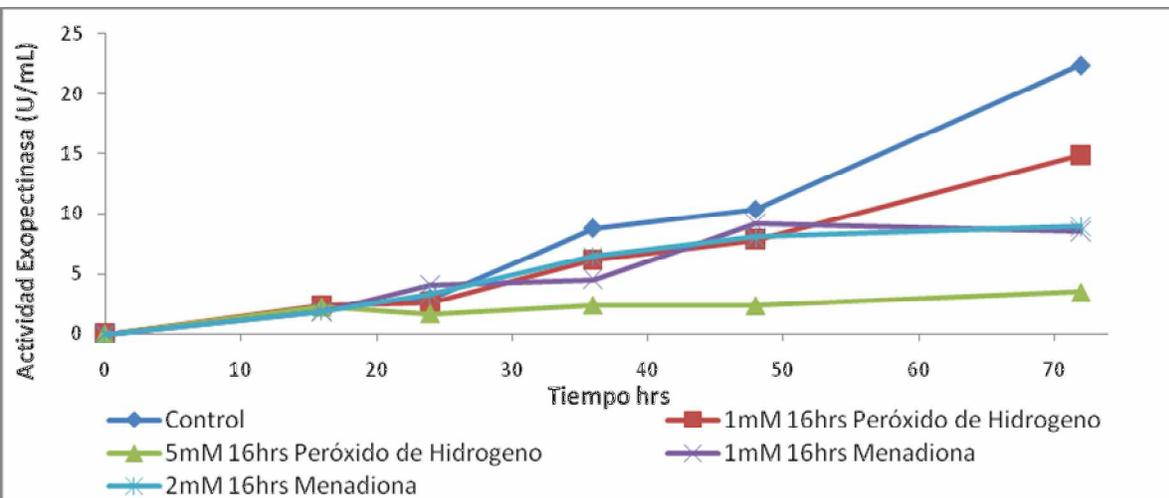


Figura 25.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_{16}$  sobre la actividad exo-pectinasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

Dado que el crecimiento se vio afectado por la adición de agentes oxidantes, se calculo la actividad específica, dividiendo la actividad volumétrica obtenida entre el crecimiento correspondiente.

Al calcular la actividad específica de estas enzimas se observó que las muestras tratadas a las 0 hrs, mostraron valores ligeramente mayores al control; a excepción de 2 mM de menadiona donde a las 16 hrs su actividad fue de 126.82 U/mg peso seco, siendo mucho mayor que la de cualquier otro cultivo y la muestra control (figura 26).

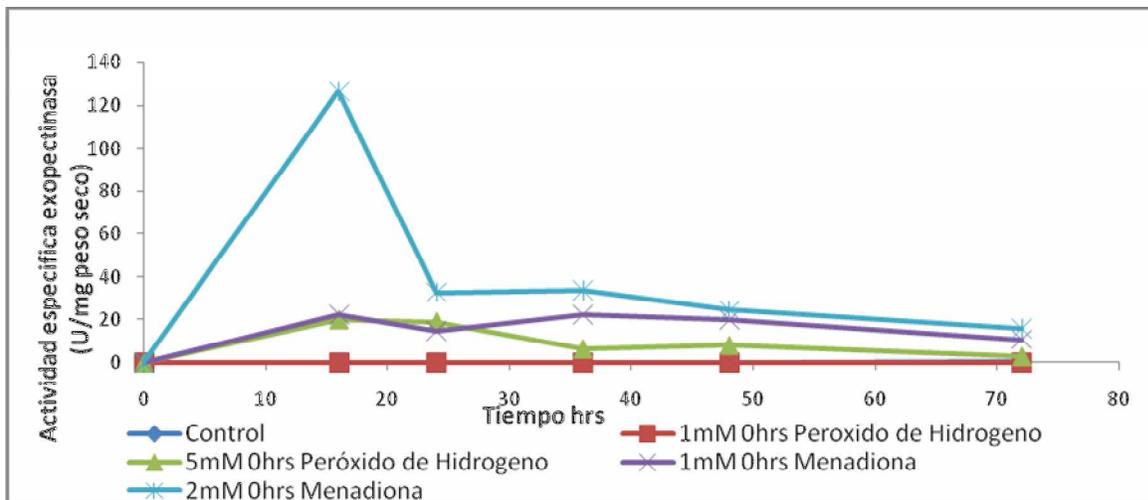


Figura 26.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_0$  sobre la actividad específica exo-pectinasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo , incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2

En las muestras tratadas a las 16 hrs se observó una actividad mayor al del control, su comportamiento entre ellas fue similar, siendo mayor al principio de la fermentación y después disminuye, con excepción de 2 mM de menadiona la cual aumenta y después de las 24 hrs se mantuvo constante (figura 27).

Las muestras adicionadas de oxidantes al tiempo cero sufrieron un efecto más notorio que las tratadas alas 16 hrs, presentando una menor concentración de células debido a los problemas que presento la cepa al germinar en el medio.

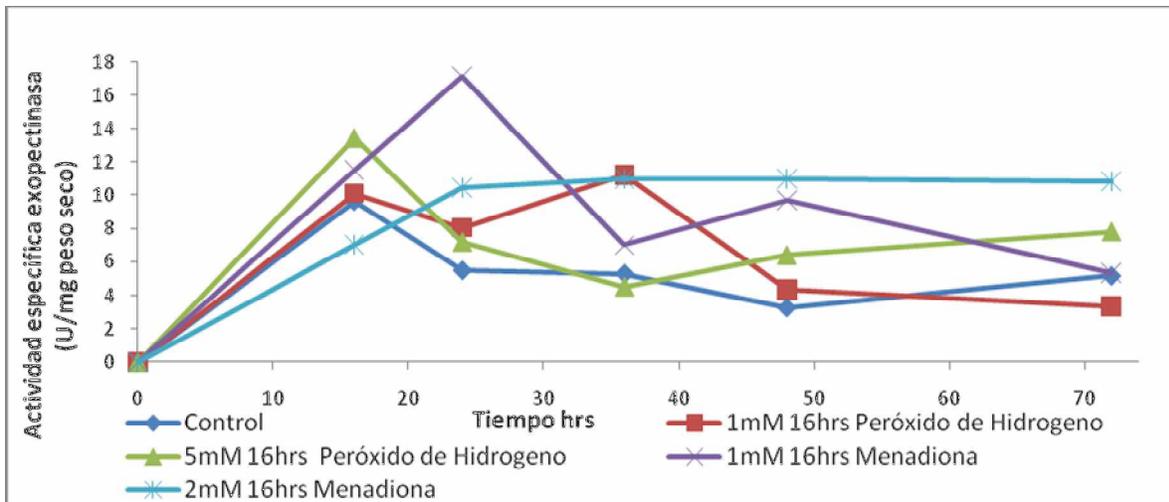


Figura 27.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_{16}$  sobre la actividad específica de la enzima exo-pectinasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH 4.2.

- Endo-pectinasas

La actividad de las endo-pectinasas se observó afectada por la adición de los agentes oxidantes. En especial al emplear menadiona, se obtuvieron valores tan bajos en su actividad que en algunos casos se considero nula. La actividad de esta enzima en condiciones control comenzó a partir de las 48hrs y se incremento, en los cultivos tratados prácticamente se detecto actividad baja (figura 28 y 29), con excepción del cultivo tratado con 1 mM de  $H_2O_2$  a  $t_{16}$  el cual obtuvo una actividad menor que la control, pero un comportamiento similar.

Los datos obtenidos a las 72hrs fueron de 2.11 U/mL el control, 1.47 U/mL 1 mM de  $H_2O_2$  a  $t_{16}$ , el resto de los cultivos presento una minima actividad menor de 0.25 U/mL, no hubo actividad en el cultivo tratado con 2 mM menadiona adicionado a  $t_0$  (figura 28 y 29).

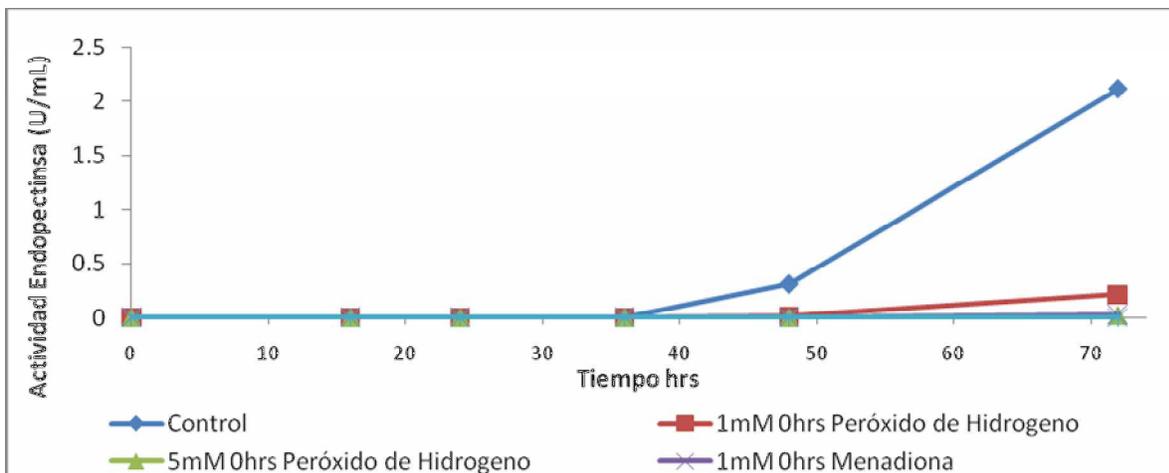


Figura 28.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_0$  sobre la actividad de endo-pectinasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

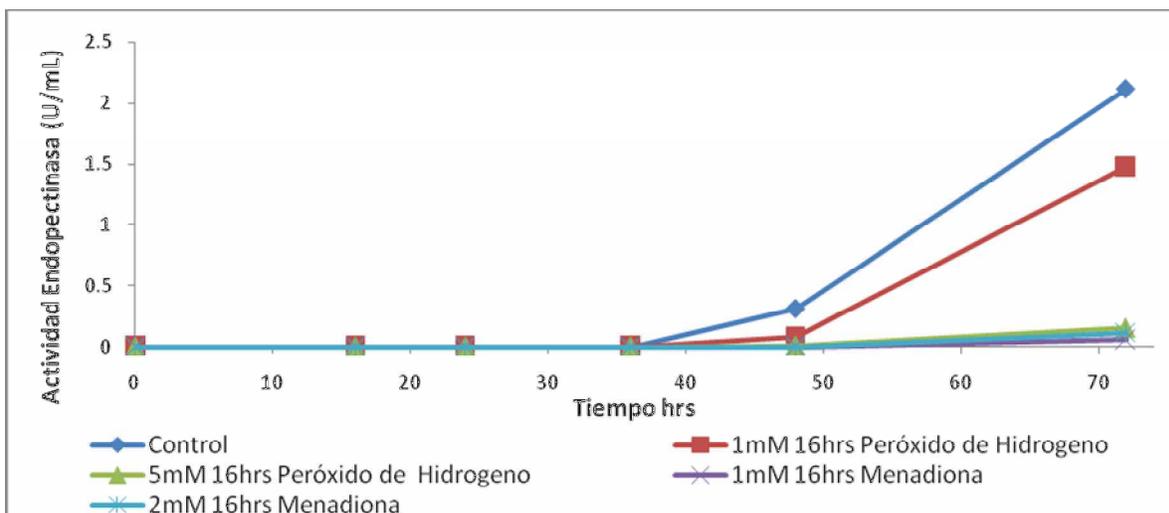


Figura 29.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_{16}$  sobre la actividad de endo-pectinasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

Al calcular la actividad específica de las endo-pectinasas, se observó que las muestras tratadas al  $t_{16}$  presentaron mayor actividad que las adicionadas al  $t_0$ , sobre todo en los cultivos añadidos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los cultivos que fueron tratadas con menadiona obtuvieron una actividad baja y en el caso de 2 mM al  $t_0$  la actividad fue nula, estos cultivos casi no emplearon a las endo-pectinasas, para degradar la pectina (figura 30 y 31).

Los valores más altos se obtuvieron a las 72 hrs, estos fueron de 0.49 U/mg peso seco en el control, 0.33 U/mg peso seco para 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado a t<sub>16</sub> y para 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado a t<sub>16</sub>, 0.13U/mg peso seco 2 mM de menadiona al t<sub>16</sub>, el resto de los cultivos presentaron una mínima actividad específica de 0.01 U/mg peso seco (figura 30 y 31). Es más fácil para el microorganismo responder ante el estrés oxidativo, una vez que sus esporas han germinado.

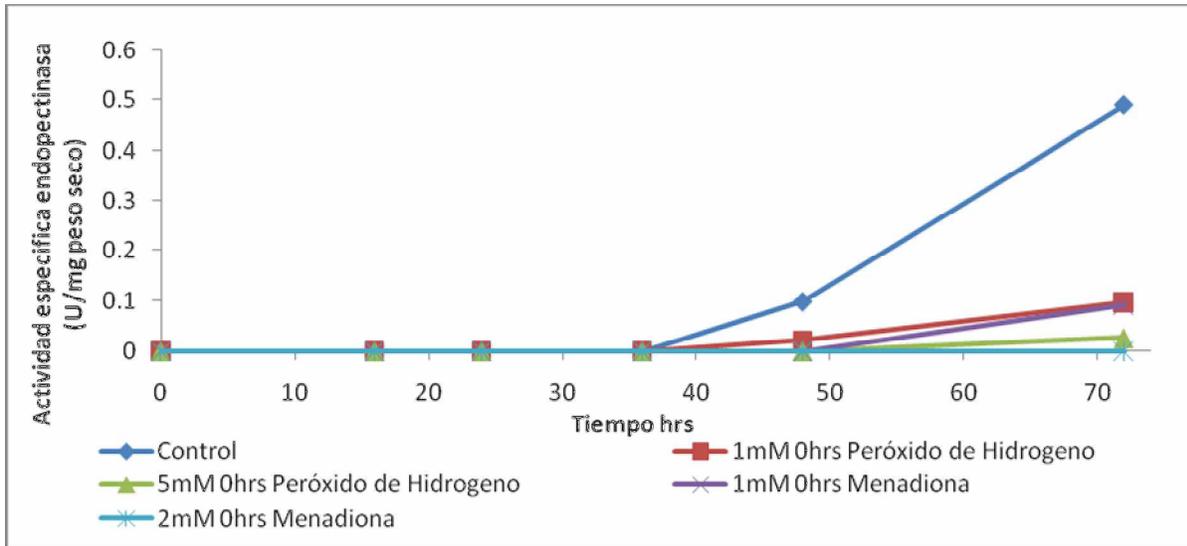


Figura 30.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a t<sub>0</sub> sobre la actividad específica de endo-pectinasa de los cultivos de *Aspergillus flavipes* FP-500, creciendo con fuente de carbono pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

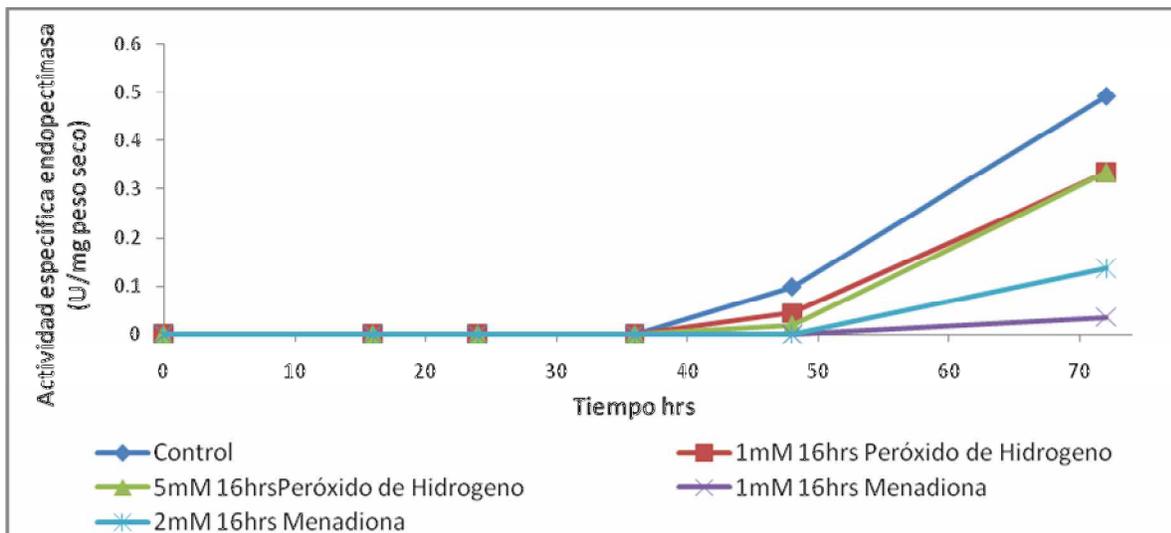


Figura 31.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a t<sub>16</sub> sobre la actividad específica de endo-pectinasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

- Pectin liasas

La actividad de las pectin liasas en condiciones control comenzó a ascender a partir de las 48hrs. En los cultivos a  $t_0$  la actividad se matuvo casi constantes, en valores menores a 10 U/mL. La muestra con 2 mM de menadiona presento un comportamiento erratico, en determinados puntos de la fermentación se observaron valores sumamente altos, y despues deciendo a valores nulos (figura 32).

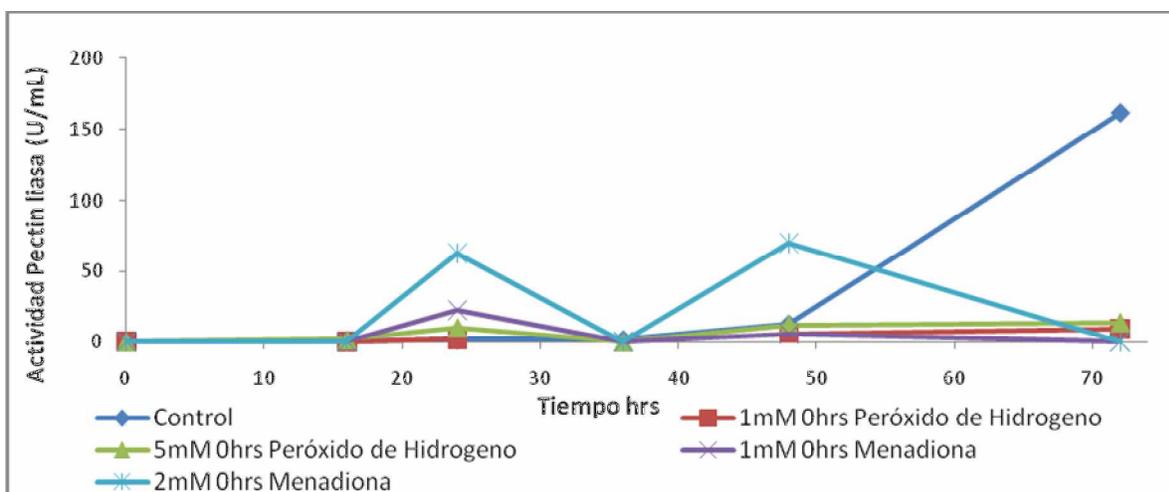


Figura 32.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_0$  sobre la actividad pectin liasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo , incubado a 37 °C, 200 rpm y pH 4.2.

A las 16hrs el cultivo adicionado con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentó un comportamiento muy similar al del control, pero con menor actividad. Las muestras tratadas con 5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y menadiona obtuvieron una actividad mayor al del control al principio de la fermentación, de las 24 hrs a las 48hrs, pero cuando la actividad en el control se incrementó, hasta 161.7 U/mL, las actividades de éstas muestras permanecieron constantes en 50 U/mL , quedandose rezagadas. La actividad de la muestra 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 72hrs fue 81.4 U/mL (figura 33).

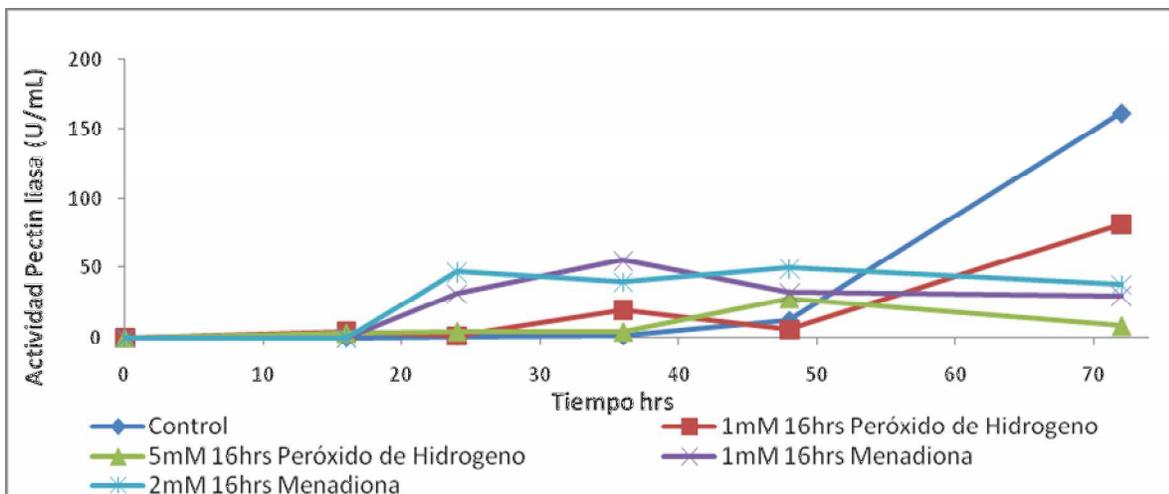


Figura 33.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_0$  sobre la actividad pectin liasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

La actividad específica de las pectin liasas (figura 34 y 35), los cultivos tratados con menadiona y 5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al  $t_0$  y  $t_{16}$ , mostraron un comportamiento errático, las variaciones que presentaron fueron muy drásticas. En cambio las muestras adicionadas con 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al  $t_0$  y  $t_{16}$ , se encontró un comportamiento similar al control, pero con actividades menores, en especial a  $t_0$  (figura 34 y 35).

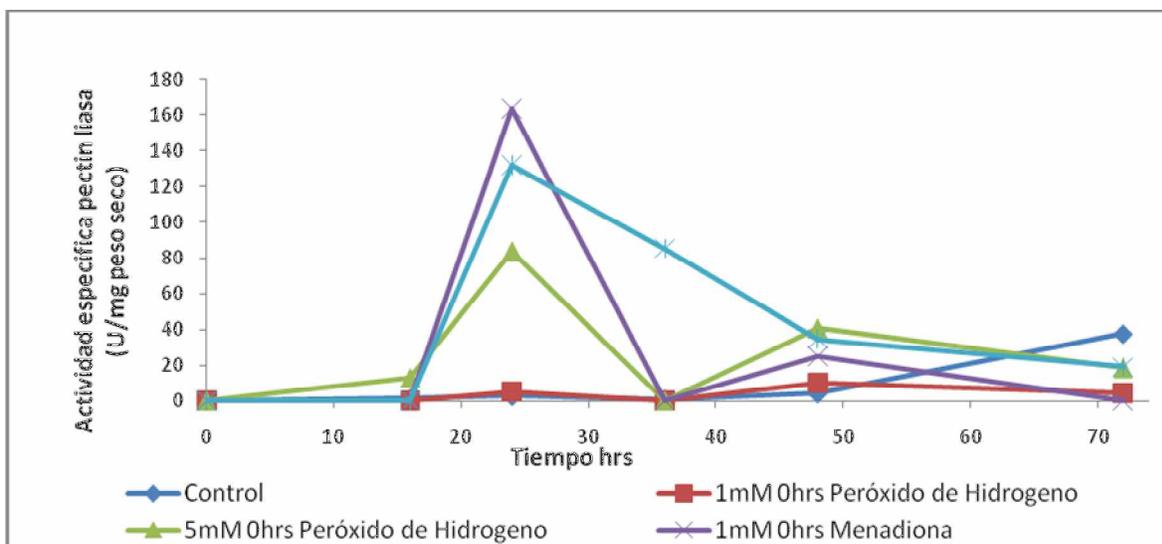


Figura 34.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_{16}$  sobre la actividad específica de pectin liasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

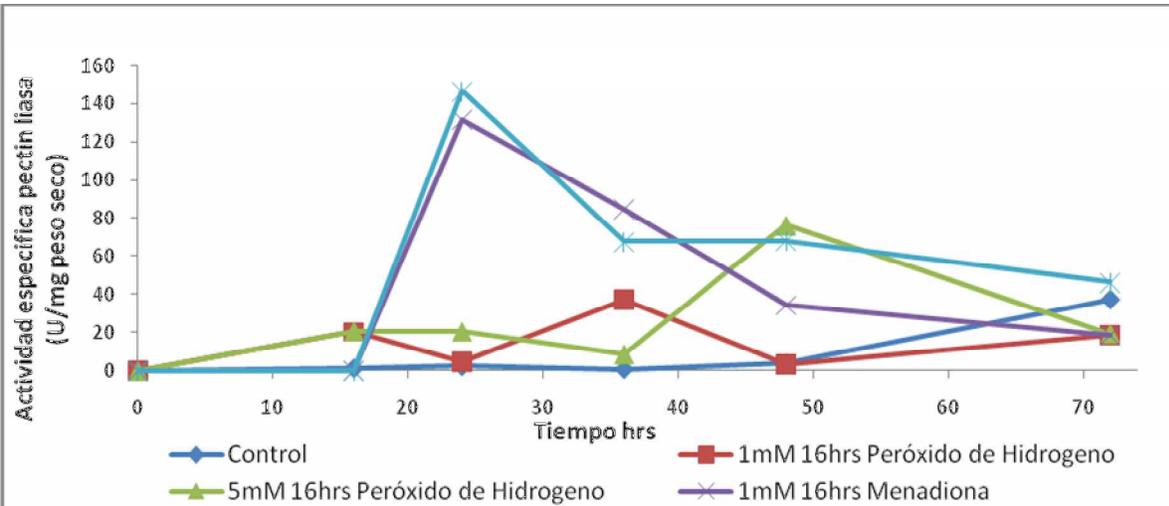


Figura 35.- Efecto de la adición de peróxido de hidrogeno y la menadiona a  $t_{16}$  sobre la actividad específica de pectin liasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina y medio Pontecorvo, incubado a 37 °C, 200 rpm y pH<sub>i</sub> 4.2.

- Catalasas

Al generar estrés oxidativo, el microorganismo tuvo que reaccionar rápidamente para evitar el daño celular, fue necesario aumentar las especies antioxidantes con el fin de contrarrestar los prooxidantes del medio. Se obtuvo un incremento en la actividad de la catalasa, perteneciente al sistema antioxidante, al exponer a los cultivos ante los agentes oxidantes; sin embargo, es importante considerar el modo de acción del agente oxidante, la concentración de éste y el tiempo de adición.

La actividad específica de las catalasas se realizó al final de la fermentación y dio indicios del estrés oxidativo que sufrieron los cultivos. Las muestras analizadas fueron 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 0hrs y 16hrs, 1mM y 2mM de menadiona a las 16hrs. Los datos obtenidos fueron 0.25 U/mg peso seco en el control, 1.40U/mg peso seco en 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a  $t_0$ , 0.23U/mg peso seco en 1 mM a  $t_{16}$ , 0.78 U/mg peso seco en 1 mM de menadiona a  $t_{16}$  y 4.9 U/mg peso seco en 2 mM de menadiona a  $t_{16}$  (figura 36).

La cepa tratada con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a  $t_{16}$ , logro obtener el equilibrio entre los prooxidantes y antioxidantes, recuperándose del estrés oxidativo sufrido, el valor de la catalasa fue similar al del control y el crecimiento celular a las 72 hrs es el mismo (figura 19 y 36). En cambio en la muestra 1 mM

de  $H_2O_2$  a  $t_0$ , el desequilibrio de los prooxidantes fue notorio ya que la actividad específica de la catalasa fue 5 veces mayor al del control, además a lo largo de la fermentación presentó un crecimiento menor (figura 18 y 36). Los cultivos adicionados con menadiona tuvieron una actividad específica de catalasa mayor que la del control, la muestra 2 mM de menadiona a  $t_{16}$  fue 20 veces mayor que el control, mientras que la adicionada con 1 mM de menadiona a  $t_{16}$  fue 3 veces mayor el control, este resultado fue consistente con el bajo crecimiento que presentaron estas muestras (figura 19 y 36), indicando que las células aun se encontraban sufriendo estrés oxidativo.

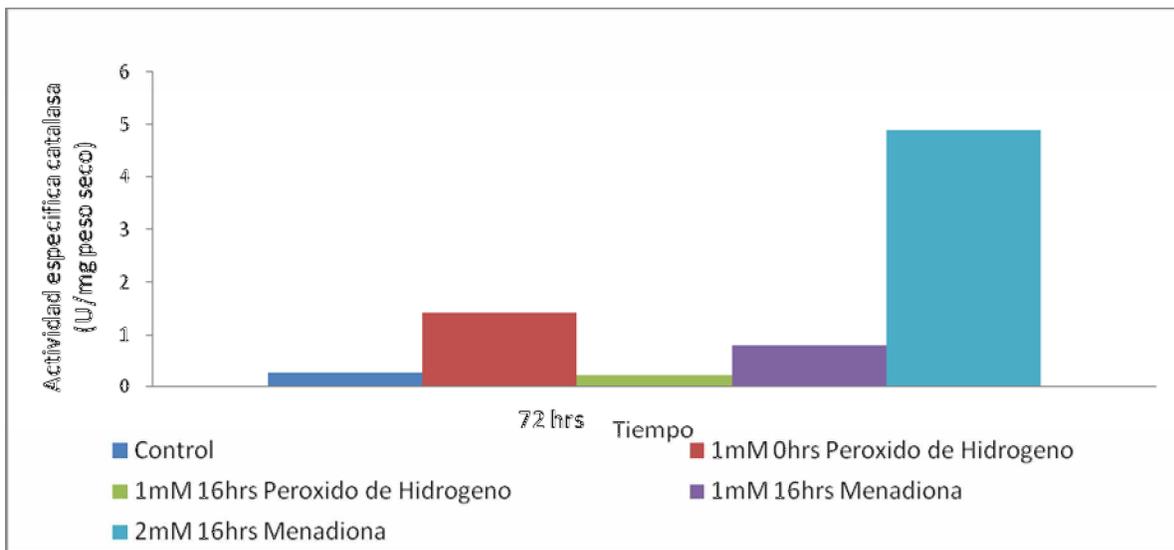


Figura 36.- Efecto del peróxido de hidrogeno y la menadiona sobre la actividad específica de la catalasa de *Aspergillus flavipes* FP-500, con pectina al 1 %, medio Pontecorvo, incubar a 37 °C, 200 rpm y pH, 4.2.

Los agentes oxidantes empleados, actúan de diferente forma en el microorganismo. El efecto oxidativo que tuvo la menadiona sobre las células fue mayor que el del peróxido de hidrogeno, este último solo fomenta la producción de la catalasa, debido, a que ésta se encarga específicamente de eliminar al peróxido de hidrogeno, en cambio la menadiona actúa sobre la célula en la cadena respiratoria, a través del ciclo de reducción de un solo electrón, empleando NAD(P)H para generar dos radicales de superóxido, o también puede actuar sobre la superficie de la mitocondria, generando poros y permitiendo la salida de todas las especies reactivas del oxígeno así como del nitrógeno (superóxido, peróxido de hidrogeno, el radical hidroxilo, oxido nítrico y peróxinitrito), incrementando la cantidad de prooxidantes en la célula. Las muestras tratadas con concentraciones de 1mM y 2mM de menadiona,

presentaron un crecimiento menor y una disminución en las actividades pectinolíticas que las tratadas con 1mM de peróxido de hidrogeno.

El tiempo de adición del oxidante fue muy importante debido a que a las 0 hrs el microorganismo se encontraba como espora y necesitó germinar en presencia de prooxidantes, sin embargo, en los cultivos con altas concentraciones de ERO se inhibió la germinación. La respuesta fue más favorable para el microorganismo cuando este ya ha comenzado a germinar. Las muestras en general tratadas a las 0 hrs presentaron bajos crecimientos celulares y disminución en las actividades pectinolíticas.

La toxicidad de alguna sustancia se relaciona con su concentración, por eso, en altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (como 5mM), se puede generar otras especies de ERO, debido a la reducción de los iones pertenecientes al sitio activo de la SOD se produce el radical hidroxilo. La actividad específica de la catalasa en 2 mM de menadiona es 6 veces mayor que en 1 mM de menadiona. En estos cultivos el crecimiento se observó disminuido así como las actividades pectinolíticas.

Las actividades pectinolíticas se vieron disminuidas al emplear los agentes oxidantes, a excepción de las pectin liasas, en donde el comportamiento presentado fue errático. La actividad más afectada, al emplear los agentes oxidantes, fue la de las endo-pectinasas, obteniéndose una mínima actividad en las muestras tratadas con una baja concentración y adicionadas a las 16 hrs (1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t<sub>16</sub>, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t<sub>0</sub>, 1 mM de menadiona t<sub>16</sub> y 2 mM de menadiona t<sub>16</sub>) y nula al emplear altas concentraciones y adicionadas al t<sub>0</sub> (5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t<sub>0</sub>, 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t<sub>16</sub>, 1 mM de menadiona t<sub>0</sub> 2 mM de menadiona t<sub>0</sub>). Las exo-pectinasas presentaron una actividad baja, a lo largo del crecimiento, con ligeros aumentos en la actividad; en las muestras adicionadas a las 0 hrs su comportamiento fue casi constante y menor en las muestras tratadas con menadiona. Las adicionadas a las 16 hrs presentaron una actividad mayor que las anteriores, pero menor que el control.

## Conclusiones

- Se logró inducir estrés oxidativo sobre *Aspergillus flavipes* FP-500, el cual se manifestó por la inhibición del crecimiento así como por la reducción en la producción de pectinasas y un aumento en la producción de catalasa.
- El efecto de la adición de agentes oxidantes al inicio del ciclo de crecimiento de *Aspergillus flavipes* FP500 es mayor que cuando estos agentes son adicionados después de la etapa de germinación. Aparentemente, el estrés oxidativo producido por los agentes oxidantes añadidos desde el principio, afecta negativamente la germinación.
- Ambos agentes fueron capaces de causar estrés oxidativo pero *Aspergillus flavipes* FP-500 mostro mayor sensibilidad a la menadiona en bajas concentraciones (1-2mM) y el peróxido causo una respuesta más intensa a una concentración de 5mM.
- La producción de catalasas se observo incrementada al someter al microorganismo a condiciones de estrés oxidativo con peróxido y menadiona. La actividad de esta enzima se encontró únicamente en la fracción intra-celular.
- El microorganismo logró recuperar los niveles de crecimiento y producción de actividad pectinolítica y de catalasa similares al control después de ser sometido a estrés oxidativo ( p. ej. 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado a las 16 hrs) lo que demuestra que estas condiciones de inducción de estrés fueron adecuadas para determinar su efecto en la producción de las enzimas evaluadas.

## Bibliografía

1. Aguirre J., Rios-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W., Reactive oxygen and development in microbial eukaryotes, *TRENDS in Microbiology* 13 (2005) 111-118.
2. Aver yanov A. A., Lapikova V. P., Pasechnik T.D., Kuznetsov V. V., Baker C. J., Suppression of early stages of fungus development by hydrogen peroxide at low concentrations, *Plant Pathology Journal* 6 (2007) 242-247.
3. Angelova M. B., Pashova S. B., Slokoska L. S., Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus niger* cells, *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2000) 544-549.
4. Bai Z., Harvey L. M., McNeil B., Elevated temperature effects on the oxidant/antioxidant balance in submerged batch cultures of filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D., *Biotechnology and Bioengineering* 83 (2003) 772-779.
5. Calera J. A., Sanchez-Weatherby, López-Medrano R., Leal F., Distinctive properties of the catalase B of *Aspergillus nidulan*, *Federation of European Biochemical Societies* 475 (2000) 117-120.
6. Criddle D.N., Barrow S., Chavanov M., Passmore S., chimje E.C., Jaffar M., Baumgartner-Wilson H.K., Gillies S., Gerasimenko O.V., Tepikin A.V., Petersen O.H. and Sutton R., Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells, *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2006) 40485-40492.
7. Fennema O. R., *Química de los alimentos*, Zaragoza, España: ACRIBIA S.A. (1993), pp141-142.

8. Fujii T., Amachi S., Ko H., Fujiwara H., Ohno N., Shinoyama H. and Yokoyama Y., Inducible Production of alcohol oxidase and catalase in a pectin medium by *Thermoascus auranticus* IFO 31693, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(2005) 290-292.
9. Fujii T., Shinoyama H., Tokusige Y., Urakami T. and Wang H., Purification of thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus auranticus*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85 (1998) 169-173.
10. Gupta R., Saxena S., Singh R., Microbial pectinolytic enzymes: A review., *Process Biochemistry* 40 (2005) 2931-2944.
11. Hansberg W., Diaz A., Muñoz-Clares R. A., Rangel P., Valdes V. J., Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen, *Biochimie* 87 (2005) 205-214.
12. Hisada H., Hata Y., Kawato A., Abe Y. and Akita O., Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 562-568 (2005).
13. Karp G., Cell and molecular biology concepts and experiments, Fourth edition, (2005), John Wiley and sons, Inc., pp 273-275.
14. Knox J.P., Williats W.G.T., McCartney L., Mackie W., Pectin: cell biology and prospects for functional analysis, *Plant Molecular Biology* 47 (2001) 9-27
15. Kreiner M., Harvey L. M. and McNeil, B., Oxidative stress response of a recombinant *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition., *Enzyme and Microbial Technology* 30 (2002) 346-353

16. Krishanmorthy K. V., Methods in cell wall cytochemistry, CRC Press (1999), pp 2-8.
17. Lizasoain I., Moro M.A., Almeida A., Bolaños J.P., Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke, *Free Radical Biology & Medicine* 39 (2005) 1292-1304.
18. Mandigan M. T., Martinko J.M., Parker J., Brock. *Biología de los microorganismos*, Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A.,(2000) pp 958-959.
19. Mathews C. K., Vanholde K.E., Ahern K.G., *Bioquímica*, Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A., (2002), pp 618-620.
20. McBride A.G., Borutaité GV., Brown G.C., Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death, *biochimica et Biophysica Acta* 1454 (1999) 275-288.
21. McNeil B., Harvey L. M., Kreiner M., "Oxidative stress"Response in submerged cultures of a recombinant *Aspergillus niger* (B1-D), *Biotechnology and bioengineering* 70 (2000) 662-669.
22. McNeil B., Harvey L. M., Kreiner M., Morphological and enzymatic response of a recombinant *Aspergillus niger* to oxidative stressors in chemostat cultures, *Journal of Biotechnology* 100 (2003) 251-260.
23. Miller GL, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analityc Chemistry*. 31 (1956) 426-428
24. Odunfa S. A., Fawole O.B., Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*, *International Biodeterioration and Biodegradation* 52 (2003) 223-227.
25. Panda T., Naraya Naidu G. S., Performance of pectinolytic enzymes during hydrolysis of pectin substances under assay conditions: a statistical approach, *Enzyme and Microbial Technology* 25 (1999)116-124.

26. Pócsi I., Emri T. and Szentirmai A., Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*, *Free Radical Biology & Medicine* 23(1997) 809-814.
27. Robertis, E.D.P. *Biología celular y molecular*, Argentina: El Ateneo 1999, pp 247-248.
28. Sies H., Montford von C., Gerber P.A., Abdelmohsen K., Buchczyk D.P., Ale-Agha N., Patak P., Klotz L.O., 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K<sub>3</sub>, decreases Gap-Junctional intracellular communication via activation of epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade, *Cancer Research* 62 (2002) 4922-4928.
29. Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L., *Introducción a la microbiología*, Zaragoza, España, ACRIBIA, S.A., (1993), pp 149-151.
30. Visser J., Veenhuis M. and Witteveen C. F.B., Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*, *American Society for Microbiology*, 58 (1992) 1190-1194.
31. Vries de R. P. and Visser J., *Aspergillus* Enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides, *Microbiology and Molecular Biology reviews* 65 (2001) 497-522.
32. Vries de R.P., Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production, *Application Microbiology Biotechnology* 61 (2003) 10-20.
33. Watson A.J.M., Gerasimenko J.V., Gerasimenko O.V., Tepikin A.V., Petersen O.H. and Palejwala A., Menadione-induced apoptosis: roles of cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation and the mitochondrial permeability transition pore, *Journal of Cell Science* 115 (2002) 485-497
34. Zámocklý M., Koller F., Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72 (1999) 19-166.