



SECRETARIA  
DE  
EDUCACION PUBLICA



CICIMAR

# INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

CIENCIAS MARINAS

"Evaluación del rendimiento celular  
y actividad de superóxido dismutasa  
en *Debaryomyces hansenii*"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

**IBQ Jesús Martín Ramírez Orozco**

# INDICE

Glosario	i
Relación de tablas	iii
Relación de figuras	v
<b>Relación de diagramas</b>	vii
Lista de abreviaturas	vii
<b>Resumen</b>	viii
Abstract	ix
<b>1. Introducción</b>	1
1.1 Levaduras	3
1.2 Levaduras marinas	5
1.3 <b>Superóxido</b> dismutasa	6
<b>2. Antecedentes</b>	10
<b>3. Justificación</b>	13
4. Objetivo	16
<b>5. Material y Métodos</b>	17
5.1 Medio de cultivo	17
5.2 <b>Optimización de los factores físico-químicos</b> para la obtención de biomasa	17
5.2.1 <b>Extracto</b> de levadura y peptona	17
<b>5.2.2 pH</b>	18
5.2.3 Velocidad de <b>agitación</b>	19
5.2.4 Temperatura	19
5.2.5 Aereación	19
5.3 Uso del dióxido de <b>cloro</b> (Halox) <b>como</b> vía <b>alterna</b> a la esterilización	20
5.3.1 <b>Método</b> de difusión de discos	20
5.3.2 <b>Método</b> en cultivos líquidos	20
5.4 <b>Evaluación</b> de inductores para incrementar la actividad de la enzima SOD	21

5.4.1 Oxigeno	21
5.4.2 Sulfato de cobre	21
5.4.3 Glicerol	21
6. Resultados	24
6.1 Medio de cultivo	24
6.2 Optimización de los factores fisico-quimicos	25
6.2.1 Extracto de levadura y peptona	25
6.2.2 Efecto del pH en la produccion de biomasa y actividad de la enzima SOD en <i>Deb. hansenii</i>	28
6.2.3 Efecto de la velocidad de agitacion en la produccion de biomasa en <i>Deb. hansenii</i>	32
6.2.4 Efecto de la temperatura en la produccion de biomasa y actividad de la enzima SOD en <i>Deb. hansenii</i>	33
6.2.5 Efecto de la aereacion sobre la obtencion de la biomasa y actividad de SOD en <i>Deb. hansenii</i>	35
6.3 Efecto del dióxido de cloro sobre la produccion de biomasa y actividad de la enzima SOD en <i>Deb. hansenii</i>	40
6.3.1 En cultivos sólidos	40
6.3.2 En cultivos liquidos	40
6.4 Evaluacion de inductores para incrementar la actividad de la enzima SOD	43
6.4.1 Oxigeno	44
6.4.2 Sulfato de cobre	45
6.4.3 Glicerol	46
7. Discusion	47
7.1 Medio de cultivo	47
7.2 Optimizacion de los factores físico-químicos	48
7.2.1 Extracto de levadura y peptona	48
7.2.2 pH	49
7.2.3 Velocidad de agitacion	51
7.2.4 Temperatura	52
7.2.5 Aereacion	53
7.3 Efecto del dióxido de cloro sobre la produccion de biomasa y actividad de la enzima SOD en <i>Deb. hansenii</i>	54
7.4 Evaluacion de inductores para incrementar la actividad de la enzima SOD	55

<b>7.4.1 Oxígeno</b>	<b>55</b>
<b>7.4.2 Sulfato de cobre</b>	<b>56</b>
<b>7.4.3 Glicerol</b>	<b>57</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>59</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>62</b>
<b>Apendice I</b>	<b>63</b>
<b>Apendice II</b>	<b>64</b>
<b>Apendice III</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>69</b>

# GLOSARIO

**Actividad enzimática.** Capacidad de un enzima para transformar un sustrato.

**Ascomiceto.** Levaduras capaces de producir esporas sexuales (ascosporas) dentro de sacos especiales llamados ascas.

**Asimilación.** Proceso fisiológico en el cual se metabolizan los nutrientes empleando al oxígeno como el aceptor final de los electrones.

**Basidiomiceto.** Levaduras que se reproducen por medio de esporas sexuales llamadas basidiosporas, las cuales se encuentran en basidios o esterigmas.

**Biomasa.** Cantidad de células presentes medidas como masa.

**Cofactor.** Componente no proteico necesario para dar origen a la actividad de ciertas enzimas.

**Deuteromiceto.** Son levaduras imperfectas en las cuales no se han encontrado estadios sexuales de reproducción.

**Enzimas.** Proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas.

**Fermentación.** Proceso anaeróbico en el cual los carbohidratos son metabolizados para dar etanol y dióxido de carbono.

**Fisión.** Mecanismo de reproducción asexual en el cual el DNA cromosomal se duplica y cuando la célula progenitora ha alcanzado su máximo tamaño, el núcleo y el citoplasma se dividen para dar lugar a dos nuevas células.

**Gemación.** Proceso de reproducción asexual en el cual en ciertos puntos de una célula se forma una pequeña protuberancia la cual crece hasta alcanzar el tamaño de la célula madre pudiendo separarse o permanecer unidas.

**Hongo.** Reino perteneciente al sistema de clasificación de 5 reinos propuesto por Whittaker, el cual comprende los mohos y las levaduras.

**Inducción enzimática.** Estimulación a la producción de enzimas por medio de sus substratos.

**Isoenzima.** Son enzimas diferentes que catalizan la misma reacción.

**Levadura.** Hongo que en un estado conspicuo de su ciclo de vida se encuentra en estado preferencialmente unicelular.

**Levadura mesofílica.** Se catalogan como levaduras mesofílicas, aquellas levaduras capaces de crecer bajo temperaturas de los 10 a los 48°C.

**Levadura psicrófila.** Se catalogan como levaduras psicrófilas, aquellas levaduras capaces de crecer bajo temperaturas por debajo de los 15°C.

**Metabolito.** Producto intermedio del metabolismo.

**Productividad.** Gramos de producto formado por unidad de volumen y tiempo.

**Radical libre.** Átomos o moléculas cuya última capa electrónica no se encuentra apareada en su totalidad.

**Substrato.** Sustancias nutritivas presentes en el medio.

**Unidades de actividad enzimática.** Cantidad de enzima que origina la transformación de 1.0  $\mu\text{mol}$  ( $10^{-6}$  mol) de substrato por minuto a 25°C

## RELACION DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCION	Pag..
I	Componentes celulares dañados por especies reactivas de oxígeno	7
II	Ruta de la <b>reducción</b> del oxígeno y secuestradores catalíticos de los intermediarios	9
III	<b>Composición</b> de las distintas formulaciones empleadas para optimizar el medio <b>M1/2</b> (AI)	18
IV	Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la levadura <b>sobre</b> las distintas formulaciones.	27
V	Biomasa total en las distintas formulaciones	27
VI	Halo de <b>inhibición</b> de <i>Sacch. cerevisiae</i> y <i>Deb. hansenii</i> <b>al</b> emplear <b>Halox E-100</b> , <b>sobre</b> su crecimiento en <b>placas</b> de Petri con agar inclinado	41
VII	Efecto del <b>Halox E-100</b> , <b>sobre</b> la viabilidad de bacterias contaminantes presentes en cultivo de la levadura marina <i>Deb. hansenii</i> en <b>matraces</b> Erlenmeyer.	41

## RELACION DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>DESCRIPCION</b>	<b>Pág..</b>
1	Cinetica de crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> en un medio enriquecido (M1/2), y uno definido (YNB): a) <b>Incremento</b> de peso <i>sew</i> ; b) <b>Consumo</b> de glucosa	24
2	Efecto del solvente del medio de cultivo <b>sobre</b> el crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> : a) medio YNB; b) medio M1/2	25
3	Cinetica de crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> bajo distintas formulaciones del medio M1/2: a) peso seco; b) <b>consumo</b> de glucosa	26
4	Efecto de los nutrientes <b>extracto</b> de levadura y peptona <b>sobre</b> la actividad de la enzima <b>SOD</b> , en <i>Deb. hansenii</i> .	28
5	Cinetica de crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> a <b>partir</b> del medio de cultivo B3 bajo distintos valores iniciales de pH no controlado: a) en base a la biomasa; b) en base <b>al consumo</b> de glucosa.	29
6	Parametros de crecimiento para <i>Deb. hansenii</i> bajo distintos valores de pH no controlado: a) biomasa total; b) <b>velocidad</b> especifica de crecimiento ( $\mu$ ).	30
7	Cinetica de crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> bajo distintos valores de pH controlado ( $\pm 0.02$ ): a) <b>peso seco</b> ; b) <b>consumo</b> de gluwsa; c) biomasa total ( $Yx/s$ ); d) velocidad especifica de crecimiento ( $\mu$ ).	31
8	Efecto del pH del medio de cultivo <b>sobre</b> la actividad de la enzima <b>SOD</b> en <i>Deb. hansenii</i> .	32
9	Cinetica de crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> bajo distintas velocidades de agitacion: a) peso seco; b) <b>consumo</b> de glucosa; c) biomasa total; d) velocidad especifica de crecimiento (p)	34
10	Efecto de la velocidad de agitacion del medio de cultivo <b>sobre</b> la actividad de la enzima <b>SOD</b> en <i>Deb. hansenii</i> .	35
11	Cinetica de crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> bajo distintas temperaturas de <b>incubación</b> ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ): a) peso <b>seco</b> ; b) <b>consumo</b> de gluwsa; c) biomasa total; d) velocidad especifica de crecimiento (p)	36
12	Efecto de la temperatura de <b>incubación</b> <b>sobre</b> la actividad de la enzima <b>SOD</b> en <i>Deb. hansenii</i> .	37

<b>FIGURA</b>	<b>DESCRIPCION</b>	<b>Pág..</b>
13	Cinetica de crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> bajo distintos flujos de inyeccion de aire: a) peso seco; b) <b>consumo</b> de glucosa; c) biomasa total; d) velocidad <b>específica</b> de crecimiento ( $\mu$ )	38
14	Efecto del flujo de aereacion <b>sobre</b> la actividad de la enzima SOD en <i>Deb. hansenii</i> .	39
15	Efecto del <b>Halox E-100</b> a distintas diluciones <b>sobre</b> el crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> , cineticas desarrolladas en <b>matraces</b> Erlenmeyer.	42
16	Efecto del dióxido de cloro (0.52 mg/ml) presente en el medio de cultivo <b>sobre</b> la actividad de la enzima SOD en condiciones <b>normales</b> (pH 5.0; O <sub>2</sub> 20%; 30°C; 500 r.p.m.).	42
17	Actividad de la enzima SOD a lo largo de una cinetica de crecimiento de <i>Deb. hansenii</i> en condiciones <b>normales</b> (pH 5.0; O <sub>2</sub> 20%; 30°C; 500 r.p.m.), mediante el ensayo X-Xo.	43
18	Actividad de la enzima SOD tras una inyeccion de oxigeno 100% por un <b>periodo</b> de 2.5 hrs, aplicado <b>sobre</b> la hora 24 de crecimiento.	44
19	Actividad de la enzima SOD tras una <b>pulsación</b> de <b>sulfato</b> de <b>cobre</b> (0.08 mM) aplicada a la hora 24 de crecimiento.	45
20	Actividad de la enzima SOD en un cultivo de <i>Deb. hansenii</i> empleando <b>glicerol</b> en sustitucion de glucosa <b>como</b> fuente de carbono.	46

# RELACION DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA	DESCRIPCION	Pag.
1	Diagrama de flujo para efectuar cineticas de crecimiento con <i>Deb. hansenii</i> en matraces Erlenmeyer de 250 ml.	22
2	Diagrama de flujo para efectuar cineticas de crecimiento con <i>Deb. hansenii</i> en un reactor quimico de 2 l.	23

## **LISTA DE ABREVIATURAS.**

<b>amb.</b>	<b>ambiente</b>
<b>N</b>	<b>Normal</b>
<b>nm</b>	<b>nanometros</b>
<b>r.p.m.</b>	<b>revoluciones por minuto</b>
<b>seg.</b>	<b>segundo(s)</b>
<b>hrs.</b>	<b>horas</b>
<b>°C</b>	<b>grados Celsius (centigrados)</b>
<b>ABS</b>	<b>absorbancia</b>
<b>ml</b>	<b>mililitros</b>
<b>μl</b>	<b>microlitros</b>
<b>tm</b>	<b>temperatura</b>
<b>Ln</b>	<b>logaritmo natural</b>
<b>μg</b>	<b>microgramos</b>
<b>l</b>	<b>litro(s)</b>
<b>pH</b>	<b>potencial de hidrogeniones</b>
<b>mm</b>	<b>milimetros</b>
<b>min.</b>	<b>minuto(s)</b>
<b>SOD</b>	<b>superóxido dismutasa</b>
<b>mM</b>	<b>milimolar</b>
<b>Deb.</b>	<b><i>Debaryomyces</i></b>
<b>Sacch.</b>	<b><i>Saccharomyces</i></b>

# RESUMEN.

El presente trabajo de tesis comprendió el estudio **sobre las** cinéticas de crecimiento de la cepa **C-11** identificada como *Debaryomyces hansenii*, así como de un metabolito en particular, la enzima **Super-óxido** dismutasa. El medio de cultivo fue optimizado disminuyendo la **concentración** de los nutrientes **extracto** de levadura y peptona, consiguiéndose de esta **forma** una formulación más barata sin alterar la **producción** de biomasa. Se encontró que **las** concentraciones óptimas de **extracto** de levadura y peptona fueron 0.3% y 0.15% respectivamente.

Después de realizar estudios **sobre los** parámetros físico-químicos, se estableció que la levadura debe crecerse bajo **las** siguientes condiciones: pH **5.0**, velocidad de **agitación** de 500 r.p.m., temperatura de 30°C y suministrarse una aereación a razón de 5 l/min. La productividad lograda fue de aproximadamente un 50 %, en base a la fuente de carbono. La enzima SOD fue inducida mediante la adición **al** medio de cultivo de sales de **cobre** e inyección de oxígeno molecular, así como también mediante la sustitución de la fuente de carbono (glucosa) por una fuente de carbono no fermentativa (glicerol). Los incrementos de actividad fueron del **orden** de 3.5 veces en el **caso** del glicerol, y 4 veces cuando el oxígeno o **las** sales de **cobre** fueron adicionadas.

# ABSTRACT

The present work comprised the study of growth kinetics for the strain **C-11** identified as *Debaryomyces hansenii*, and for a particular metabolite, the superoxide dismutase enzyme. Culture medium was optimized diminishing the concentrations of the yeast extract and **peptone** nutrients, making it a cheaper culture medium without affecting the biomass production. We found that optimal concentrations of yeast extract and **peptone** were 0.15 % and 0.3 % respectively.

The effect of physical factors on biomass production was established. *Deb. hansenii* strain C-11 cultured at pH 5.0, 500 r.p.m., 30°C, and 5 Umin of filtered air supplied as oxygen source yield approximately 50% in base to the carbon source, and the activity of the SOD enzyme was found to be increased by the application of molecular oxygen, copper or glycerol to the chemical reactor. This enzyme showed an activity 3.5 folds increase when glycerol was supplied, and 4 folds when either oxygen or **copper** were supplied to the culture medium.

# 1. INTRODUCCION.

El hombre ha utilizado a **los** microorganismos para su conveniencia desde tiempos inmemorables. Se asume que hace 11 000 **años**, con el final de la **última glaciación** cuando el hombre se hizo sedentario tuvo forzosamente que ingerir alimentos fermentados por microorganismos, aunque por **supuesto**, de **manera** involuntaria. Sin embargo, las evidencias del empleo de microorganismos por el hombre, datan desde hace 3, 500 **años**, cuando en el antiguo Egipto **los** faraones se alimentaban con pan **fermentado**, **cerveza** y vino.

**Al cabo** de algunos milenios, y basicamente con el descubrimiento del mundo de **los** microorganismos hecho por Leeuwenhoek en 1673, así como una **descripción** mas detallada y conceptualizada de la actividad de **los** microorganismos **sobre los** substratos efectuada por Pasteur en 1864, el hombre ha aprendido a estudiar **los** microorganismos, **metabolica** y fisiologicamente, de tal suerte que pueda combatirlos eficazmente cuando estos son no deseados, o bien **promover** su desarrollo cuando **sean** de interes para **algún** fin específico (Davenport, 1980).

Investigando **los** productos quimicos producidos por microorganismos, se han descubierto numerosos compuestos **orgánicos**, muchos de **los** cuales **tienen** aplicacion como pigmentos, fragancias, insecticidas, productos farmaceuticos, o como herramientas biomedicas. Se estipula que desde el descubrimiento de **los** microorganismos hasta la fecha, se han obtenido de entre 30 000 y 50 000 compuestos **con** aplicaciones **diversas** (Fenical y Jensen, 1993). Este **número** de descubrimientos se debe a la habilidad de **los** microorganismos para producir metabolitos bioactivos, **así** como tambien, **al** interes de la industria por **los** recursos microbianos. Lo anterior se deriva del hecho de que es mas **sencillo** cultivar y manipular microorganismos para obtener rnetabolitos, a cualquier otra fuente de **los** mismos.

Sin embargo, hasta la fecha **los** microorganismos empleados por la industria solo son de origen terrestre, mientras que han permanecido un **tanto** ignorados **los** de origen marino. Los oceanos involucran una compleja diversidad de microorganismos, **los** cuales se encuentran **tanto** en la **columna** de agua, como **sobre la superficie** de objetos inanimados y animados, e incluso, en el interior de **los** mismos (Bradley, 1995). El Oceano, como nicho ecologico para **los** microorganismos, se caracteriza por su bajo contenido de **oxígeno** y nutrientes organicos, temperaturas que varian desde **menos** cero hasta **los 30°C**, alta salinidad, y presiones hidrostaticas que **llegan** a alcanzar varios **cientos** de atmosferas en el mar **profundo** (Yamasato et al., 1974). Por lo **tanto**, **los** microorganismos marinos han desarrollado capacidades **fisiológicas** y **metabolicas únicas**, que no solo aseguran su sobrevivencia en un ambiente de condiciones extrernas, **sino** tambien, producen **metabolitos** singulares que no se presentan en **los** microorganismos de origen terrestre (Davidson, 1995).

Por esta razon, **los** metabolitos de microorganismos marinos son interesantes de estudiar. Los primeros trabajos desarrollados en este **sentido** fueron realizados por Rosenfeld y **Zobell** en 1947, y por Grein y Meyers en 1947, quienes encontraron que las bacterias marinas producian agentes antimicrobianos. Desde entonces y hasta la fecha, se han desarrollado trabajos extensivos, **sobre todo** en las dos **últimas** decadas, **los** cuales involucran estudios para evaluar el potencial de **los** microorganismos marinos como posible fuente de metabolitos con **aplicaciones**, especialmente, **biomédicas**. Dichos estudios involucran **tanto** bacterias (Burkholder et al., 1966; Andersen et al., 1974; Kitahara et al., 1975; Gandhi et al., 1976; Wratten et al., 1977; Hota et al., 1980; Gorni et al., 1984; Okami, 1988; Gustafson et al., 1989; Takahashi et al., 1989; Jensen et al., 1991; Rychnovsky et al., 1991), como microalgas (Duff et al., 1966; Sieburth, 1974; Moore et al., 1988; Patterson et al., 1991) y hongos (Kupka et al., 1981; Pallenberg y White, 1986; Schiehser et al., 1986; Shin y Fenical, 1987; Strongman et al., 1987; Guerriero et al., 1988; Guerriero et al.,

1989; Poch y Gloer, 1989; Poch y Gloer, 1991). Los primeros trabajos sobre levaduras marinas fueron realizados en 1894 (Fisher), y posteriormente de 1934 (Zobell y Feltham) y 1946 (ZoBell), (en Fell et al., 1960), en donde se da a conocer la existencia de levaduras aisladas del oceano. Sin embargo, los estudios realizados en una forma mas clara y determinada, fueron realizados en 1960 y 1962 (Fell et al., 1960; Ahearn et al., 1962; Meyers et al., 1962; Uden y Castelo, 1963). Dichos trabajos abarcan estudios de evidencias, ubicacion y taxonomia de las levaduras en los oceanos. Trabajos posteriores en este mismo sentido incluyen los realizados por Fell (1967), Ahearn (1968), Goto et al. (1974), Yamasato et al. (1974), Rodriguez et al. (1983), Adhemar (1988), Hernandez, (1990). De esta manera, en la actualidad se sabe que las levaduras son microflora común en los ambientes marinos y que sus nichos en tales ambientes puede ser subdividido en aquellas que son afectadas principalmente por factores terrestres, como lo son el flujo de rios, arroyos y desechos de la vida cotidiana del hombre, industriales y caseros; y las que se encuentran en mar abierto, aunque se piensa que existe un continuo intercambio de los factores ambientales entre ambas (Yamasato et al., 1974).

## **1.1 LEVADURAS.**

Las levaduras son aquellos hongos que en un estado conspicuo de su vida presentan una fase unicelular (Sieburth, 1979), se reproducen ya sea por gemación, fisión, o una combinación de ambas (Lodder, 1970), no poseen movilidad, viven ya sea como saprofitos o parasitos (Davenport, 1980). Las levaduras son organismos facultativos los cuales tienen la habilidad de producir energia para su propio uso, bajo condiciones aerobicas y anaerobicas a partir de compuestos organicos disponibles (Heikii y Erkii, 1969). Sin embargo, una definición simple y precisa del termino "levadura" es imposible, ya que en ciertos hongos filamentosos pueden inducirse algunas estructuras unicelulares. Este cambio del estado filamentosos al levaduriforme es dependiente de varios

parametros ambientales, como la temperatura y el sustrato. Además, mientras algunas levaduras solo **forman** células individuales, y algunas **veces cadenas cortas** de células similares, otras producen **diversas formas** celulares, incluyendo filamentos de varios tipos. Aunque las levaduras no **poseen** motilidad, su **distribución** no es limitada, ya que **al** igual que otros organismos, pueden ser dispersas por el aire, **y/o** transportadas por animales (Davenport, 1980).

En la actualidad, las levaduras son utilizadas en muchos procesos industriales, como la **producción** de: **bebidas** alcohólicas, biomasa (pan, alimentos) y varios productos metabólicos. De este **último punto** se pueden citar enzimas, vitaminas, **polisacáridos** capsulares, carotenoides, **alcoholes** polihídricos, lípidos, **glicolípidos**, ácido cítrico, etanol, dióxido de carbono, y compuestos sintetizados por la **introducción** de DNA recombinante en las levaduras (Phaff, 1986). Muchas especies de levaduras **usadas** en estos procesos fueron modificadas genéticamente para seleccionar las características deseadas y eliminar las no deseadas (Phaff, 1986).

Las levaduras incluyen un **diverso grupo** de organismos cuyos estadios sexuales se encuentran distribuidos entre **los** ascomicetos (**forman** esporas de origen sexual dentro de **ascas**), y **los** basidiomicetos (**forman** esporas **externas** en basidios o esterigmas). Las levaduras imperfectas (deuteromicetos) representan un tercer grupo con afinidades entre **los** ascomicetos y basidiomicetos, sin embargo hasta la fecha no se han encontrado estadios sexuales en su ciclo de vida, (Lodder y **Kreger**, 1983). En la actualidad se **conocen** 60 géneros y 600 especies de levaduras, cuya clasificación se basa principalmente en características **morfológicas**, reproductivas (estadios sexual y asexual), así como en pruebas bioquímicas y genéticas (**Olsen**, 1990).

## 1.2 LEVADURAS MARINAS.

Las levaduras marinas posiblemente son mejor descritas como aquellas levaduras que pueden ser aisladas, y que completan realmente sus ciclos de vida, en habitats marinos. Las levaduras marinas se encuentran como saprofitos en sedimentos marinos, hierbas marinas en estados de **putrefacción**, como parasitos de algas, mangles, y animales, (Jennings, 1983). Han sido aisladas de lagos salados que se encuentran tierra adentro (Anastasiou, 1963; Davidson, 1974; Amon, 1978; Jennings 1983), y muchas de ellas juegan un **papel** muy importante en los alimentos que se **conservan** en salmueras (Onishi, 1963; Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979).

La distribución de levaduras en ambientes marinos obedece a una macrozonación en donde la población de levaduras decrece en **número conforme se alejan** de la tierra (Uden y Fell, 1968), decayendo más rápidamente que las bacterias (Sieburth, 1979). Sin embargo, las levaduras son **los** hongos dominantes en mar abierto (Fell, 1968; Bahnweg y Sparrow, 1971), mientras que **los** hongos filamentosos están restringidos principalmente a zonas **costeras**, debido a la distribución de sus substratos. En zonas oceánicas es posible **encontrar** especies de levaduras pertenecientes a las tres clases de hongos (ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos); mar adentro, la disponibilidad de **materia orgánica** suspendida es **menor**, por lo **tanto**, la **variedad** de especies decrece y **los Ascomicetos** llegan a ser **raros a excepción** de la especie ubicua *Deb. hansenii* (Fell, 1976).

En estudios realizados para **conocer** la gama de **utilización** de fuentes de **carbono** solubles entre levaduras marinas y terrestres, a pesar de ciertas excepciones (Rhodotorula, Aheam et al., 1962), se ha estimado que en promedio, las levaduras marinas utilizan 19.2 compuestos, comparados ~~con~~ un promedio de 12.8 compuestos por levaduras terrestres (Uden y Fell, 1968). Esta

diferencia se atribuye a la necesidad de las levaduras marinas de utilizar cualquier compuesto de **carbono** disponible en su ambiente, donde los suministros de carbon combinado pueden limitar su crecimiento (Ahearn et al., 1968). Es esta una de las razones que hacen interesante el estudio de estos organismos marinos, ya que podrian tener ventajas en la **producción** de biomasa con **respecto** a las levaduras de origen terrestre al presentar mayor gama de **utilización** de compuestos para su crecimiento.

### 1.3 SUPEROXIDO DISMUTASA.

Todos los organismos heterotrofos obtienen fundamentalmente su energia de las reacciones de **oxidación-reducción**, es decir, aquellas en las que los electrones son transferidos desde un compuesto, el **donador** electronico o agente reductor, a un aceptor electronico, el agente oxidante. Los organismos aerobicos obtienen la mayor **parte** de su energia de la respiracion, que se define como la **oxidación** de los combustibles organicos por el oxigeno molecular; el oxigeno actua, por **tanto**, como el aceptor electronico final en la respiracion. Sin embargo, aproximadamente el 5% del oxigeno consumido por la mitocondria no es reducido completamente a agua, produciendo en su lugar radicales libres (Xiu et al., 1992).

Un radical **libre** es cualquier atomo o molecula que contiene uno o **más** electrones no apareados (Halliwell y Gutteridge, 1989) que **alteran** la reactividad quimica de un atomo o molecula, usualmente haciendolo mas **reactivo** que su **forma** apareada correspondiente. Sin embargo, la reactividad quimica real de los radicales varia enormemente. El radical hidrogeno (**H·**), el cual contiene un proton y un electron, es el radical **libre** mas simple. Las reacciones en cadena de los radicales libres son iniciadas frecuentemente mediante la **remoción** de (**H·**) de otras moleculas (p. ej. durante la peroxidacion de lipidos), (Halliwell, 1982).

Durante la respiración, se **generan los** radicales libres del **tipo** superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroxilo (OH.) (Czapski y Bors, 1991) cuyas reactividades son variables. La reactividad del radical superóxido depende del ambiente y es baja en soluciones acuosas. El peróxido de hidrógeno **exhibe** la reactividad más baja, mientras que el radical hidroxilo pertenece a las sustancias más reactivas conocidas. En consecuencia, de acuerdo con la opinión prevaleciente, **los** radicales hidroxilo son **los** responsables de la mayor parte de **los** efectos **dañinos** del oxígeno (Samuni et al., 1983; Halliwell y Gutteridge 1986). Sin embargo, se conoce que la **forma** protonada del radical superóxido, el radical perhidroxilo, puede iniciar la peroxidación de lípidos y participar en la **propagación** de este proceso (Thomas et al., 1978; Bielski et al., 1983), el cual es considerado ser la principal consecuencia del estrés oxidativo.

**Tabla I. Componentes celulares dañados por especies reactivas de oxígeno.**

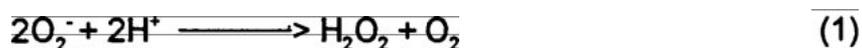
<b>COMPONENTE</b>	<b>DAÑO</b>
<b>Lípidos</b>	<b>peroxidación de ácidos grasos insaturados</b>
<b>Proteínas</b>	<b>oxidación de enzimas que contienen sulfhidrilos</b>
<b>Carbohidratos</b>	<b>despolimerización de polisacáridos</b>
<b>Ácidos nucleicos</b>	<b>mutaciones</b>

La producción de radicales de oxígeno en **los** sistemas biológicos no solo se debe **al** proceso de la respiración. En **realidad** se pueden **hacer** 4 categorías de producción: 1) producción no enzimática durante la **oxidación** de sustratos naturales; 2) producción enzimática catalizada por reductasas, deshidrogenasas, y otras enzimas; 3) la estimulación de drogas y xenobióticos; y 4) la producción de radicales de oxígeno por las **células** completas, (Afana's et al., 1991).

Aunque el radical hidroxilo es una de las especies de oxígeno más reactivas conocidas, hasta la fecha no se ha encontrado enzima alguna que lo inactive. Sin embargo, las células pueden prevenir la formación de radicales hidroxilo ya sea controlando el nivel de estas especies de oxígeno o secuestrando la **transición** de cationes metálicos, o **ambas**. La presencia de las enzimas responsables de la **remoción** de los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno en la **mayoría** de los organismos aerobios sugiere que estas enzimas previenen la formación del radical hidroxilo manteniendo los niveles estables de las dos especies derivadas del oxígeno tan **bajas** como sea posible (Bilinski et al., 1988).

La defensa **primaria** contra estos radicales libres está **provista** por enzimas que secuestran catalíticamente los intermediarios de la **reducción** del oxígeno. El radical superóxido es eliminado por la Superóxido Dismutasa, quien **cataliza** su conversión a peróxido de hidrógeno más oxígeno (1) (Fridovich, 1975), el peróxido de hidrógeno es removido por la catalasa (Rapoport y Muller, 1974), quien la **convierte** a agua más oxígeno, y por peroxidasa (Saunders et al., 1964), quienes lo **reducen** a agua usando una **variedad** de reductores disponibles por la célula.

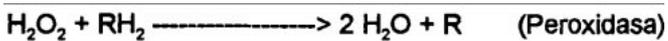
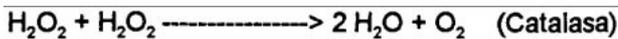
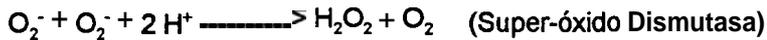
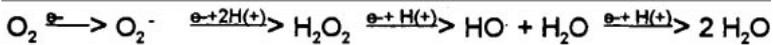
La enzima Superóxido Dismutasa (SOD) existe como tres **formas** de isoenzima cuya similaridad es que catalizan la misma **reacción** de **dismutación**:



La primera diferencia entre estas tres isoenzimas es que contienen diferentes **metales** como su grupo prostético funcional (Bannister et al., 1986). A) La enzima **cobre**, zinc (Cu, Zn SOD) es un dímero de 32 **KDa** (varía entre las especies), por lo general característica de **células** eucariotas, aunque se ha

descubierto su presencia en bacterias, p. ej., *Photobacterium leiognathi* y *Caulobacter crescentus* (Bannister et al., 1986; Van Loon et al., 1986): no obstante que en un inicio se le consideró exclusiva del citosol, ha sido encontrada en los espacios intersticiales y en el lisosoma (Bannister et al., 1986). Recientemente se ha detectado una glicoproteína tetramérica de 135

**Tabla II.** Ruta de la reducción del oxígeno y secuestradores catalíticos de los intermediarios, (Fridovich, 1982).



**KDa** del tipo Cu, Zn SOD, llamada EC-SOD (Hjalmeron et al., 1987), en los sistemas vasculares de los mamíferos aparentemente ligada a las superficies endoteliales de las células (Karlson y Marklund, 1987), y se ha reportado también en varias especies de bacterias (Steinman 1985; Beck et al., 1990; Steinman y Ely, 1990; Kroll et al., 1991). B) La enzima que contiene al manganeso como grupo prostético (Mn SOD) se encuentra tanto en células eucariotas como en procariontes. En el caso de los eucariotas su ubicación celular se halla en las mitocondrias, y en el caso de bacterias en el espacio periplásmico (Moody y Hassan, 1984; Lee y Lee, 1988; Salin y Desterhelt, 1988). Se cree que se encuentra presente en el citosol como una pro-enzima activa antes de ser transportada hacia la mitocondria (Bannister et al., 1986), su peso molecular varía entre las especies, en promedio es de 41 **KDa** cuando se trata de un dímero, de 61.5 **KDa** cuando se trata de un trímero, y de 84 **KDa**

cuando se trata de un tetramero (Steinman, 1982). Finalmente, C), la enzima que contiene hierro (Fe SOD) se **localiza** en el citosol y es característica de procariotas, aunque también se **le** ha encontrado en protozoas, algas, y en algunas especies de **plantas** (Van Loon et al., 1986); su peso molecular varía entre **las** especies, **pero** en promedio es de 41.11 **KDa** cuando se trata de un dímero, y de 88 **KDa** cuando se trata de un tetramero (Steinman, 1982).

## 2. ANTECEDENTES

El Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) cuenta con una colección de levaduras marinas **aisladas** del Pacífico en la Costa Occidental de Baja California Sur. La colección consta de 79 cepas de levaduras que corresponden a 9 géneros, 19 especies y dos variedades (Hernández, 1990). Se efectuó un estudio en la colección con **respecto** a las propiedades de **producción** de biomasa y **sedimentación**, encontrándose que la **cepa** catalogada como C-11 e identificada como *Debaryomyces hansenii* (Hernández, 1990) fue la que **presentó** mejores características de crecimiento, y cuya actividad en **relación** con la enzima Super-óxido Dismutasa poseía rendimientos comparables a **los** valores encontrados para otras levaduras y a **las** fuentes convencionales de SOD (Ochoa et al., 1995), razón por la cual fue elegida para el desarrollo del presente estudio.

Los primeros estudios relacionados con la enzima Cu, Zn SOD, se remontan **hacia** 1939, cuando Man y Keilin aislaron una proteína a la cual llamaron "Hemocupreína" y la reportaron sin actividad enzimática. **Años** más tarde (1959) Markowitz y cols. aislaron otra **cobre-proteína** a partir de eritrocitos humanos, era similar a la **primera** y la llamaron "eritrocupreína", sin embargo, también fue reportada sin función enzimática (Mc Cord y Fridovich, 1969). No fue **sino** hasta 1969 cuando Joe Mc Cord e **Irwin** Fridovich aislaron y purificaron

una proteina que fue identificada como aquellas descritas por Markowitz y Keilin, y cuyos estudios bioquimicos mostraron la actividad que originó su nombre, Superoxido Dismutasa (SOD 1.15.1.1), (Mc Cord y Fridovich, 1969).

Las fuentes principales de las que se ha aislado y purificado la enzima SOD incluyen: eritrocitos, **cerebro**, hígado y corazón de humano, bovino, **cerdo**, **pollo**, y rata (Fridovich, 1975), se ha aislado también de bacterias (Lee y Lee, 1988; Lygren et al., 1986, Chamnongpol et al., 1995; Kroll et al., 1991; Atsuo et al., 1994), algas (De Jesus et al., 1989), y levaduras (Van Loon et al., 1986; Bilinski et al., 1988; Paganelli et al., 1989; Gralla et al., 1991; Galiazzo y Labbe, 1993). En su **conjunto**, el principal interés consiste en encontrar una fuente abundante, económica y que sea aplicable en estudios de laboratorio con finalidades biomedicas (Lee y Lee, 1988; Salin y Desterheit, 1988), por lo que, es importante encontrar un proceso que sea también económico, rentable y fácil de manipular con **respecto** a las conveniencias del tecnólogo.

Los niveles de muchas proteínas incluyendo las proteínas de la cadena respiratoria están sujetos a represión catabólica, por lo **tanto**, son más bajos durante el crecimiento **sobre** glucosa que **sobre** fuentes de carbono no fermentables como el etanol. Estudios realizados **sobre** una levadura (*Candida albicans*) demuestran que cuando se **emplea** metanol como fuente de carbono en lugar de glucosa, se obtiene un incremento en **los** niveles de actividad de la enzima SOD de aproximadamente tres veces en comparación **al** crecimiento **sobre** el mismo medio conteniendo glucosa (Paganelli et al., 1988). **Galiazzo y Labbe** en 1993, demostraron que cuando una cepa de *Sacch. cerevisiae* crece **sobre** un medio que contiene glicerol como fuente de carbono, se provoca un **incremento** de 3 veces la expresión de la enzima Cu, Zn SOD con **respecto** a **aquel** medio en que se **emplea** la **tradicional** glucosa como fuente única de carbono. Se han realizado otros intentos de inducir la **producción** y actividad de la enzima Superoxido Dismutasa, en **los** cuales se ha especulado que el ion

**cobre (Cu<sup>2+</sup>)**, el cual es un componente de una de las Superoxido Dismutasas de levaduras, **al** ser agregado **al** medio de crecimiento, causaria un incremento en la **cantidad** de esta enzima en las celulas. De hecho, en 1974 Fridovich et al., encontraron que la adicion de sales de **cobre al** medio de cultivo provocaba una **inducción** de 2.8 veces la actividad de la enzima SOD en ***Sacch. cerevisiae***. Estudios posteriores mostraron resultados que confirmaban lo realizado por Fridovich **al** adicionar sales de **cobre al** cultivo de levaduras (Greco et al., 1986; **Galiazzo** et al., 1991; **Gralla** et al., 1991) y **plantas** (Prphasri et al., 1992).

Por otra **parte**, estudios realizados **con** bacterias mostraron que la Superoxido Dismutasa es inducible por oxigeno o compuestos que **generan O<sub>2</sub><sup>-</sup>** en presencia de oxigeno (Autor, 1982). Esto **permite** la **manipulación** de los niveles intracelulares de la enzima mediante la **variación** de la tension de oxigeno bajo la que se crecen las celulas. En estudios **con** levaduras se encontro que cuando ***Sacch. cerevisiae*** crece en un ambiente de 100 % de **oxígeno**, inuementa la **producción** de SOD 6.5 veces con **respecto** a su crecimiento en condiciones **anaeróbicas**, y 3.4 veces con **respecto** a wndiciones **normales** de oxigeno. La enzima inducida fue **tanto** la manganeso (30%) **como** la cobre-zinc (70%) (Fridovich et al., 1974).

Se han realizado otros estudios con **respecto al** crecimiento de levaduras y la produccion de SOD bajo distintas condiciones del medio de cultivo, en particular el **paso** de un cultivo anaerobio a aerobio, y se ha observado que durante la fase de crecimiento correspondiente a la anaerobiosis la enzima **permaneció** constante, y **al** iniciar la **inyección** de oxigeno se **mostró** un rapido incremento en la actividad de la Cu, Zn SOD, aumentandose en la **primera** hora 2.5 veces, mientras la Mn SOD no **mostró** incremento en cuanto a su actividad, (Clarkson et al., 1991).

### 3. JUSTIFICACION

Cualquier trabajo de **investigación** relacionado con la producción de un cierto metabolito de interés debe iniciarse con un **incremento** en la **densidad celular y/o** en la productividad. Los objetivos anteriores pueden ser abordados optimizando el ambiente de crecimiento en términos de la **composición** del medio para el crecimiento; parámetros físicos como el pH, temperatura y **agitación**; y por **último**, condiciones de **inducción** de dicho metabolito (si es que esto es posible), (Kleman y Strohl, 1994).

Por optimización se debe **entender** la selección de la mejor alternativa de un cierto **número** de opciones. En la optimización de una fórmula, el principal objetivo es encontrar el **nivel** adecuado para **cada** ingrediente, (Arteaga et al., 1994). Por otra parte, la **selección** de una determinada fuente de **carbono** con fines **de** producción de biomasa debe preferentemente cubrir el requisito de ser fuente **Química**, con la finalidad de disminuir posibles riesgos de **contaminación**, (Johnson, 1972). En estudios previos, se utilizó el medio conocido como **M1/2** que consta de glucosa como fuente de carbono, peptona como fuente de **nitrógeno** y **extracto** de levadura como fuente de vitaminas y **metales** traza para **desarrollar** biomasa a partir de *Deb. hansenii*, obteniéndose buenos resultados (33% en base a glucosa), (Ochoa et al., 1995).

La Superóxido Dismutasa es una enzima con aplicaciones en biomedicina donde se ha utilizado como anti-inflamatorio (Bulkley, 1993), regresión de tumores malignos, como modulador de la respuesta inmune, **protección** contra **radiación**, quimioterapia, **cámaras hiperbáricas**, tratamiento de enfermedades **específicas** del sistema circulatorio, nervioso central, síndrome pre-menstrual, artritis, contra la **vejez**, estrés oxidativo (Autor, 1982; Bulkley, 1993). Se continúan **buscando** más aplicaciones en medicina para esta enzima, y se ha

sugerido su aplicación como un antioxidante para los alimentos (Aurand et al., 1977; Hill, 1979; Allen y Wrieden, 1982; Meyer y Isaksen, 1995).

Sin perder de vista lo anterior, es importante **buscar** nuevas alternativas que **mejoren** las condiciones económicas y químicas (si es posible) en la obtención y **extracción** de un metabolito de interés. Por otra parte, el hecho de utilizar una cepa microbiana en la obtención de metabolitos es preferible a cualquier otra fuente del mismo. Lo anterior se debe a que es más fácil manipular microorganismos que cualquier otro ser vivo, y producir de esta **manera** grandes cantidades de microorganismos, los cuales **tienen cortos** tiempos de **generación**, e incluso, en un dado **momento**, se pueden clonar **los genes** que codifican la **producción** de la enzima de interés y obtener de tal **forma** una cepa **hiper-productora** de tal metabolito.

En las últimas décadas se han realizado algunas investigaciones **sobre** levaduras aisladas del mar, sin embargo todos **los** enfoques de estas investigaciones han sido con intereses meramente ecológicos, o bien **fisiológicos**, por lo que no **existen** reportes donde se les proponga como posibles cepas utilizables con fines tecnológicos. Las levaduras marinas pueden presentar algunas **ventajas sobre** las terrestres, ya que **al** crecer en ambientes marinos, presentan una mayor gama de aceptación de nutrientes, lo cual es conveniente **al** seleccionar alguno que presente buenos rendimientos y no sea asimilado por el resto de levaduras. El hecho de proponer una levadura marina como fuente de SOD se debe a que **al** ser de origen marino crece en ambientes con altas concentraciones de sal, lo cual disminuye en buena parte posibles riesgos de **contaminación**. En este **sentido**, se ha reportado que ***Deb. hansenii*** es de las cepas que **toleran** altas concentraciones de sal; Norkrans (1966) reporta tolerancia en medios que contienen hasta un 24 % de sal.

En estudios realizados en nuestro laboratorio se mostro que la cepa **C-11** catalogada como *Deb. hansenii* (Kreger-van Rij) tolera un 18 % de cloruro de sodio (Hernandez, 1992). Esta levadura se reproduce principalmente por **gemación**, mostrando tasas de rendimiento **celular** y de produccion de la enzima SOD con actividad **biológica** comparable con las fuentes tradicionales **tanto** de otras levaduras como de bovino (Ochoa et al., 1995). Finalmente, se pretende **probar** si las levaduras marinas son realmente buenas competidoras contra las cepas que tradicionalmente se **usan** en la biotecnologia, y proponer de esta **manera**, un **método** economico, **cómodo** y eficiente de produccion y obtencion de la enzima Cu, Zn SOD.

## 4. OBJETIVO

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rendimiento **celular** con base a la fuente de **carbono**, y la actividad de la enzima Superoxido Dismutasa en la levadura marina *Debaryomyces hansenii*.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Optimizar **los factores** fisicoquimicos (**extracto** de levadura, peptona, pH, aereacion, **agitación**, temperatura) del proceso de **obtención** de biomasa de la levadura.
2. Evaluar la efectividad del empleo de **dióxido** de **cloro** como agente **alternativo** al proceso de **esterilización**.
3. Ensayar distintos inductores (oxígeno molecular, **sulfato** de **cobre**, **glicerol**) para tratar de **mejorar** la actividad de la enzima obtenida de *Deb. hansenii*.



## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1 MEDIO DE CULTIVO.

En virtud del empleo de un medio de cultivo adecuado para la producción de biomasa de la levadura marina, se probó primeramente la conveniencia de la **utilización** de un medio de cultivo enriquecido (**M1/2**) y uno definido (**YNB**) (apendice I). Esta **evaluación** se realizó en base a cinéticas de crecimiento desarrolladas en **matraces** Erlenmeyer de 250 ml, los cuales contenían 50 ml del medio de cultivo en cuestión, mediante la técnica descrita en el esquema 1 (pag.. 22) También se evaluó el efecto del solvente **del** medio de cultivo empleando para la **preparación** de cada medio: 1) agua de mar, 2) agua destilada, y 3) agua destilada adicionada con 4% de cloruro de sodio. Los **análisis** efectuados se analizaron de acuerdo a las técnicas descritas en el apendice II.

### 5.2 OPTIMIZACION DE LOS FACTORES FISICO-QUIMICOS PARA LA OBTENCION DE BIOMASA.

#### 5.2.1 Extracto de levadura y la peptona.

En experimentos previos, fue establecido que el **incremento** en la concentración de los nutrientes que conforman el medio **M1/2**, no provocaba mayor producción de biomasa, sin embargo, la disminución de la concentración de **ellos** no afectaba dicha producción. Por esta **razón**, se **diseñó** un **experimento** cuyo **objetivo** en particular, fue evaluar la concentración mínima de la fuente de **nitrógeno** (peptona), aminoácidos y **metales** traza (**extracto** de levadura), con vías a disminuir los costos de producción de biomasa de la levadura. La fuente de **carbono** no fue incluida, ya que **al** disminuir su concentración también se disminuiría la producción de biomasa. El **diseño** experimental se describe en el esquema 1 (pag.. 22), la **composición** de los medios de cultivo ensayados se encuentran en el apendice I.

Tabla III. Composición de las distintas formulaciones empleadas para optimizar el medio M1/2 (A1).

EXTRACTO DE LEVADURA	PEPTONA					
	0.5 %	0.4 %	0.3%	0.2 %	0.1 %	0.0 %
0.25 %	A1	A2	A3	A4	A5	A6
0.20 %	B1	B2	B3	B4	B5	B6
0.15 %	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0.10 %	D1	D2	D3	D4	D5	D6
0.05 %	E1	E2	E3	E4	E5	E6
0.00 %	F1	F2	F3	F4	F5	F6

### 5.2.2 pH.

La optimización del pH se llevó a cabo evaluando distintos valores de pH (4,5,6,7,8 y 9) . Para **lograr** este fin, se empleo un **cerebro electrónico** (C.E., Ingold) conectado a un electrodo de pH (Cole-Pharmer) sumergido en el medio de cultivo . El C.E. **envía** una **señal** de encendido a una bomba peristáltica de dos vías la cual inyecta HCl 0.5 N 6 NaOH 0.5 N al medio de cultivo según sea el **caso**. Mediante este sistema se **permite** un control de pH con una precisión de hasta 0.01 unidades de pH. En el presente ensayo se empleo una exactitud de 0.05 unidades de pH.

Este experimento se **realizó** en un reactor químico de 2 l (New Brunswick), el cual incluye control de aereación, **agitación** y temperatura. La técnica de trabajo seguida para **cada** experimento se llevó a cabo de acuerdo al esquema 2; los **análisis** efectuados se describen en el apéndice II.

### 5.2.3 Velocidad de agitaci**bn**.

Para llevar a **cabo** esta **determinaci**3n****, se empleo un control automatico integrado en el reactor quimico de 2 l. Las velocidades evaluadas fueron 100, 300, 500 y 700 r.p.m.. Se utilizo una propela vertical con tres cabezales de seis **aspas** cada uno. La tecnica de trabajo seguida para cada experimento se llevo a cabo de acuerdo **al** esquema 2; **los an**3lisis**** efectuados se describen en el apendice II.

### 5.2.4 Temperatura.

Se ensayaron 4 distintas temperaturas (10, 20, 30 y 40°C). El control **sobre** la misma se llevo a cabo mediante un termostato, una resistencia electrica cuando la temperatura requerida era mayor a la ambiental, y un serpentín con refrigerante cuando la temperatura requerida era inferior a la ambiental. La precision lograda en estas determinaciones fue de **+/- 2°C**. La tecnica de trabajo seguida para cada experimento se llevo a **cabo** de acuerdo **al** esquema 2; **los an**3lisis**** efectuados se describen en el apendice II.

### 5.2.5 Aereaci**bn**.

Se deterrnino el efecto de la inyeccion de tres distintos flujos de aire, 0, 5 y 7 l/min. La inyeccion se llevo a **cabo** mediante el empleo de **bombas** de aire con regulador de **flujo** automatico y su acceso **al** reactor **consideró** el empleo de dos filtros de aire esteriles (material de fibra de vidrio inerte) conectados **al** difusor de fondo dentro del reactor. La tecnica de trabajo seguida para cada experimento se llevo a cabo de acuerdo **al** esquema 2; **los an**3lisis**** efectuados se describen en el apendice II.

### 5.3 Uso del dióxido de cloro (Halox) como vía alterna a la esterilización.

En la realización de esta determinación, se utilizó un agente químico comercial (Halox E-100) como fuente de dióxido de cloro. Las concentraciones ensayadas fueron (mg de  $\text{ClO}_2/\text{ml}$ ) 130, 65, 13, 1.3, 0.52, 0.13 y 0.013. A continuación se describen los criterios tomados para evaluar el empleo del dióxido de cloro.

#### 5.3.1 Método de difusión de discos.

En una placa de Petri se inocularon 0.1 ml de un cultivo de *Deb. hansenii* en su fase exponencial de crecimiento, los cuales fueron diseminados sobre el agar con la ayuda de una varilla de vidrio en forma de "L" (siembra por arrastre). Una vez que la siembra se secó, se colocaron sensidisos (7 mm de diámetro) en forma equidistante. A cada disco se le añadió solución de dióxido de cloro a la concentración que se estaba evaluando. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 48 hrs. Al final de este período fueron medidos los halos de inhibición presentes en las placas.

#### 5.3.2 Método en cultivos líquidos.

Mediante el empleo de matraces Erlenmeyer de 250 ml. Se elaboraron cinéticas de crecimiento de acuerdo al esquema 1, adicionando Halox E-100, a cada matraz de acuerdo a las concentraciones anteriormente descritas. Se realizó un muestreo a las 24 hrs de incubación determinándose el crecimiento de la levadura mediante la cuantificación de la densidad óptica (ver apéndice II). La eficiencia como agente esterilizante se determinó realizando observaciones microscópicas directas de cada muestra tomando 100  $\mu\text{l}$  de cultivo colocándolos en un portaobjetos y cubriéndolos con un cubre-objetos. La presencia de bacterias fue representada como + (fueron encontradas solo unas pocas), ++ (escasa), +++ (alta), ++++ (abundante),  $\bar{0}$  o bien - (ninguna), según fuera el grado de contaminación.

## 5.4 EVALUACION DE INDUCTORES PARA INCREMENTAR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOD

### 5.4.1 Oxigeno.

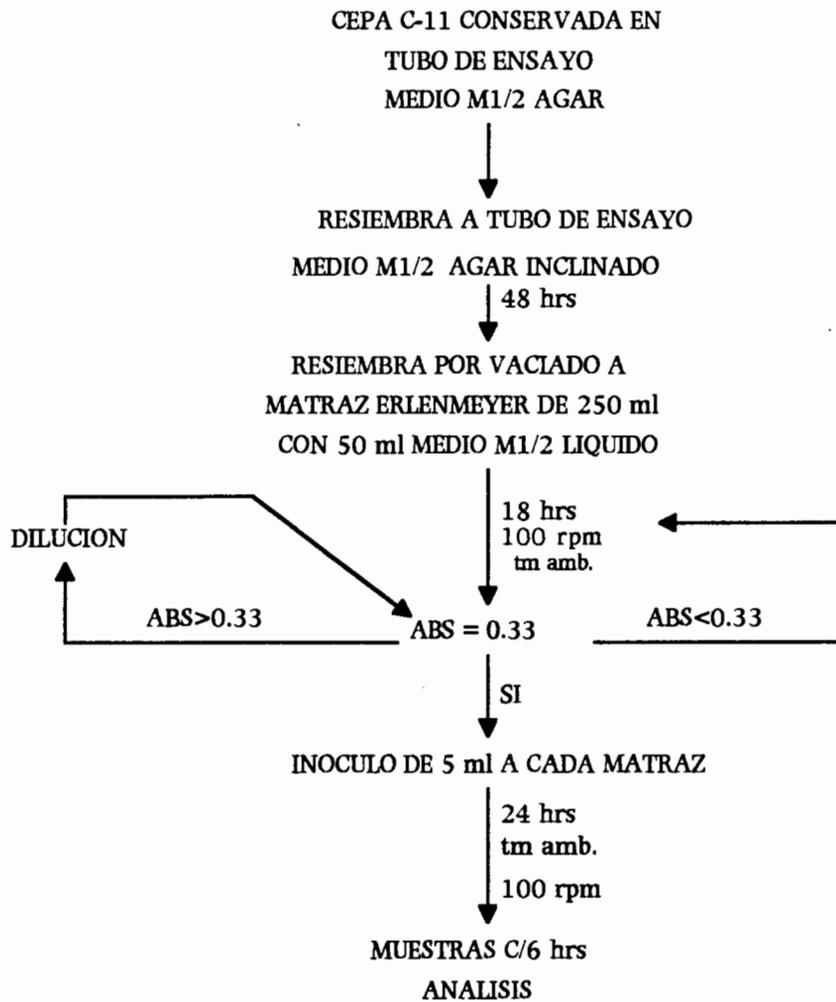
Se ensayaron tres concentraciones distintas de oxigeno aplicadas sobre el reactor: 0%, 20% y 100%. La primera concentracion de oxigeno (0%) se logro suspendiendo la aereacion al reactor y aplicando en su lugar gas nitrogeno, el cual se ha reportado inerte al crecimiento de la levadura. La segunda concentracion (20%) fue llevada a cabo bajo concentraciones normales de aereacion. La última (100%) fue lograda al inyectar oxigeno molecular en exceso sobre el reactor. Cada aplicacion de oxigeno o nitrogeno se empleo a la hora 24 de crecimiento, hora en que se lleva a cabo la mayor producción de la enzima SOD.

### 5.4.2 Sulfato de cobre

Este experimento se llevo a cabo de igual forma que la descrita en el esquema 2 (pag.. 23), solo que a la hora 24 de crecimiento, se inyecto sulfato de cobre al reactor para conseguir una concentracion final de 0.8 mM. Se determino la cantidad de proteinas por el método de Bradford (1976) y actividad enzimatica (apendice III) por 4 hrs, realizando muestreos cada 15 min. Para la evaluación de la actividad enzimatica el paquete celular fue dializado en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.8 con EDTA como secuestrador del cobre residual, por un período de 18 hrs. Posteriormente se corroboró la presencia de cobre en la muestra mediante un kit comercial para tal fin (Spectroquant Copper, EM SCIENCE).

### 5.4.3 Glicerol

Este experimento se llevo a cabo empleando glicerol en substitución de la glucosa como fuente de carbono. Se realizo la cinetica de crecimiento por 24 hrs evaluandose la cantidad de proteinas por el método de Bradford (1976) y actividad enzimatica de acuerdo con la tecnica descrita en el apendice III.



Esquema 1. Diagrama de flujo para efectuar cinéticas de crecimiento con *Deb. hansenii* en matraces Erlenmeyer de 250 ml.

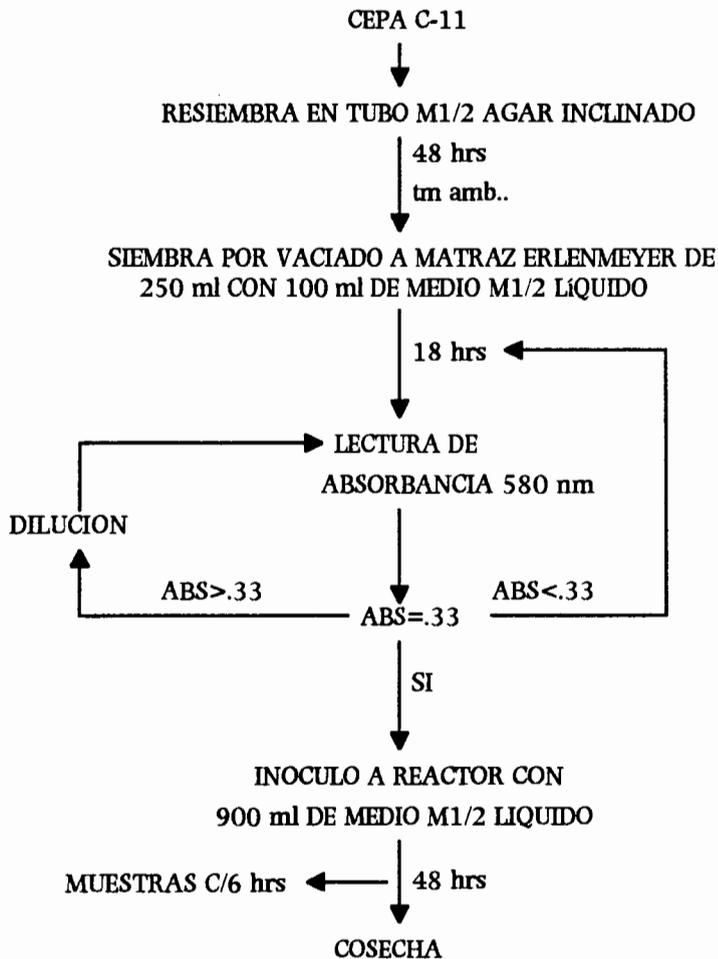


Diagrama 2. Diagrama de flujo para efectuar cinéticas de crecimiento con *Deb. hansenii* en un reactor químico de 2 lts.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1 MEDIO DE CULTIVO.

El interés primordial en efectuar este estudio, se basó sobre la idea general que prevalece en la utilización de medios de cultivo, cuya composición química sea completamente conocida por el investigador (medios definidos). Sin embargo, en ciertas ocasiones es conveniente sacrificar tales conocimientos si el resultado final así lo justifica. La densidad celular y el peso seco de la biomasa generada son sin duda alguna dos parámetros que reflejan el crecimiento celular a lo largo de una cinética de crecimiento. En la Figura 1a se puede observar fácilmente como la fase "lag" o de adaptación es prácticamente la misma para ambos medios, tanto para el YNB como para el M1/2. Sin embargo, a partir de las 6 primeras horas se inicia una diferenciación notable, en donde se observa como la levadura crece reproduciéndose con mayor facilidad sobre el medio M1/2 lo cual fue manifiesto al realizar una prueba "T" de

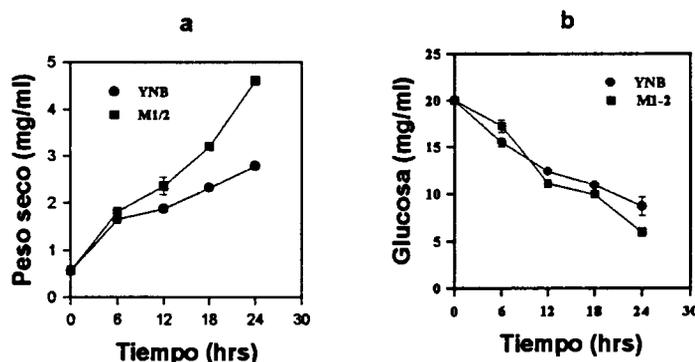


Fig 1. Cinética de crecimiento de *Deb. hanseni* en un medio enriquecido (M1/2), y uno definido (YNB): a) Incremento de peso seco, b) consumo de glucosa.

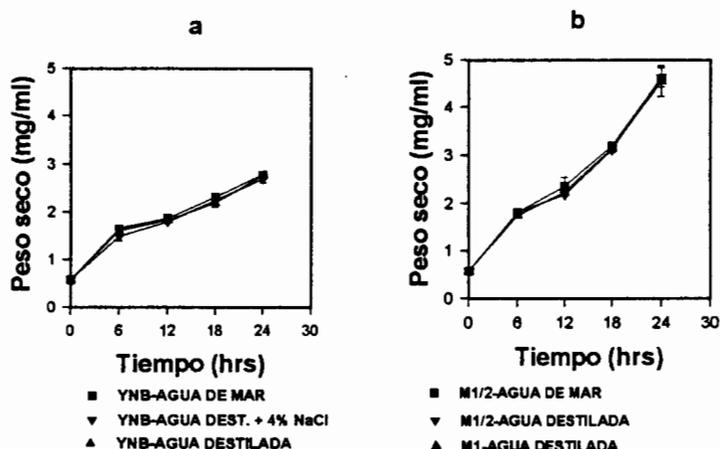


Fig 2. Efecto del solvente del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Deb. hanseni* : a) Medio YNB; b) Medio M1/2.

student " a las velocidades específicas de crecimiento de ambas cinéticas ( $P < 0.05$ ). En la Figura 1b queda marcado que el consumo de la fuente de carbono fue ligeramente superior en el medio M1/2 que el YNB ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, en las Figuras 2a y 2b se observa que el cloruro de sodio y las sales minerales presentes en el agua de mar no afectan ni merman la capacidad fisiológica y de reproducción de *Deb. hanseni*, hecho que resulta bastante favorable ya que al parecer no importa el medio solvente en que se pretenda cultivar esta levadura pudiéndose utilizar de igual manera el agua dulce ó el agua de mar (ANDEVA de una vía,  $P < 0.05$ ).

## 6.2 OPTIMIZACION DE FACTORES FISICO-QUIMICOS

### 6.2.1 Extracto de levadura y peptona.

Como se puede apreciar en las tablas IV y V (pág 27), no existe gran diferencia en los resultados obtenidos entre las formulaciones A1 y A6, siendo que la primera contiene peptona y la segunda no. De la misma manera, al realizar un análisis de varianza bifactorial a los valores representados en las tablas IV y V se obtiene que existe una

diferencia significativa entre las formulaciones  $F_1$  y  $F_6$ , con lo cuál queda claro que la levadura no puede crecer en ausencia de ambos nutrientes ( $P < 0.05$ ).

En las figuras 3a y 3b se resúmen las cinéticas más representativas de estos experimentos. En estas figuras es notorio cómo para todas las formulaciones existe una fase o período de adaptación de 6 horas, e inmediatamente después, se inicia la fase de reproducción exponencial, la cual ocurre para las formulaciones  $A_1$ ,  $A_6$  y  $B_3$  en un período de tiempo relativamente corto, de tan sólo 36 horas para posteriormente alcanzar la fase estacionaria en donde ya no hay mayor producción de biomasa, porque la fuente de carbono ha sido prácticamente agotada (Figura 3b). Por otra parte, en la figura 4 se aprecia que la ausencia de peptona o extracto de levadura no afectan la actividad de la enzima SOD. Sin embargo, la ausencia de ambos nutrientes al mismo tiempo provoca una disminución considerable en la actividad enzimática (ANDEVA una vía,  $P < 0.05$ ).

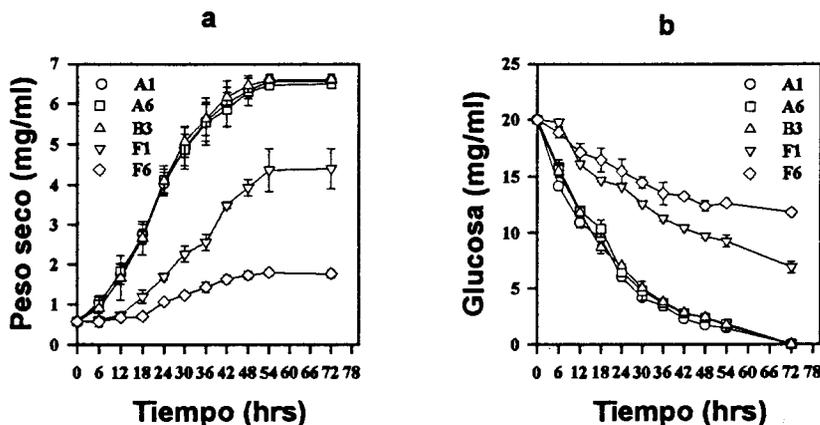


Fig 3. Cinética de crecimiento de *Deb. hansenii* bajo distintas formulaciones del medio M1/2: a) peso seco; b) consumo de glucosa. Medio completo ( $A_1$ ); medio sin peptona ( $A_6$ ); medio con peptona 0.3% y ext. de lev. 0.2% ( $B_3$ ); medio sin ext. de lev. ( $F_1$ ); medio sin extracto de levadura ni peptona ( $F_6$ ).

Tabla IV. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la levadura sobre las distintas formulaciones.

		PEPTONA						
		0.5%	0.4%	0.3%	0.2%	0.1%	0%	
		1	2	3	4	5	6	
EXTRACTO DE LEVADURA	0.25%	A	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
	0.20%	B	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08
	0.15%	C	0.08	0.07	0.08	0.08	0.07	0.07
	0.10%	D	0.08	0.06	0.08	0.08	0.08	0.07
	0.05%	E	0.06	0.06	0.06	0.05	0.04	0.03
	0%	F	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0

Tabla V. Biomasa total en las distintas formulaciones.

		PEPTONA						
		0.5%	0.4%	0.3%	0.2%	0.1%	0%	
		1	2	3	4	5	6	
EXTRACTO DE LEVADURA	0.25%	A	6.5	6.6	6.6	6.5	6.6	6.6
	0.20%	B	6.1	6.1	6.2	6.1	6	5.9
	0.15%	C	6.1	5.8	6	5.3	5.8	5.1
	0.10%	D	5.6	5.8	5.4	5	4.2	4.2
	0.05%	E	5.1	5	4.4	3.4	3.7	3.2
	0.00%	F	4.1	3.6	3.1	2.8	2.3	1.7

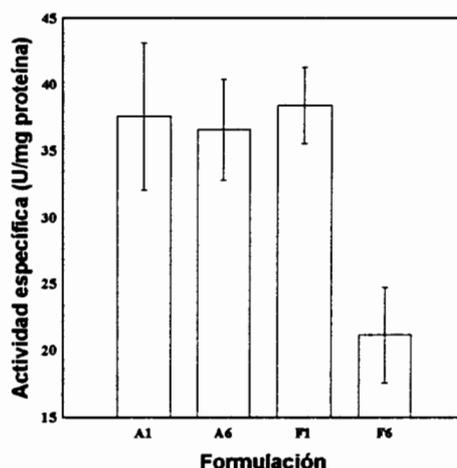


Fig 4. Efecto de los nutrientes (extracto de levadura y peptona) sobre la actividad de la enzima SOD, en *Deb. hansenii*.

### 6.2.2 Efecto del pH del medio de cultivo en la producción de biomasa y actividad de la enzima SOD en *Deb. hansenii*.

Para el caso de las cinéticas de crecimiento efectuadas con pH no controlado, se observa una ligera superioridad de crecimiento en el medio que partió con un pH de 5.0 sobre el resto de los medios (Fig. 5a, 5b). Sin embargo, al realizar un análisis de varianza sobre el parámetro de crecimiento  $\mu$  (fig. 6a), se observa que no existe diferencia significativa entre los valores de pH 5, 6 y 7 (ANDEVA una vía y Tukey,  $P < 0.05$ ). Por otra parte, al analizar la producción de biomasa total (fig. 6b), el análisis estadístico señala que no hay diferencia alguna entre los distintos tratamientos (ANDEVA una vía,  $P < 0.05$ ).

En cuanto a los medios en los que los niveles de pH fueron controlados, las diferencias son muy evidentes. En la Figura 7a se aprecia como a valores de pH extremos como lo son el de 4.0 y 9.0 el crecimiento de la levadura se ve seriamente afectado, lo cuál resulta en una marcada fase de adaptación al medio, de aproximadamente 18 horas, y en realidad la levadura muestra muy poca capacidad para reproducirse bajo estas condiciones. En las Figuras 7a y 7b podemos observar como la levadura muestra preferencia por valores de pH ligeramente ácidos, mostrando mayor capacidad de reproducción a pH de 5.0. En las Figuras 7c y 7d se representan los valores de los parámetros biomasa total y velocidad específica de crecimiento, así como sus desviaciones estándar.

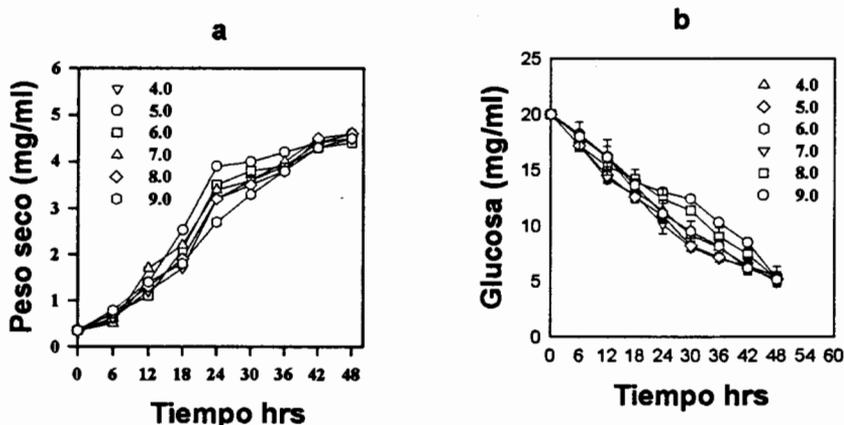


Fig 5. Cinética de crecimiento de *Deb.hansenii* a partir del medio de cultivo B3 bajo distintos valores iniciales de pH no controlado: a) en base a la biomasa; b) en base al consumo de glucosa.

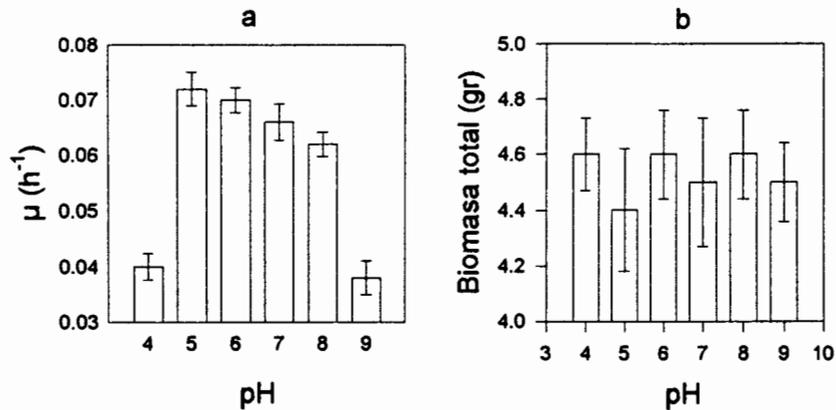


Fig 6. Parámetros de crecimiento para *Deb. hansenii* bajo distintos valores de pH no controlado: a) coeficiente de rendimiento celular ( $Y_x/s$ ); b) velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

En éstas se reafirma la preferencia de las células de levadura por los valores de pH ligeramente ácidos. En cuanto a la actividad de la enzima SOD, los valores máximos fueron obtenidos a pH de 5, 6 y 7 disminuyendo la actividad conforme se aleja de estos valores (Fig. 8).

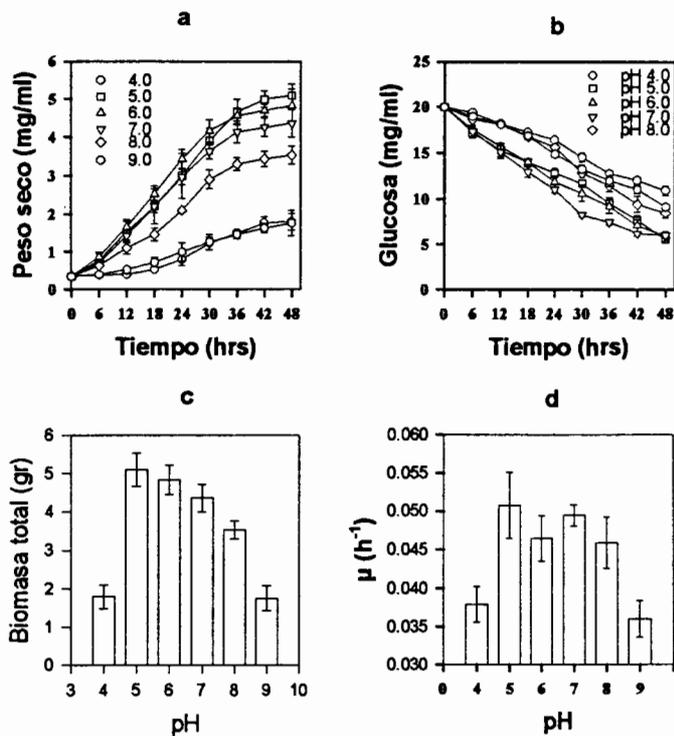


Fig 7. Cinética de crecimiento de *Deb. hanseni* bajo distintos valores de pH controlado ( $\pm 0.02$ ): a) Peso seco; b) consumo de glucosa; c) Biomasa total (gr); d) velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

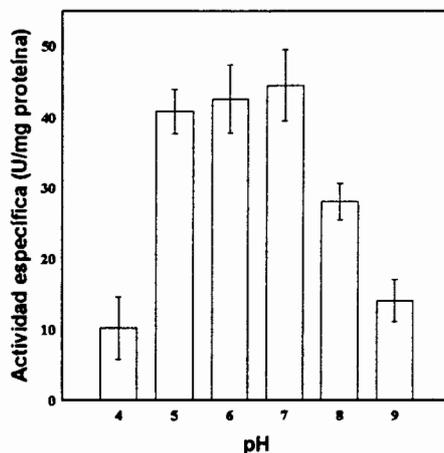


Fig 8. Efecto del pH del medio de cultivo sobre la actividad de la enzima SOD en *Deb. hansenii*.

### 6.2.3 Efecto de la velocidad de agitación en la producción de biomasa en *Deb. hansenii*.

En la Figura 9a se observa como la fase lag se prolonga cuando la velocidad de agitación es muy lenta (100 r.p.m.), aún cuando la levadura crece sobre un medio tan rico como lo es el medio B3 y el pH es el óptimo de crecimiento (5.0). La biomasa total es muy baja así como también la velocidad específica de crecimiento (Figuras 9c y 9d).

Al realizar un análisis de varianza de una vía y una prueba de Tukey a los valores representados en la figura 9c y 9d, se aprecia que existe diferencia significativa entre las medias, y que existen diferencias significativas aún entre las 500 y 700 r.p.m., siendo por lo tanto la velocidad de agitación óptima la de 500 r.p.m. ( $P < 0.05$ ).

En la Figura 10 se observa como la velocidad de agitación afecta la actividad de la enzima SOD. A velocidades bajas de agitación, la actividad es menor, y a velocidades altas de agitación la actividad aumenta sin que se observen diferencias significativas a velocidades de agitación de 500 y 700 r.p.m. (ANDEVA una vía,  $P < 0.05$ ).

#### **6.2.4 Efecto de la temperatura en la producción de la biomasa y actividad de la enzima SOD en *Deb. hansenii*.**

En las Figuras 11a y 11b se aprecia de inmediato cómo la levadura se desarrolla más a temperaturas de 30°C que a ninguna otra. Una temperatura de 10°C afecta notablemente a la reproducción de la levadura. A 40°C el efecto es muy similar, aunque a esta temperatura existe un crecimiento ligeramente mejor. A los 20 °C la levadura muestra mejor facilidad de asimilación de glucosa y de reproducción. A todas estas temperaturas, con excepción de los 30°C, se observa una fase de adaptación muy larga, de 24 horas, tiempo en el que finalmente se inicia la fase de crecimiento exponencial para los 20°C, sin embargo, bajo 30°C la fase de adaptación es tan sólo de 6 horas. Los análisis de biomasa total y velocidad específica de crecimiento (Figuras 11c y 11d) muestran una clara diferencia para una temperatura de 30°C con respecto al resto de tratamientos (ANDEVA una vía y Tukey,  $P < 0.05$ ). Por otra parte, la temperatura afecta directamente la actividad de la enzima SOD. A temperaturas de 30 y 40°C se observa la mejor actividad, siendo notablemente superior bajo este parámetro la de 40°C (Fig. 12).

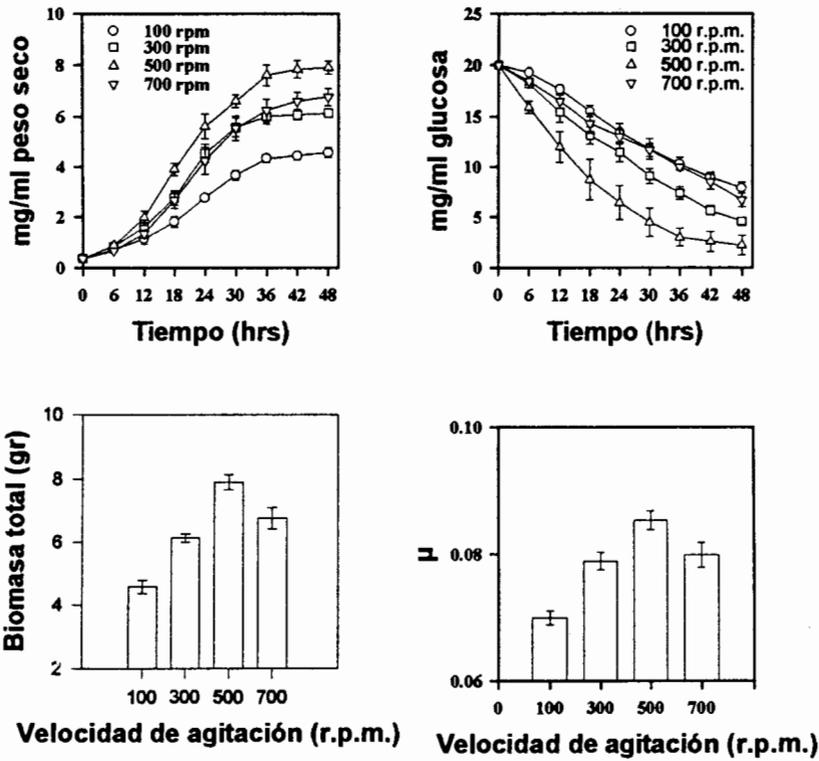


Fig 9. Cinética de crecimiento de *Deb. hansenii* bajo distintas velocidades de agitación: a) Peso seco; b) consumo de glucosa; c) biomasa total (gr); d) velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

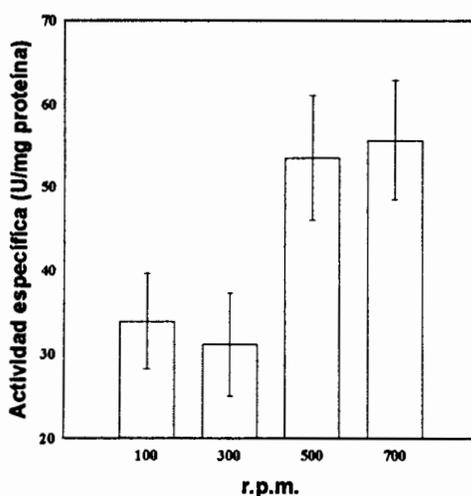


Fig 10. Efecto de la velocidad de agitación del medio de cultivo sobre la actividad de la enzima SOD en *Deb. hansenii*.

### 6.2.5 Efecto de la aereación sobre la obtención de biomasa y actividad de SOD en *Deb. hansenii*.

La aereación tiene más o menos los mismos efectos que la velocidad de agitación. Si el flujo de inyección del aire es muy bajo, la cantidad de oxígeno disuelta en el medio de cultivo no es lo suficiente como para soportar el crecimiento de la levadura (Figura 13a y 13b). En estas figuras se aprecia que aún cuando la levadura se encuentra creciendo bajo condiciones óptimas de medio de cultivo (B3), pH (5.0) y velocidad de agitación (500 r.p.m.), la levadura crece muy levemente. Por el contrario, si el flujo de inyección de aire es excesivo, esto provoca también la formación de una gran cantidad de burbujas, así como de espuma. Al realizar el análisis estadístico de varianza de una

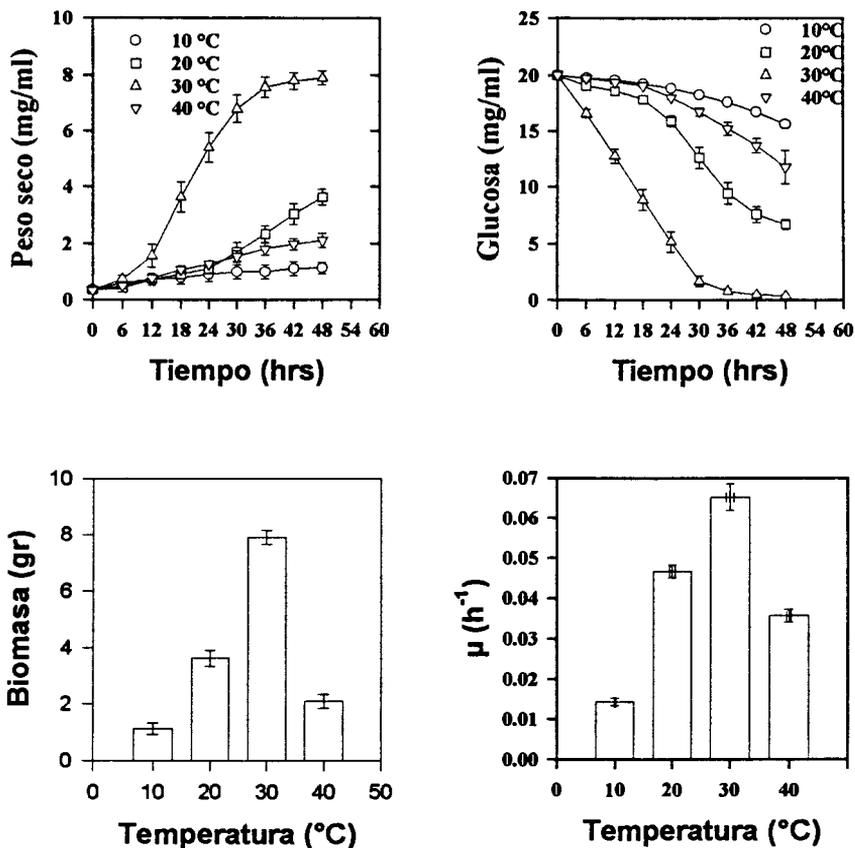


Fig 11. Cinética de crecimiento de *Deb. hansenii* bajo distintas temperaturas de incubación ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ): a) peso seco; b) consumo de glucosa; c) Biomasa total (gr); d) velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

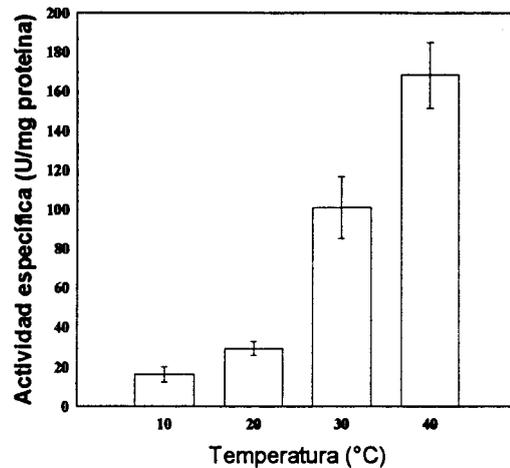


Fig 12. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de la enzima SOD en la levadura marina *Deb. hansenii*.

vía para los valores representados en las Figuras 13c y 13d, éste nos señala que no existen una diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). Al realizar el análisis de Tukey, este nos señala diferencias aún entre los 5 y 7 l/min ( $P < 0.05$ ). El aire inyectado al sistema afecta notablemente la actividad de SOD (Fig 14) aumentando aproximadamente 5 veces la actividad una aereación de 5 y 7 L/min, sin que entre estas exista diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

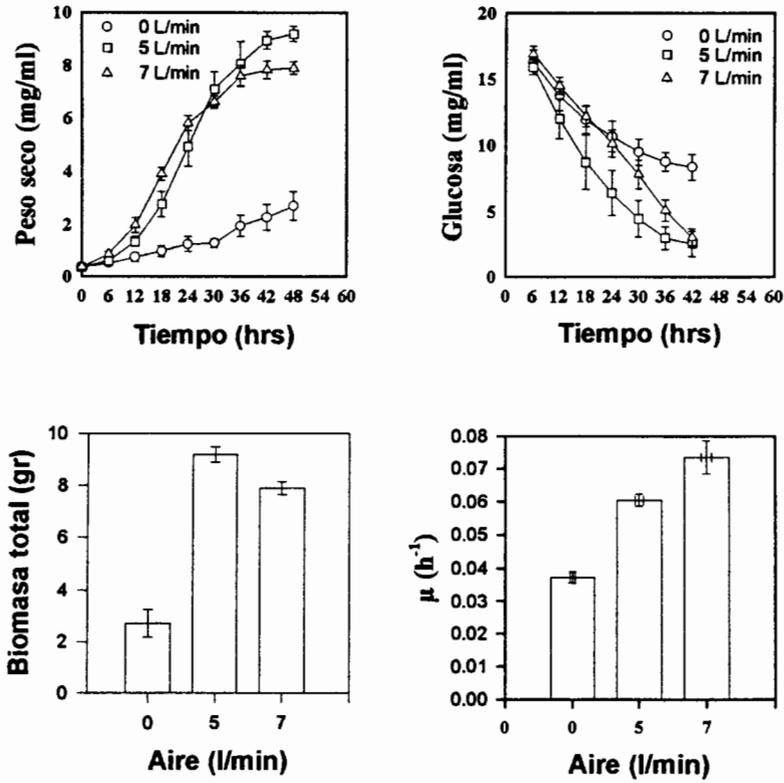


Fig 13. Cinética de crecimiento de *Deb. hansenii* bajo distintos flujos de inyección de aire: a) peso seco; b) consumo de glucosa; c) biomasa total (gr); d) velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

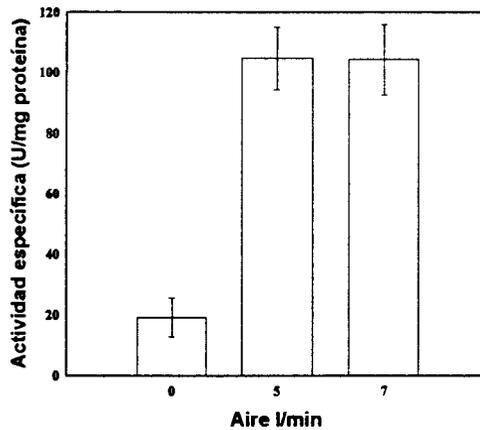


Fig 14. Efecto de el flujo de aereación sobre la actividad de la enzima SOD en *Deb. hansenii*.

### 6.3 EFECTO DEL DIOXIDO DE CLORO SOBRE LA PRODUCCION DE BIOMASA Y ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOD EN *Deb. hansenii*.

#### 6.3.1 En cultivos solidos.

En la tabla VI se aprecia que la efectividad del Halox como inhibidor de crecimiento de una cepa de *Sacch. cerevisiae* se manifiesta a concentraciones incluso de 1.3 mg/ml. Los resultados expresados en la tabla VII, por otro lado, señalan que a ninguna de las concentraciones ensayadas de Halox fue inhibido el crecimiento de la levadura *Deb. hansenii*. No obstante, se pudo apreciar a concentraciones de 13, 65 y 130 mg/ml un halo de inhibición tenue con crecimiento de colonias posiblemente tolerantes.

#### 6.3.2. En cultivos líquidos.

Con la finalidad de corroborar la eficiencia del Halox E-100<sub>TM</sub> como agente inhibidor al crecimiento de organismos contaminantes en cultivos de *Deb. hansenii*, se probaron cultivos preparados sobre soluciones a distintas concentraciones de Halox. Los resultados se pueden observar en la tabla VII. En esta tabla es evidente que a concentraciones de 1.3 mg/ml son suficientes para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes. Sin embargo, en la Figura 15 se observa que el crecimiento de la levadura bajo estas diluciones de Halox se ve notablemente afectado, razón por la cuál se decidió ensayar una dilución intermedia (0.52 mg/ml), encontrándose que los resultados de contaminación por bacterias fueron negativos y al realizar el análisis estadístico sobre la velocidad específica de crecimiento, se encontró que el crecimiento de la levadura no fue afectado en una medida significativa con respecto al control (0 mg de ClO<sub>2</sub>/ml), (T-student, P<0.05).

Ahora bien, puesto que la intención fue generar un proceso de obtención de biomasa con fines de extraer de ella la enzima Superóxido Dismutasa, fue necesario verificar el efecto del Halox sobre la actividad de dicha enzima (Fig 16), y al realizar el análisis estadístico de sobre estos resultados, no se detectaron diferencias significativas entre las dos curvas de actividad (P<0.05).

Tabla VI. Halo de inhibición de *Sacch. cerevisiae* y *Deb. hansenii* al emplear Halox E-100<sub>TM</sub> sobre su crecimiento en placas de Petri con agar.

ClO <sub>2</sub> en el sensidisco (mg/ml)	HALO DE INHIBICION	
	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Deb. hansenii</i>
130	29 mm	10 mm*
65	23 mm	6 mm*
13	13 mm	5 mm*
1.3	6 mm	---
0.13	---	---
0.013	---	---

\*Con crecimiento de cepas tolerantes.

Tabla VII. Efecto de Halox E-100<sub>TM</sub> sobre la viabilidad de bacterias contaminantes presentes en cultivo de la levadura marina *Deb. hansenii* en matraces Erlenmeyer. El número de cruces indica el grado de contaminación.

ClO <sub>2</sub> en el sensidisco (mg/ml)	Tiempo de incubación (hrs)						
	6	12	18	24	30	36	48
130	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
1.3	-	-	-	-	-	-	-
0.13	+	++	++	++	+++	+++	+++
0.013	+	++	+++	++++	++++	++++	++++
0	+	++	+++	++++	++++	++++	++++

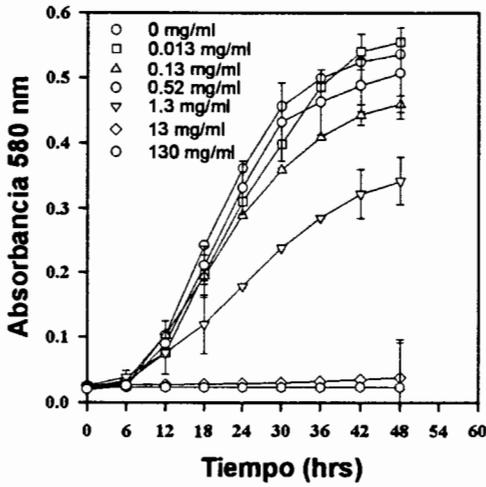


Fig 15. Efecto de Halox E-100 a distintas concentraciones, sobre el crecimiento de *Deb. hansenii*, cinéticas desarrolladas en matraces Erlenmeyer.

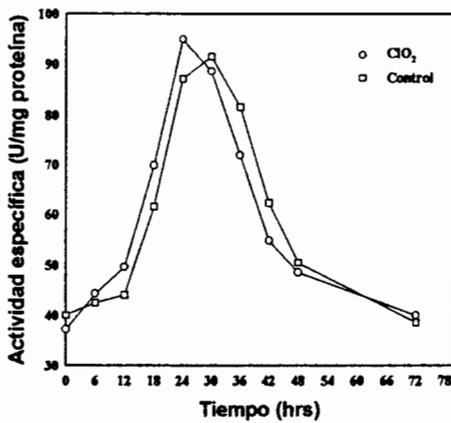


Fig 16. Efecto del dióxido de cloro (0.52 mg/ml) presente en el medio de cultivo sobre la actividad de la enzima SOD en condiciones basales.

## 6.4 EVALUACION DE INDUCTORES PARA INCREMENTAR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOD

Para iniciar los estudios de la posible inducción de la actividad de la enzima, fue necesario estudiar en primera instancia la actividad de la enzima bajo condiciones normales. En la Figura 17 se puede apreciar el patrón de la actividad enzimática a lo largo de una cinética normal (pH 5.0; O<sub>2</sub> 20 %; 30°C; 500 r.p.m.). En las primeras 12 horas se presentan los valores más bajos de actividad, encontrándose los picos más altos sobre la hora 24 y la hora 30, lo cuál corresponde a la fase logarítmica media superior de crecimiento. Finalmente la actividad enzimática tiende a decaer hasta alcanzar valores muy similares a los del inicio de la cinética de crecimiento.

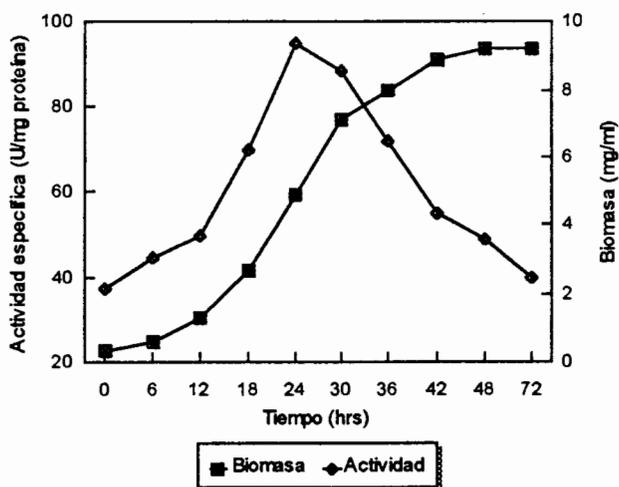


Fig 17. Actividad de la enzima SOD a lo largo de una cinética de crecimiento de *Deb. hansenii* en condiciones normales (pH 5.0; O<sub>2</sub> 20 %; 30°C; 500 rpm), mediante el ensayo X-Xo.

### 6.4.1 Oxígeno.

Al ser la SOD una proteína destinada a eliminar los radicales libres producidos principalmente en la cadena respiratoria, era de suponer que adicionando o saturando el ambiente con oxígeno por un período corto de tiempo, las células de la levadura responderían a esta condición sintetizando mayor cantidad de enzima SOD. En la Figura 19, se aprecia el efecto de inyectar oxígeno molecular dentro del reactor.

Como podemos observar en esta figura la actividad tiende a bajar en los primeros 30 minutos para posteriormente iniciar un incremento de actividad notable, hasta alcanzar su punto pico 1.5 horas después de iniciado el tratamiento (300% de inducción) y finalmente, la actividad disminuye a un 200%.

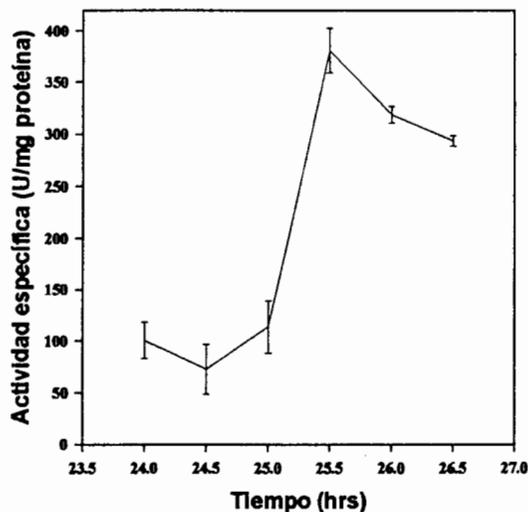


Fig 18. Actividad de la enzima SOD tras una inyección de oxígeno 100 % por un periodo de 2.5 horas, aplicado sobre la hora 24 de crecimiento.

### 6.4.2 Sulfato de cobre.

El sulfato de cobre fue adicionado a la hora 24 de un cultivo de *D. hansenii*, la actividad se determinó cada 30 minutos durante la primer hora, encontrándose que los valores más altos de actividad se registraron a los 30 minutos de la adición (Figura 18), con una elevación de la actividad de la enzima a aproximadamente 4 veces. Posteriormente, la actividad de la enzima decrece en un 50 %, sin embargo estos valores de actividad continúan siendo elevados en comparación con los valores de una cinética de crecimiento en ausencia de la sal de cobre (Figura 17).

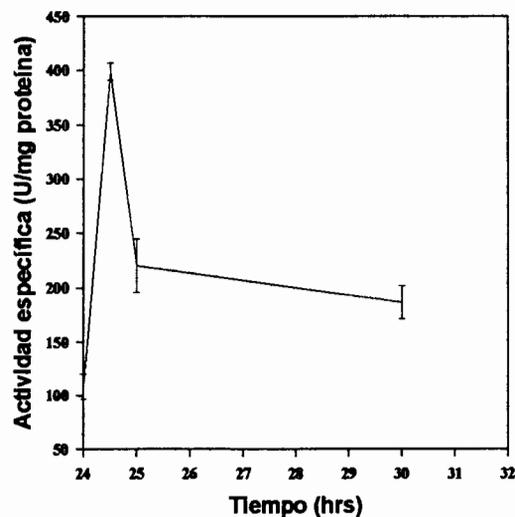


Fig 19. Actividad de la enzima SOD tras un pulso de sulfato de cobre (0.8mM) aplicado a la hora 24 de crecimiento.

### 6.3 Glicerol

El glicerol es un compuesto que ya ha sido utilizado previamente como fuente de carbono para algunas levaduras. En la Figura 20 se aprecia que la actividad de la enzima SOD se ve incrementada en relación con la glucosa. El máximo valor de actividad se encuentra de nuevo en la fase logarítmica correspondiente a la hora 24 y hora 30 de crecimiento. Sin embargo, la obtención de biomasa es ligeramente superior que cuando se emplea glucosa como fuente de carbono.

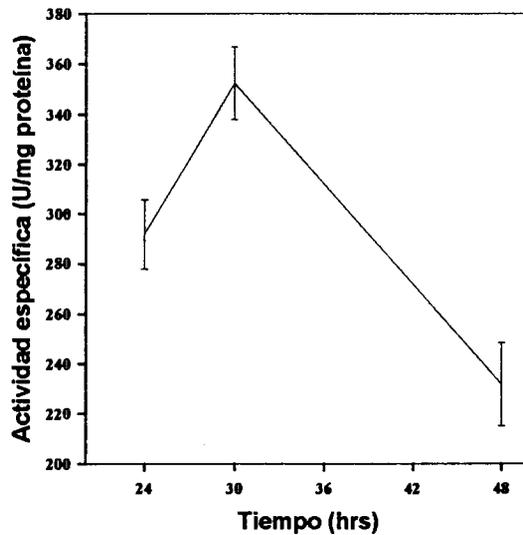


Fig 20. Actividad de la enzima SOD en un cultivo de *Deb. hanseni* empleando glicerol en sustitución de glucosa como fuente de carbono.

## 7. DISCUSION

### 7.1 MEDIO DE CULTIVO.

Aunque el medio M1/2 sea de composición química no definida, su empleo resulta más apropiado para fines de obtención de biomasa que los del medio YNB, en donde se tiene conocimiento exacto de los constituyentes químicos del mismo. En ambos medios la fuente de carbono fue un monosacárido y, por tanto fácilmente asimilable por la célula desde el punto de vista energético. En el medio M1/2 existió un mejor aprovechamiento de las moléculas de glucosa asimiladas, convirtiéndolas en nuevas células, como se deduce del rendimiento de biomasa generada. Esto tiene explicación obviamente en el contenido de los factores de crecimiento presentes en el extracto de levadura, los cuales promueven el desarrollo de *Deb. hansenii*.

Por otra parte, los resultados reportados por Norkrans (1966) y por Hobot y Jennings (1981) señalan que *Deb. hansenii* es una levadura muy hábil para crecer en medios que contengan altas concentraciones de sal (34 y 44 ppm, respectivamente), sin embargo esto afecta de manera marcada la tasa (o velocidad) específica de crecimiento, incrementándose la fase lag o de adaptación por un período largo de tiempo de hasta 12 horas. Nuestros resultados sin embargo van en desacuerdo con estos trabajos, ya que la levadura C-11 creció de igual manera en el medio elaborado con agua destilada como en el elaborado con agua de mar (35 ppm). En ambos la fase lag o de adaptación fue de tan solo 6 horas, iniciándose de inmediato la fase de crecimiento exponencial. Esta propiedad que presentó la cepa C-11, es sin duda alguna, una ventaja para fines de producción de biomasa, ya que igualmente puede ser producida con agua dulce que con agua de mar.

## 7.2 OPTIMIZACION DE LOS FACTORES FISICO-QUIMICOS PARA LA OBTENCION DE BIOMASA.

### 7.2.1 Extracto de levadura y la peptona.

El medio **M1** es un medio que ha sido utilizado con buen exito para generar biomasa de levaduras (Hernandez, 1990); sin embargo, en trabajos previos (Ochoa et al., 1995) se logro reducir la **concentración** de los nutrientes extracto de levadura y peptona a la **mitad** (medio que llamamos **M1/2**), obteniendose el mismo rendimiento que en el medio original. En el presente trabajo se demuestra que la peptona, fuente de nitrogeno del medio, no es un nutriente indispensable cuando el extracto de levadura se encuentra presente en concentraciones iguales o **mayores** a 0.25 %. Lo anterior puede explicarse en el **sentido** de que Deb. *hansenii* puede metabolizar **los** aminoacidos presentes en el extracto de levadura para obtener el **nitrógeno** indispensable para la sintesis de las proteinas que constituiran las nuevas **células** de levaduras. Sin embargo, el extracto de levadura **sí** es un nutriente indispensable, ya que **al** eliminarlo del medio de cultivo la produccion de biomasa pierde eficiencia hasta en un 50 % (Tabla V).

La **composición** de los medios de cultivo no afecto en **modo** alguno la actividad de la enzima SOD de Deb. *hansenii*, sin embargo, cuando se encontraron ausentes **al** mismo tiempo el extracto de levadura y la peptona, la actividad de la enzima disminuyo considerablemente. Esta respuesta celular puede deberse a la **condición** de estres bajo la cual fueron sometidas las celulas. **Al** encontrarse las celulas **sobre** un medio de cultivo que carece de **los** nutrientes indispensables para la sintesis de proteinas y nuevos compuestos celulares, la levadura se reproduce solo en su **primera** generacion mediante un proceso de gemacion. Sin embargo, despues de la **primera** generacion, las **células** son incapaces de sintetizar nuevo material celular para transferirlo a las celulas hijas o a su progenie, por lo **tanto** el exito de la **reproducción** **llega** a su fin, y en consecuencia la **producción** de todas las enzimas metabolicas incluyendo la superoxido dismutasa. **Quizás** esta disminucion de la actividad detectada en la Figura

4, sea el reflejo de la inminente muerte celular que toma lugar en un medio de cultivo con las características del medio F6 (peptona 0%, extracto de levadura 0%).

Al realizar el análisis estadístico bifactorial para las tablas IV y V, se obtiene que existe diferencia significativa entre los tratamientos, así como también, que existe dependencia entre ambos nutrientes (ANDEVA dos vías,  $P < 0.05$ ). El análisis de Tukey para estos mismos datos nos indica que no existe diferencia significativa entre los niveles A (1 a 3), B (1 a 6) y C (1,2,3), ( $P < 0.05$ ). Por estas razones, y en virtud de que el objetivo fue optimizar ambos nutrientes con miras a economizar en lo posible la obtención de biomasa de la levadura sin afectar el rendimiento, es que se procedió a elegir la fórmula C3, la cuál contiene como fuente de carbono glucosa 2 %, como fuente de nitrógeno peptona 0.3 %, y como fuente de vitaminas extracto de levadura 0.15 %.

### 7.2.2 pH.

Se ha reportado y es de conocimiento común que las levaduras crecen bien entre valores de pH de 3.5 a 6.5 (Ingram, 1955), aunque su rango de crecimiento se extiende a valores de pH de 0.9 a 11 (Davenport, 1980). Por otra parte, algunas levaduras como *Schizosaccharomyces* spp, han mostrado una mayor restricción sobre los requerimientos de pH y están restringidas a un pH de 5.45 (Battley y Bartlett, 1966) o *Torulopsis pintolepessi* que crece a pH de 0.9 a 1.1 (Uden y Vidal, 1970). Davenport (1980) señala que no debe ser tomado en cuenta como óptimo el pH en el cuál son aislados los microorganismos. Así, mientras el pH del agua de mar en el Pacífico oscila de 8 a 8.7, *Deb. hansenii* ha mostrado poseer un amplio rango de tolerancia a las condiciones adversas del pH, creciendo o tolerando valores de pH entre 4 y 9 (fig 7a). En los valores extremos de este rango, las células tan solo crecen y se reproducen muy someramente, aún al crecer sobre un ambiente tan rico en nutrientes como lo es el medio B3. En el caso del cultivo en un medio con pH no controlado no se observó diferencia entre los distintos valores ensayados. Sin embargo, en las primeras horas

del cultivo existio una ligera ventaja en el crecimiento en el medio con pH 5.0 sobre el resto de los valores de pH ensayados. Esto podría explicarse considerando que la levadura pudiera liberar acidos organicos durante su metabolismo los cuales tienden a acidular el medio hasta alcanzar los valores de pH de 6 y 5 en donde la tasa de crecimiento celular aumenta a su maximo culminando al final de la cinetica en una productividad similar para todos los medios de cultivo ensayados entre pH de 4 a 8.

Por otra parte, contrario a los resultados de Hobot y Jennings (1981), donde concluyen que la produccion de celulas de *Deb. hansenii* se incrementa mediante el aumento de pH a 8.3 (siendo el optimo el de 7.2), y Tilbury (1980), quien afirma que los mohos y las levaduras tienen un rango mas estrecho de tolerancia al pH y muy poca habilidad para crecer bajo condiciones acidicas en habitats salinos, Norkrans (1966) encontró que *Deb. hansenii* crece mejor a pH ligeramente acido, y en nuestro particular caso, encontramos que *Deb. hansenii* cepa C-11 presenta crecimiento abundante en un rango de pH que va de 5 a 7, siendo el optimo de aprovechamiento de la fuente de carbono en la produccion de biomasa el de 5.0 cuando el pH estuvo controlado desde un inicio. Tambien observamos, finalmente, que es preferible controlar el pH a lo largo de la cinetica de crecimiento que cultivar en un medio con pH no controlado.

El efecto del pH del medio de cultivo sobre la actividad de la enzima SOD indica una estimulacion a su produccion a valores de pH ligeramente acidos (5,6 y7). A valores de pH de 8 o superiores la actividad disminuye significativamente (ANDEVA,  $P < 0.05$ ), al igual que a valores inferiores a 5. Estos resultados muestran cierta semejanza con los valores encontrados por Sanders et al. (1995) en un estudio sobre la respuesta de una bacteria al estres, encontrando que los valores mas altos de actividad se presentaron a un pH de 4.8. El por que la actividad de la enzima se incrementa bajo estos valores de pH no es claro, quizás obedezca al hecho de que bajo estos mismos valores de pH el crecimiento de la levadura es favorecido, incrementando por lo tanto la demanda por el oxígeno y, por ende, la produccion de radicales libres.

### 7.2.3 Velocidad de agitación.

La velocidad de agitación es un parámetro muy importante dentro de los procesos de fermentación/asimilación. En un proceso bien agitado se debe estimar la velocidad óptima que promueva el crecimiento y la **máxima reproducción** del organismo en estudio, si no por la difusión del oxígeno, **sí** por la distribución homogénea de células a **través** del reactor. Si la velocidad de agitación es lenta, esto **permite** que las células no se distribuyan adecuadamente a través del medio de cultivo y cuando la población se **incrementa**, una gran **cantidad** de la población celular sedimenta, impidiendo de esta **manera** la eficiente **interacción** sustrato-microorganismo.

Por otra parte, si la velocidad de agitación es excesiva, esto provoca la formación de burbujas de aire de diámetro considerable, lo cual afecta produciendo espacios muertos entre el medio de cultivo y la levadura. Otro efecto negativo de una velocidad de agitación excesiva, es la formación de espuma. Esta espuma es consecuencia de la presencia de proteínas en el medio de cultivo y tiene efectos no deseados, ya que atrapa las células de levadura elevándolas fuera del **contacto** con el medio de cultivo y por lo **tanto** no hay asimilación de nutrientes y por supuesto, **replicación** celular.

En la Figura 9c y 9d en donde se expresa la biomasa total y la biomasa total encontramos que existe diferencia significativa entre las medias de los distintos tratamientos (ANDEVA,  $P < 0.05$ ), mientras que la **prueba** de Tukey **señala** que existe diferencia significativa entre las 500 y las 700 r.p.m.. Dado que el valor más alto lo encontramos en una velocidad de agitación de 500 r.p.m., se concluye que la velocidad de agitación óptima para el medio de cultivo es de 500 r.p.m.

Por otra parte, **como** ya se menciona, el aire no es homogeneizado con **eficiencia** cuando la velocidad de agitación es muy lenta. Por lo **tanto**, el oxígeno disponible es **menor**. A altas velocidades de agitación se **permite** una mejor distribución del aire a

traves del reactor, y por tanto, es dispuesto con mayor eficiencia para las celulas. Este efecto se observa en la Figura 10, en donde la actividad de la enzima muestra sus valores mas altos a velocidades de agitación de 500 y 700 r.p.m. (ANDEVA,  $P < 0.05$ ).

#### 7.2.4 Temperatura.

La temperatura es indudablemente uno de los parametros ambientales mas importantes que influyen en todas las actividades de los microorganismos, y las levaduras no son la excepción (Watson, 1987). Las levaduras pueden ser encontradas en muchos habitats, por ejemplo animales, superficies de plantas, agua dulce, ambientes marinos, mar Antartico, nieve, bebidas, alimentos, suelos, liquidos curtidos, aceites minerales, etc. (Davenport, 1982), situación que nos indica, entre otras muchas cosas, el rango de temperaturas tan variado que pueden soportar. Generalmente las levaduras toleran temperaturas que van de 0 a 40°C, con un promedio optimo de 27°C (Tilbury, 1980). Igual que para el pH, las temperaturas prevalecientes en los habitats de los cuales las levaduras son aisladas, no deben considerarse como las optimas para su crecimiento y reproduccion. En los resultados de estos experimentos se puede apreciar claramente como el crecimiento optimo de *Deb. hansenii* se ve restringido entre los 30°C, aljn cuando es habil para crecer, aunque muy levemente, a los 10°C.

El crecimiento de *Deb. hansenii* a 20°C es bueno (Fig. 11a), razon por la que podría ser considerada psicrofila facultativa (Farrel y Rose, 1967), aljn a los 40°C muestra capacidad de reproducción, aunque con una fase lag muy prolongada (30 horas), (Fig. 11a), por lo que podría ser considerada como termotolerante. Dado que situaciones como estas son muy frecuentes, Watson (1987), propone que los terminos psicrofilo facultativo y termotolerante deberian desaparecer ya que solo agregan confusion a la literatura. Señala tambien que las levaduras que son capaces de crecer de 10 a 48°C deberian ser clasificadas como mesofilicas. Al analizar las Figuras 11a y 11b, se aprecia que *Deb. hansenii* puede crecer a temperaturas de los 10 a los 40°C, y al analizar los valores numericos de la velocidad específica de crecimiento y el

total presentados en las Figuras 11c y 11d, la levadura puede ser considerada como mesofílica cuya temperatura óptima de crecimiento es 30°C (ANDEVA, P<0.05).

La temperatura afecta notablemente la actividad de la enzima SOD incrementándose de 30" a 40°C un 50% (fig. 12). Este mismo efecto fue observado en una cepa de *Porphyromona. gingivalis*, quien mostro un incremento de actividad SOD hacia los 40°C (Amano et al., 1994). Estos resultados indican que la SOD es inducible bajo condiciones de estrés por temperatura, probablemente por una activación a nivel genético.

### 7.2.5 Aereación.

La mayoría de las levaduras pueden crecer facultativamente como anaerobias, aunque crecen más fácilmente bajo condiciones aerobias (Tilbury, 1980). Existe alguna literatura en la cual se ha reportado que *Deb. hansenii* es excepcional en su habilidad para crecer en cultivos anaerobios (Javor, 1989), sin embargo, nuestros resultados muestran lo contrario. En la Figura 13a, se observa una prolongada fase lag en el cultivo en el cuál no existió inyección de aire (0 Umin), y aunque en esta figura se aprecia un leve crecimiento, en realidad este es una consecuencia de la velocidad de agitación, la cuál permitió remover todo el oxígeno presente en el sistema. La afirmación anterior fue confirmada por experimentos posteriores en los cuáles se creó un ambiente anaerobio en el reactor, y se adicionó al medio de cultivo Tween 80 y ergosterol (SIGMA) para la síntesis de esteroides por la levadura. Los resultados indicaron que no existió crecimiento alguno por la levadura en estas condiciones (datos no mostrados).

Finalmente, tanto los valores de velocidad específica de crecimiento como los de la biomasa total señalan que existe un mejor aprovechamiento de la fuente de carbono cuando se suministra al sistema una inyección de 5 l/min. Alteraciones en la tasa de

aeración han sido reportados como inductores de la actividad de la enzima SOD (Chamnongpol et al., 1995). En nuestros resultados se observa que esta inducción ocurre a tasas altas de inyección de aire, y sugerimos que **quizás** esta inducción **sean** en **realidad** una consecuencia de la **alta** concentración de oxígeno que se genera en el reactor.

Hasta este punto, la levadura ha mostrado un rendimiento celular comparable con el reportado para otras levaduras, **tanto** *Sacch. cerevisiae* como otras levaduras presentan un rendimiento promedio de 46 % en base a la fuente de carbono, lo mismo que *Deb. hansenii*.

### **7.3 USO DEL DIOXIDO DE CLORO (HALOX) COMO VIA ALTERNA A LA ESTERILIZACION.**

El dióxido de cloro ha sido utilizado desde **hace** ya muchos **años** como blanqueador y en suministros de agua para combatir sabores y olores debidos a desechos de tipo **fenólicos**, actinomicetos y algas (Wilde et al., 1983; Harakeh et al., 1988). **Incluso**, se ha encontrado que es mas efectivo contra bacterias, algas y hongos, que **los** compuestos clorados convencionales para este objeto (Harakeh et al., 1988). En este trabajo queda claro que a concentraciones bajas, de aproximadamente 0.52 mg/ml de dióxido de cloro, se **inhibe** el crecimiento de bacterias contaminantes, sin afectar el crecimiento de *Deb. hansenii*. Aunque las concentraciones recomendadas para el tratamiento de desinfección de las redes de agua potable en Europa, recomiendan una concentración del 0.5 % de dióxido de cloro a lo largo de la red, pareciera que la concentración empleada por nosotros fuera muy baja (0.026%). Sin embargo, la efectividad para eliminar bacterias contaminantes esta aunada **al** empleo de agua de mar, asi como **al** pH ácido del medio de cultivo. Por otra parte, en un estudio previo se **determinó** el efecto del dióxido de cloro **sobre** 20 cepas de levaduras marinas pertenecientes a la **colección** de cepas del **CIBNOR**, encontrandose que la cepa que **mostró** mayor resistencia a **los** efectos toxicos del dióxido de cloro fue precisamente

**Deb. hansenii.** Estos resultados ayudan y fortalecen la idea del empleo del dióxido de cloro como una vía **alterna** a la esterilización en los procesos de obtención de biomasa de **Deb. hansenii**, cepa C-11, para la **producción** de la enzima superóxido dismutasa, ya que acorde con nuestros resultados (fig 16), el dióxido de cloro no tiene el **menor** efecto **sobre** la actividad de dicha enzima ( $P < 0.05$ ).

## 7.4 EVALUACION DE INDUCTORES PARA INCREMENTAR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOD

Los resultados encontrados en este trabajo indican que bajo condiciones normales, la levadura inicia su crecimiento con una baja actividad enzimática, lo cual puede explicarse en el **sentido** de que en esta fase de crecimiento, la actividad metabólica de la célula está básicamente enfocada a regular la maquinaria bioquímica de síntesis de enzimas para metabolizar el sustrato del medio de cultivo. Inmediatamente después se inicia el crecimiento y la **reproducción celular**, con lo cual se alcanza la fase logarítmica de crecimiento, fase en la cual la **cantidad** de células aumenta considerablemente y en un **orden** matemático más o **menos** constante. Como el **número** de **células** es muy elevado, la demanda por el oxígeno también lo es. De esta **manera**, en la Figura 17 se aprecia como la **máxima** actividad enzimática se registra en la fase superior de la **etapa** logarítmica de crecimiento, la cual corresponde de la hora 24 a la hora 30 de cultivo. Por este motivo, se **determinó** ensayar los experimentos de inducción en este **período** de crecimiento.

### 7.4.1 Oxígeno.

La máxima eficiencia de una maquinaria bioquímica está modulada por la **cantidad** de alguna enzima en particular, necesaria para actuar **sobre** su sustrato. La célula gasta su energía en sintetizar las enzimas necesarias para atacar **los** sustratos que se encuentren presentes en aquel **momento**. Por lo **tanto**, la inducción de la biosíntesis de una enzima por una **célula**, puede ser llevada a **cabo** mediante la **adición** de su

substrato particular (Fridovich, 1982). En la Figura 19 se aprecia como a los 30 minutos de la adición del oxígeno existe un **decremento** en la actividad de la enzima. Esto **quizás** obedezca a la **brusca** adición de un compuesto que en exceso es altamente tóxico, como lo es el oxígeno. Sin embargo, 30 minutos más tarde la **célula** se ha repuesto de ese brusco **cambio** ambiental nivelando los valores **normales** de enzima SOD para contra-atacar los productos tóxicos derivados del oxígeno molecular.

La presencia de la enzima SOD en levaduras fue reportada en primer instancia por Fridovich et al. en 1974, 5 **años** después del descubrimiento de dicha enzima. En ese trabajo, se estudió el efecto del oxígeno **sobre** la actividad de la enzima en la levadura ***Sacch. cerevisiae***. Bajo condiciones **normales** de oxígeno (20%), la levadura **presentó** 2.5 unidades de actividad en base al contenido de proteínas (U/mg proteína) en extracto crudo. Una vez aplicado oxígeno molecular, se **observó** un **incremento** a 8.6 U/mg de proteína, es decir un **incremento** a 3.4 veces la actividad. En nuestro **caso**, ***Deb. hansenii*** bajo condiciones **normales** (sin **promover** su inducción) presenta una actividad de 100 U/mg de proteína en **extracto** crudo. Una vez adicionado el oxígeno la actividad se **incrementa** a 4 veces (400 U/mg de proteína) en extracto crudo. Es decir, bajo condiciones **normales** de oxígeno, ***Deb. hansenii*** presenta una enzima SOD con mayor actividad que ***Sacch. cerevisiae*** (36 veces). Por otra **parte**, ***Deb. hansenii*** no muestra capacidad para **crecer** bajo condiciones **anaerobias**, **aún** cuando se **le** adiciono ergosterol y tween 80 para la síntesis de **esteroles**, mostrando de esta **manera** ser una levadura aerobia estricta.

#### 7.4.2 Sulfato de cobre

Algunos estudios realizados han mostrado que el **cobre** puede ser utilizado para inducir la **producción** de SOD en procariontes y eucariontes (Fridovich, 1974; Galiano et al., 1991; Paphasri et al., 1992; Gordon et al., 1993), indicando incrementos de 2.4 a 3 veces la actividad de la enzima. En 1986 Greco et al., **reportan** la **inducción** de la enzima por **cobre** en una cepa de ***Sacch. cerevisiae***.

En nuestro caso, se utilizó **sulfato de cobre** 0.8 mM, el cual fue adicionado al medio de cultivo a la hora 24 de crecimiento. Los resultados indican que el incremento de actividad se **efectúa** 30 minutos después de que el **cobre** ha sido adicionado al medio de cultivo, incrementándose a aproximadamente 4 veces la actividad de la enzima en **relación** con el cultivo control. Esta respuesta casi inmediata de las células de la levadura **sobre** la adición del **cobre** pueden deberse a dos situaciones. En la **primera** hay que considerar que el **cobre** es un **elemento** esencial para ciertos procesos bioquímicos en la **célula**, ya que **sirve** como cofactor para muchas enzimas, incluyendo la Cu, Zn SOD (Praphasri et al., 1992). Por otra parte, se ha descubierto que el **cobre activa diversas oxidasas** como la polifenol oxidasa, la ascorbato oxidasa, la diamino oxidasa, y la tirosinasa, creando condiciones oxidantes bajo las cuales son generados radicales libres en **las** células (Praphasri et al., 1992). La segunda, la inducción ocurre a nivel de **transcripción** o traducción, en donde el control **sobre** el gen que codifica para la síntesis de la Cu, Zn SOD es regulado por el ion **cobre** vía el factor ACE 1, una proteína reguladora que se une específicamente al gen en presencia del ion **cobre** (Carri et al., 1990). Greco en 1986 **reportó** la inducción de la enzima por **cobre** en una cepa de **Sacch. cerevisiae** presentando una actividad en **extracto crudo** de 45 U/mg de **proteína**, y después de la adición de **cobre**, una actividad de 200 U/mg de proteína, es decir un incremento de 4 veces. Nuestra cepa de **Deb. hansenii** muestra de nuevo mejores actividades, **tanto** en condiciones **basales** como de adición del inductor al medio (el doble de actividad en **cada** caso).

### 7.4.3 Glicerol

Durante el tratamiento con glicerol en sustitución de la glucosa como fuente de carbono, **los** resultados de seguimiento de la actividad enzimática muestran un comportamiento muy similar a aquellos obtenidos por el **método tradicional**, solo que **los** valores numéricos son mucho mayores, indicando un incremento a 3.7 veces la actividad. Estos resultados sugieren que posiblemente la ruta del metabolismo de la molécula de glicerol **genere** mayor número de radicales libres que la ruta de

metabolismo de la glucosa. La ruta del metabolismo del glicerol incluye la asimilacion de esta molecula por la pared y la membrana celular mediante difusion simple (Gancedo et al., 1968), una vez en el citosol ocurre una fosforilacion via ATP mediada por una glicerol kinasa (2.7.1.30) (Gancedo et al., 1968). Posteriormente la molecula es transportada a la mitocondria en donde se convierte a dihidroxiacetona con la **participación** de la enzima glicerol fosfato ubiquinona oxidoreductasa (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa **aeróbica** 1.1.99.5) para posteriormente seguir la via normal de la gluconeogenesis (Gancedo y Serrano, 1989). Quizás la **producción** de radicales libres tome lugar en la **oxidación** en donde participa la ubiquinona, ya que ha sido plenamente demostrado que la **forma** reducida de la ubiquinona es una fuente potencial de radicales superoxido y por lo **tanto** de peroxido de hidrogeno (Boveris y Cardenas, 1982).

## CONCLUSIONES

- 1) El medio de cultivo semi-enriquecido **M1/2** mostro ser mas facilmente asimilable por Deb. *hansenii* que el medio artificial YNB, provocando **mayores** tasas de produccion de biomasa hasta en un 150 % superiores **al** medio YNB.
- 2) La **presión** osmotica generada por el alto contenido de sal en el agua de mar, no afecta el crecimiento de Deb. *hansenii*, que ha sido reportada por Norkrans ser una de las levaduras mas osmotolerantes (Norkrans, 1966). El agua destilada tambien puede ser empleada para desarrollar biomasa a partir de Deb. *hansenii* sin que afecte el crecimiento y **reproducción** de la levadura.
- 3) El medio de cultivo **M1/2** puede ser reducido en cuanto a las concentraciones de sus nutrientes (extracto de levadura y peptona) sin que esto afecte la tasa de produccion de biomasa. El extracto de levadura mostro ser un **elemento** indispensable para el crecimiento de Deb. *hansenii*. Las concentraciones **mínimas** del medio de cultivo deberan contener glucosa **2%**, peptona 0.3% y extracto de levadura 0.15 %. Estas concentraciones implican un **ahorro** del 40 % en peptona y 40 % en extracto de levadura con **respecto al** medio original y particularmente recomendado para el cultivo de este **tipo** de microorganismos (Ochoa et al., 1995).
- 4) La velocidad de **agitación** del medio de cultivo debe ser controlada con precision para evitar mermas en la **producción** de biomasa, siendo la optima para este fin una velocidad de 500 r.p.m.
- 5) En **relación** a su habilidad para crecer **sobre** distintos valores de pH, Deb. *hansenii* **mostró** ser una levadura que tolera amplios rangos de pH en cuyos extremos no **crece** con gran **fortuna**. Tambien es importante el hecho de haber mostrado

- capacidad de **replicación**, aunque con tasas de crecimiento muy bajas en valores extremos de pH. Sin embargo, las **mayores** tasas de crecimiento se mostraron en un **rango** de pH de 5 a 7, siendo el óptimo de crecimiento de la levadura el pH de 5.0. Con estos resultados se concluye que **Deb. hansenii** es una levadura ligeramente acidofílica.
- 6) La temperatura es un factor muy importante al cual no se le debe restar importancia, aunque **Deb. hansenii** mostro capacidad de crecimiento en un **rango** de temperatura amplio (de 10 a 40°C). La levadura bajo estudio mostro capacidad para producir gran **cantidad** de biomasa en temperaturas cercanas a los 30°C, con lo cual se concluye que **Deb. hansenii** es una levadura mesofílica.
- 7) El **flujo** de inyección de aire al sistema del reactor debe ser de 5 l/min, con lo cual se **eficientiza** la producción de biomasa. Contario a la literatura, en nuestros experimentos encontramos que la cepa C-11 **identificada** como **Deb. hansenii** no es **capaz** de crecer en ambientes verdaderamente anaerobios con lo cual se concluye que es una levadura aerobia estricta.
- 8) El Halox E-100, puede ser utilizado como via alterna a la esterilización a concentraciones de 0.52 mg/ml, siempre y cuando se prepare el medio de cultivo **sobre** agua de mar y se ajusten los valores de pH a 5.0.
- 9) La **inducción** de actividad de la enzima SOD es posible en **Deb. hansenii** mediante distintos tratamientos del medio de cultivo. Cuando el cultivo es tratado con sales de **cobre** muestra incrementos a 4 veces la actividad; con **glicerol** se obtiene un **incremento** a 3.5 veces y con oxígeno (100%) a 4 veces.
- 10) Por último, se concluye que se pueden generar grandes cantidades de biomasa de **Deb. hansenii** mediante el control de los parametros fisicoquimicos del medio de

cultivo (pH, velocidad de **agitación**, aereacion, y temperatura) y utilizando **como** solvente agua de mar, obteniendose rendimientos de hasta un 50% en base a la fuente de carbono (glucosa). Una vez alcanzada la fase logaritmica de crecimiento bajo estas condiciones, se puede **proceder** a estimular una **inducción** en la actividad de la enzima mediante cualquiera de **los** metodos aqui descritos, obteniendo buena **cantidad** de biomasa con una **alta** actividad enzimatica a un **bajo costo**.

## RECOMENDACIONES

El proceso de obtención de biomasa a partir de *D. hansenii* mostro ser rentable y presenta algunas ventajas **sobre los** metodos tradicionales de obtención de esta enzima, sin embargo, si se desea escalar este proceso a cantidades industriales de **producción**, es aconsejable efectuar **los** ajustes necesarios para que el proceso de generación de biomasa se efectlje mediante el **método** continuo.

En la fase de **experimentación** de temperatura es necesario **hacer** una **evaluación** nueva en donde se considere un margen de temperatura mas **pequeño** de 20 a 33 °C, y evaluar el crecimiento **cada 2°C**, con la finalidad de poseer un mayor conocimiento **sobre** este parametro de crecimiento.

El **Halox E-100 TM** mostro que puede servir **como** un agente quimico **alterno** a la esterilización muy **eficáz**, con lo cual se puede evitar el costoso **paso** de esterilización, y mas aljn se pueden crear cultivos semi-abiertos, en **los** cuales la generación de un ambiente extrictamente esteril sea requerido. Sin embargo, su empleo debe ser **tomado** con mucha reserva, ya que se ha demostrado plenamente la **participación** de **los** compuestos clorados en la **degradación** de la **capa** de ozono atmosferica.

# APENDICE I

## Composicidn quimica de los medios de cultivo M1/2 y YNB.

M1-2		YNB	
Glucosa	2 %	Glucosa	2 %
Peptona	0.5 %	Sulfato de amonio	0.35 %
Extracto de levadura	0.25 %	Aspargina	0.15 %
		Histidina	0.00001 %
		Metionina	0.00002 %
		Triptofano	0.00002 %
		Fosfato dibásico de potasio	0.085 %
		Fosfato monobásico de potasio	0.015 %
		Sulfato de magnesio	0.01 %
		Cloruro de calcio	0.01 %
		Cloruro de sodio	0.01 %
		Metales traza:	
		Ac. bórico	500 µg/l
		Sulfato de cobre	40 µg/l
		Yoduro de potasio	100 µg/l
		Cloruro férrico	200 µg/l
		Sulfato de magnesio	400 µg/l
		Molibdato de sodio	200 µg/l
		Sulfato de zinc	400 µg/l

## APENDICE II

### ANALISIS DE RUTINA EMPLEADOS PARA LAS CINETICAS DE CRECIMIENTO.

#### a) Densidad óptica.

Se tomaron 100  $\mu$ l de cultivo homogéneo y se les adiciono 1900  $\mu$ l de carbonato de sodio 0.2 N. Se homogenizo la muestra y se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 580 nm, empleando un espectrofotometro marca Beckman y empleando bicarbonato de sodio 0.2 N como blanco.

#### b) Peso seco.

Esta determinación se llevó a cabo mediante el tradicional método gravimétrico. Se tomó 1 ml de muestra en un tubo Eppendorf (a peso constante) y se centrifugo a 15 000 rpm por 10 seg., se adiciono 1 ml de carbonato de sodio 0.2 N, se resuspendieron las células y se agitaron por medio del vortex 10 seg.. Este proceso de lavado de células se repitió 3 veces. Al final, se decantó la muestra y el paquete celular se pasó a una estufa a 75°C por 24 hrs. Se peso en una balanza analítica y por diferencia de pesos, se obtuvo el peso seco de la muestra.

#### c) Consumo de glucosa.

Se tomó 1 ml de muestra en un tubo Eppendorf y se centrifugo a 15 000 rpm por 10 seg. Del sobrenadante se tomaron 100  $\mu$ l y se les adiciono 1.9 ml de agua destilada. Se homogenizo por vortex y se tomaron 10  $\mu$ l, a los cuales se les cuantifico la concentración de glucosa por medio de un kit comercial (Glucosa TRINDER, Merck), el cual es específico para glucosa a través del empleo de la enzima glucosa-oxidasa. El resultado así obtenido fue multiplicado por 20 (factor de dilución).

d) **Análisis** matemático:

- **Determinación** de la velocidad **específica** de crecimiento ( $\mu$ ), (Bader et al., 1974).

$$\mu = \frac{\ln (X/X_0)}{t}$$

donde: X es la biomasa **al** final de la fase logarítmica de crecimiento  
X<sub>0</sub> es la biomasa **al** inicio de la fase logarítmica de crecimiento  
t es el tiempo **al** final de la fase logarítmica de crecimiento

- Biomasa total. Se **tomo** como biomasa total **aquella** obtenida a la hora 48 de cinética de crecimiento, ya que hasta este tiempo duraron las cinéticas de crecimiento.

## **APENDICE III**

### **Cuantificación de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa mediante la técnica Xanthin-Xanthin Oxidasa (X-Xo).**

Reactivos:

**Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (pH 7.8).**

- Preparar Fosfato de sodio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) y monobásico ( $KH_2PO_4$ ).
- Ajustar el pH del fosfato dibásico con el fosfato monobásico.

**EDTA 0.1 mM.**

- Disolver 9.31 mg de EDTA (p.m. 372.2) en 250 ml de solución amortiguadora de fosfatos.

**Xantina 50  $\mu$ M.**

- Disolver 2.18 mg de xantina (p.m. 174.1) en 250 ml de solución amortiguadora de fosfatos.

**Citocromo "C" 10  $\mu$ M.**

- Disolver 30.96 mg de citocromo "C" (p.m. 12 384) en 250 ml de solución amortiguadora de fosfatos.

**Preparación del sustrato xantina-citocromo "C".**

- Disolver el **reactivo** xantina 50  $\mu$ M en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.8 (**calentar hasta ebullición**).
- **Enfriar** a temperatura ambiente.
- Agregar el citocromo "C" y el EDTA.

**Evaluación de la concentración del citocromo "C" en el sustrato xantina-citocromo "C".**

- Se toma una muestra del sustrato xantina-citocromo "C", y se lee a 550 nm. Se toma el dato de la absorbancia (A), entonces se le agrega una **pequeña cantidad** de ditionita de sodio (con la punta de una espátula), se agita y se vuelve a leer, se toma la lectura (B).

- **Cálculos** para una concentración óptima de citocromo "C"

$$(B) - (A) = C$$

**C**= diferencia del estado reducido al estado oxidado.

Para un estado **oxidado** perfecto se **realiza** el siguiente **cálculo**:

$(C) \times (100) / (A) = \%$  de citocromo "C" necesario de adicionar **al** sustrato xantina-citocromo "C".

Xantin Oxidasa.

Para el presente ensayo es necesario que la xantin oxidasa se encuentre a una **concentración** que reduzca **al** sustrato xantina-citocromo "C" de **modo** que la tasa de **reducción** permanezca en un valor de 0.02 a 0.025. El valor de esta tasa de **reducción** debe ser anotado (RC).

Técnica:

- La muestra y los reactivos **deben** ser **conservados** a 4°C aproximadamente.
- Calibrar el **espectrofotómetro** con agua destilada **como** blanco a 550 nm.
- En una  **cubeta** de 1 mL, **colocar** 1970 µl de sustrato.
- Agregar 10 µl de muestra.
- Homogeneizar.
- Leer cambio de absorbancia por 60 seg.
- Anotar el valor de la tasa de cambio (RA)
- Agregar 20 µl de la enzima xantin-xantin oxidasa.
- Leer cambio de absorbancia por 60 seg.
- Anotar el valor de la tasa de cambio (RB).

## **Calculos:**

**Determinación de interferencias por la muestra.**

**Tasa de reducción de la muestra = (RB) - (RA) = (RD)**

**Porcentaje de inhibición (%Inh).**

$$\% \text{ Inh} = (( \text{RC} - \text{RD}) / \text{RC}) * (100)$$

**Unidades de actividad por mililitro de muestra (U/mL).**

$$\text{U/mL} = \% \text{ Inh} / 0.5$$

**Unidades po miligramo de proteina (U/mg prot).**

$$\text{U/mg prot} = (\text{U/mL}) / \text{mg proteínas de la muestra.}$$

---

---

## BIBLIOGRAFIA.

- Adhemar P.**, (1988). Molds from some beaches in the **southern** area of Sao Paulo state (Baixada Santista), Brazil. Rev. Microbiol., Sao Paulo, **19(2)**: 166-171.
- Afanas'ev, I.B., (1991). Superoxide Ion: Chemistry and Biological Implications, Vol. II, ed. CRC, pp 5-116.
- Aheam**, D.G., Roth, F.J., and Meyers, S.P. (1962). A comparative study of marine and terrestrial strains of *Rhodotorula*. **Canadian Journal of Microbiol.**, 8: 121-132.
- Aheam**, D.G., Roth, F.J., and Meyers, S.P. (1968). **Ecology** and characterization of yeasts from aquatic regions of South Florida. Marine Biology, 1: 291-308.
- Allen, J.C., and Wrieden, W.L.J., (1982). Influence of milk proteins lipid oxidation in aqueous emulsion. Dairy Research, 49: 249-263.
- Amano A., Sharma A., **Sojar** H., Kuramitsu H., and Genco R., (1994). Effects of temperature stress on expression **fimbriae** and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity, 62 (10): 4682-4685.
- Amon**, J.P., (1978). Thraustochytrids and Labyrinthulids of terrestrial, aquatic and hypersaline environments of the great Salt Lake, U.S.A.. Mycologia, 70: 1299-1301.
- Andersen, R.J., Wolfe M.S., and Faulkner D.J., (1974). Autotoxic antibiotic production by a marine Chromobacterium. Mar. Biol., 24: 281-285.
- Annastasiou, C.J., (1963). Fungi from salt lakes. II. **Ascomycetes** and fungi imperfecti from the **Salt** Sea. Nova Hedwigia, 6: 243-276.
- Arteaga, G.E., Li-Chan, E., and Nakai, S., (1994). Systematic experimental designs for product formula optimization. Trends in Food Science and Technology, 5: 243-254.

- Atsuo A., Sharma A., Sojar H.T., Kuramitsu H.K., and Genco R.J., (1994). Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*, 62: 4682-4685.
- Aurand, L.W., Boone, N.H., and Giddings, G.G., (1977). Superoxide and singlet oxygen in milk peroxidation. *J. Dairy Sci.*, 60: 363-3692
- Autor, A.P., (1982). *Pathology of Oxygen*, Academic Press, pp 21-42.
- Bader F.G., Meyer J.S., Fredrickson A.G., and Tsuchiya H.M., (1975). Comments on microbial growth rate. *Biotech. and Bioengineering*, Vol XVII, Eds John Wiley & Sons, Inc, pp 279-283.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., Parker, M.W., Bossa, F., and Barra, D., (1986). Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine. *Elsevier Science Publishers B.V.* (Biomedical Division), Ed. Rotilio, G., pp 237-245.
- Battley E.H., Bartlett E.J., (1966). A Convenient pH gradient method for the determination of maximum and minimum pH for microbial growth. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 32: 245-255.
- Beck, B.L., Tabatabai, L.B., and Mayfield, J.E., (1990). A protein isolated from *Brucella abortus* is a (Cu,Zn) superoxide dismutase. *Biochemistry*, 29: 372-376.
- Bielski, B.H.J., Arudi, R.L., and Sutherland, M.W., (1983). The reactivity of HO<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 258: 4759.
- Bilinski T., Krawiec Z., Litwinska J., and Blaszczyński, (1988). Mechanisms of oxygen toxicity as revealed by studies of yeasts mutants with changed response to oxidative stress. *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*, pp 109-123.
- Boveris A. and Cardenas E., (1982). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Superoxide Dismutase*, (Larry W. Oberley Ed), Ed CRC, Vol 11: 15-30.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bradley S. D., (1995). New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 284-291.

- Bulkley G.B.**, (1993). Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery*, 113 (5): 479-483.
- Burkholder, P.R., Pfister R.M., and **Leitz F.P.**, (1966). Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *J. Appl. Microbio.*, 14: 649.
- Carri M.T.**, **Galiazzo F.**, **Ciriolo M.R.**, and **Rotilio G.**, (1991). Evidence for co-regulation of **Cu,Zn** superoxide dismutase and **methallothionein** gene expression in yeast through transcriptional control by copper via the ACE 1 factor. *FEBS Lett.* 2278: 263-266.
- Chamnongpol S., Mongkolsuk S., Vattanaviboon P., and Fuangthong M., (1995). Unusual growth phase and oxygen tension regulation of oxidative stress protection enzymes, catalase and superoxide dismutase, in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. **oryzae**. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (1): 393-396.
- Clarkson S.P., Larger P.J., Boulton C.A., and Bamforth C.W., (1991). Synthesis of superoxide dismutase, catalase and other enzymes and oxygen and superoxide toxicity during changes in oxygen concentration in cultures brewing yeast. *Yeast*, 7: 91-103.
- Czpaski G., **Bors W.**, and **Saran M.**, (1991). An expanded function for superoxide dismutase. *Free Rad. Res. Comms.*, 12 (13): **411-417**.
- Davenport, R.R., (1980). *Biology and Activities of Yeast*. (Skinner, F.A.; Passmore, S.M.; Davenport, R.R., eds). The Society for Applied bacteriology Simposium, series No 9. Academic Press Inc. N.Y., pp 1-27.
- Davenport R.R., (1982). *Smith's Introduction to Mycology*, 7th edition, (Onion A.H., **Allsopp D.**, and **Eggins O.W.** Eds), pp 1-27.
- Davidson B.S., (1995). New dimensions in natural products research: cultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 284-291.
- Davidson, D.E., (1974). Whood inhabiting and marine fungi from a saline lake in Wyoming. *Transactions of the British Mycological Society*, 63: 143-149.

- De **Jesús**, M.D., Tabatabas, F. and Chapman, D.J., (1989). Taxonomic distribution of copper zinc superoxidase in green algae and its phylogenetic importance. *J. Phicol.* 25: 767-772.
- Duff D.C., Bruce D.L., and Antia N.J., (1966). The antibacterial activity of marine planktonic algae. *Can. J. Microbiol.* 12: 877-884.
- Farrel** J. and Rose A.H., (1967). *Thermobiology* (A.H. Rose, ed.), Academic press, London, pp 147-218.
- Fell J.W., **Ahearn** D.G., Meyers S.P., Roth F.J., (1960). Isolation of yeasts from biscayne bay, Florida and adjacent benthic areas. *Limnol. Oceanogr.* **5(4)**: 366-371.
- Fell J.W., (1967). Distribution of yeasts in the Indian Ocean. *Bulletin of Marine Science*, **17(2)**: 454-470.
- Fell J.W., (1968). Distribution of **Antartic** marine fungi. *Antartic J. U.S.*, 3: 157-159.
- Fell J.W., (1976).. *Recent Advances in aquatic micology.* (E.B.G.), Eds. Jon and Wiley, New York press, pp 93-124.
- Fenical W., and Jensen R.P., (1993). *Marine microorganisms: A New Biomedical Resource.* Pharmaceutical and Bioactive Natural Products, David H. Attaway and oskar R. Zaborsky Eds., Plenum Press, New York, 1 : 419-457.
- Fridovich, I., Gregory, E.M., and Goscin, S.A., (1974). Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote. *J. of Bacter.*, 117: 456-460.
- Fridovich, I., (1975). Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, **44**:147.
- Fridovich, I., (1982). *Pathology of Oxygen.* Academic Press, Inc, Anne P. Autor, ed., pp 1-19.
- Galiazzo** F., Ciriolo M.R., **Carri** M.T., Civitareale P., **Marcocci** L., Marmocchi F., and Rotilio G., (1991). Activation and induction by copper of **Cu/Zn** superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*, prescence of an inactive proenzyme in anaerobic yeast. *Eur. J. Biochem.*, 196: 545-549.

- Galiazzo, F., and Labbe-Bois, R.,** (1993). Regulation of **Cu,Zn-** and Mn-superoxide dismutase in *Saccaromyces cerevisiae*. *Fed. Eur. Bioch. Soc.*, 315 (2), 197-200.
- Gancedo C., Gancedo J.M., and Sols A., (1968). Glycerol metabolism in yeasts: Pathways of utilization and production. *European J. Biochem.* 5: 161-172.
- Gancedo C. and Serrano R., (1989). The Yeasts. Rose-Hanison Eds, 3: 205-259.
- Gandhi N.M., **Patell J.R.,** Gandhi J.N., De Souza J., and Kohl H., (1976). Prodigiosin metabolites of a marine *Pseudomonas* species. *Mar. Biol. (Berl.)* 34: 233.
- Gomi S.,** Ikeda D., Nakamura H., Yamashida F., Hotta K., Kondo S., Okami Y., and Umezawa H., (1984). Isolation and **structure** of a new antibiotic, indolizimycin, produced by a strain **SK2-52** obtained by interspecies fusion treatment. *J. Antibiotics* 37: 1491-1494.
- Gordon A., **Harwood V.J.,** and Sayyar S., (1993). Growth, copper-tolerant cells, and extracellular protein production in copper stressed chemostat cultures of *Vibrio alginolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1):60-66.
- Goto S.,** Yamasato K., and Hzuka H., (1974). **Identification** of yeasts isolated from the Pacific Ocean. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20:309-316.**
- Gralla, E.B., Thiele, D.J., Silar, P., and Valentine, J.S., (1991). **ACE1**, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **8:8558-8562.**
- Greco, M.A.,** Magner, W., Hrab, D., and Kosman, D., (1986). Superoxide dismutase and the physiological response to copper in *S. cerevisiae*. **Elsevier Science Publishers B.V.** (Biomedical Division), G. Rotilio, Ed., pp 296-299.
- Grein A. y Meyers S.P., (1958). Growth **characteristics** and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and material suspended in sea water. *J. Bacteriol.* 76: 457-463.

- Guerriero A.D., D'Ambrosio M., Cuomo V., Vanzanella F., and Pietra F., (1988).** Dendrophiellin A, the first fungal trinor-eremophilane. Isolation from the marine deuteromycete *Dendrophiella salina* (Sutherland) Pugh et **Nicot.** *Helv. Chim. Acta* 71: 57-61.
- Guerriero A.D., D'Ambrosio M., Cuomo V., Vanzanella F., and Pietra F., (1989).** Novel trinoreremophilanes (Dendrophiellin B, C and D), eremophilanes (Dendrophiellin E, F and G), and branched **C90carboxylic** acids (Dendrophiellin acid A and B) from the marine deuteromycete *Dendrophiella salina* (Sutherland) Pugh and **Nicot.** *Helv. Chim. Acta* 72: 438-446.
- Gustafson K., Roman M., and Fenical W., (1989). The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep sea marine bacterium. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 7519-7524.
- Halliwell B., (1982). Superoxide dismutase. Larry W. O. (Ed), CRC Press, Boca Raton Florida, USA, **1**: 89-123.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., (1986). Oxygen radicals and iron in relation to biology and medicine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 246: 514.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., (1989). *Free radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press. pp 1-15.
- Harakeh S., **Illescas A., and Matin A., (1988).** Inactivation of bacteria by purogene. *J. of App. Bacteriology*, 64: 459-463.
- Hassan, H.M., and Fridovich, I., (1977). Regulation of synthesis of SOD in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 252: 7667-7672.
- Hassan, H.M., and Fridovich, I., (1979). **Intracellular** production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by **redox active compounds**. *Arch. Biochem. Biophys.*, 196: **385-395**.
- Heikki, S. and **Erkii, O., (1969).** *Biology of Yeasts*. Rose H.A. and **Harrison J.S. (Eds), Ac. Press Inc.** London, (1): 3-77.

- Hemndez, S.N., (1990). Levaduras Marinas Aisladas en la Costa Occidental de Baja **Califórnia** Sur, **México**. Tesis de Licenciatura, 30 de Junio, UNAM, Los **Reyes Iztacala** Mexico, .
- Hemndez, S.N., (1992). Efecto de la **salinidad** en la **composición y concentración** de osmoreguladores en levaduras halotolerantes. Tesis de maestría, Noviembre, IPN-CICIMAR, La Paz, B.C.S., Mexico.
- Hill, R.D., (1979). Oxidative enzymes and oxidative processes in milk. **CSIRO** Food Res. Q., 39: 33-37.
- Hjalmarsson** K.S.L., Marklund A., and Edlund T., (1987). Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. Proc. Natl. **Acad.** Sci. USA. 84: 6340-6344.
- Hobot J.A., and Jennings D.H., (1981). Growth of ***Debaryomyces hansenii*** in relation to pH and salinity. Experimental Mycology, 5: 217-228.
- Hota K., Yoshida M., Hamada M., and Okami Y., (1980). Studies on new aminoglycoside antibiotics, istamycins, from an actinomycete isolated from a marine environment. J. Antibiot. 33: 1515.
- Ingram M., (1955). An Introduction to the biology of yeasts, Ed **London: Pitman**.
- Javor B., (1989). Hypersaline environment: Microbiology and Biochemistry. **Brock/Springer** Verlag series in contemporary bioscience. **Springerverlag**. U.S.A., pp 42-51.
- Jennings, D.H., (1983). Some aspects of physiology and biochemistry of marine fungi. Biol. Rev., 58: 423-459.
- Jensen P., Dwight R., and **Fenical** W., (1991). The distribution of actynomicetes in near-shore tropical marine sediments. Appl. Environ. **Microbiol.** **57:1102-1108**.
- Johnson M.J., (1972). Technics for selection and evaluation of cultures for biomass production. Proc. **IV IFS: Technol. Today**, 473-477.
- Karlson**, K., and Marklund, S.L., (1987). **Extracellular** superoxide dismutase in the vascular system of mammals. Biochem. J., 242: 55-59.

- Kitahara T., Naganawa H., Okazaki T., Okami Y., and Umezawa H., (1975). The structure of **SS-229Y**, an antibiotic from *Chainia sp.* J. Antibiot. 28: 280.
- Kleman, G.L. and Strohl, W.R., (1994). Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. Current Opinion in Biotech., 5: **180-186**.
- Kohlmeyer J., and Kohlmeyer E., (1979). Marine ecology: The higher fungi. Academic press, New York, San Francisco London.
- Kroll, J.S., Langford, P.R., and Loynds, B.M., (1991). **Copper-Zinc** super oxide dismutase of *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae*. J. Bacteriol. 173: 7449-7457.
- Kupka J., Anke T., Steglich W., and Zechlin L., (1981). Antibiotics from basidiomycetes XI. The biological activity of sicayne, isolated from the marine fungus *Halocyphina villosa* J and E. Kohlmeyer. J. Antibiot. **34:298-304**.
- Large, P.J., Clarkson, S.P., Boulton, C.A., and Bamforth, C.W., (1991). Yeast, 7: 91-103.
- Lee, T.H. and Lee, S.O., (1988). Purification and properties of superoxide dismutase from *Bacillus circulans*. Agric. Biol. Chem., 52: 1361-1367.
- Lehninger, A.L., (1981). Bioquímica, 2da edición, Ed. OMEGA, pp 427-428, 508-509.
- Lodder, J. and N. J. W. Kreger van Rij. (1983). The yeast, a taxonomic study. Third edition. Elsevier Science Publishers. North Holland, Amsterdam.
- Lodder, J., (Ed.), (1970). The Yeast, North Holland Publ. Co., Amsterdam and London, pp 1385.
- Lygren S. T., Closs O., Bercouvier H., Wayne L.G., (1986). Catalases, peroxidases, and superoxidases in *Mycobacterium leprae* and other mycobacteria studied by crossed immunoelectrophoresis and PAGE. Infec. Immun., 54: **666-672**.
- McCord, J.M. and Fridovich, I., (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). The Journal of Biological Chemistry, 244 (22): 6049-6055.
- Meyers S.A., Roth Jr, Aheam D.G., Fell J.W., and Meyers S.P., (1962). Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. Limnol. Oceanogr., 7: 178-185.

- Meyers S.A. and Isaksen A., (1995). Application of enzymes as food antioxidants. Trends in Food Science & Technology, 6: 300-304.
- Moody, C.S. and Hassan, H.M., (1984). Anaerobic biosynthesis of the Mn-containing SOD in *E. coli*. J. Biol. Chem., **259**: 12821-12825.
- Moore R.E., Patterson G.M., and Charmichael W.W., (1988). Biomedical Importance of Marine Organisms (D.G. Fautin, ed.), California Academy of Science, San Francisco, pp **143-150**.
- Norkrans Birgitta, (1966). Studies on marine osmophilic yeasts: Growth related to pH, **NaCl concentration** and temperature. Archiv fur mikrobiologie, **54**: 374-392.
- Ochoa, J.L., Ramírez-Orozco, M., Hernández-Saavedra, N.Y., Hernández-Saavedra, D., and Sanchez Paz A., (1995). Halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* as an alternative source of **Cu/Zn** Superoxide dismutase (SOD). J. Mar. Biotechnology, **3**: 224-227.
- Okami, Y., (1988). Horizons on Antibiotic Research, Japan Antibiotic Research Association, Tokyo, pp 213-227.
- Olsen, I., (1990). Chemotaxonomy of yeast. Acta Odontol Scand, **48**: 19-25.
- Onishi, H., (1963). Studies on osmophilic yeasts. XV. The effects of high concentrations of sodium chloride on **polyalcohol** production. Agricultural and Biological Chemistry, **27**: 543-547.
- Paganelly, M., Romandini, P., Bertolini, G., Beltramini, M., Tallandini, N., and Salvato, B., (1989). Yeast as a main protagonist of biotechnology. VII Int. Symp. on Yeasts, Perugia, Italy, (Martini A., and Vaughan-Martini A., eds.), pp 431-435.
- Pallenberg A.J., and White J.D., (1986). The synthesis and absolute configuration of **(+)-leptosphaerin**. Tetrahedron letter **27**: 5591-5594.
- Paphasri C., Mori S., and Chino M., (1992). Excess copper induces a **cytosolic Cu,Zn-superoxide** dismutase in soybean root. Plant Cell Physiol., **33(3)**: 239-244.
- Patterson G.M., Balwin C.L., Bolis C.M., Caplan F.R., Karuso H., Larsen L.K. Levine I.A., Moore R.E., Nelson C.F., Pschappat K.D., Tuang G.D., Furusawa E., Furusawa S., Norton T.R., and

- Rayboume R.B., (1991). Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (cyanophyta). J. **Phycol.** 27: 530-536.
- Phaff, H.J., (1986). Ecology of yeasts with actual and potential value in biotechnology. **Microb Ecol.** 12: 31-42.
- Poch G.K., and Gloer J.B., (1989). Helicascolides A and B: New **lactones** from the marine fungus *Helicascus kanaloanus*. J. Nat. Prod. 52: 257-260.
- Poch G.K., and Gloer J.B., (1991). Auranticins A and B: Two new depsidones from a mangrove isolate of the fungus *Preussia aurantiaca*. J. Nat. Prod. 54: 213-217.
- Rapoport, S.M., and Muller, M., (1974). Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes. Yoskikawa, H., and Rapoport, S.M. (Eds), University Park Press, Baltimore Maryland, pp 167.
- Rodriguez C., Adhemar P., and Walderez G., (1983). Yeast from beaches in the southern area of Sao Paulo state "Baixada Santista", Brazil. Rev. **Microbiol.**, Sao Paulo, 14(2): 136:143
- Rosenfeld W.D. and Zobel C., (1947). Antibiotic production by marine microorganisms. J. **Bacteriol.**, 54: 393-398.
- Rotilio, G., Galiazzo, F., Ciriolo, R., Carri, M.T., Civitareale, P., Marcocci, L., and Marnocchi, F., (1991). Activation and induction by copper of **Cu/Zn** superoxide dismutase in *Saccaromyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 196: 545-549.
- Rychnovsky D.S., Skalitzky D.J., Fenical W., Gustafson K., and Pathirana C., (1991). Stereochemistry of the macrolactin family of macrocycles: A degradative study. In Abstracts 201st National Meeting of the American Chemical Society, Atlanta, Georgia, Abstract #187.
- Salin, M.L., and Desterhelt, D.. (1988). Purification of Mn containig SOD from *Halobacterium halobium*. Arch. Bichem. Biphys., 260:806-810.
- Samuni, A, Aranovitch, J., Godinger, D., Chevion, M. and Czapski, G. (1983). On the citotoxicity of vitamin C and metal ions, a specific **Fenton** mechanism. Eur. J. Biochem., 137: 119.

- Sanders J.W., Leenhouts K.J., Haandrikman A.J., Venema G., and Kok J., (1995). Stress response in *Lactobacillus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. J. of **Bact.** 4: **5254-5260**.
- Saunders, B.C., **Holmes-Siedle**, A.G., and Stark, B.P., (1964). Peroxidase, Butterworth, London.
- Schiehser G.A., White J.D., Matsumoto G., **Pezzanite** J.O., and Clardy J., (1986). The structure of leptosphaerin. Tetrahedron Lett. **27: 5587-5590**.
- Shin J., and Fenical W., (1987). Isolation of gliovictin from the marine deuteromycete *Asteromyces cruciatus*. **Phytochemistry** 26: **3347**.
- Shoji G., Kazuhide Y., and Hiroshi H., (1974). Identification of yeasts isolated from the Pacific Ocean. J. Gen. Appl. **Microbiol.**, 20: **309-316**.
- Shoji G., (1969). A taxonomic study of **antartic** yeasts. **Micolog.** 61: **748-774**.
- Sieburth J.M., (1974). Antibacterial substances produced by marine algae. Dev. Ind. Microbiol. 5: **124-134**.
- Sieburth, J. M., (1979). Sea Microbes. New York Oxford University Press, pp **340-341**.
- Steinman** H.M., (1982). Superoxide dismutase. **Larry W. Oberley** (Eds ), CRC Press, Boca Raton, Florida, 2: **12-59**.
- Steinman** H.M., and Ely B., (1990). Copper-Zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus*: cloning, sequencing, and mapping the gene and periplasmic location of the enzyme. J. **Bacteriol.** 172: **2901-2910**.
- Steinman**, H.M., (1985). Bacteriocuprein superoxide dismutases in **pseudomonads**. J. **Bacteriol.** 62: **1255-1260**.
- Strongman D.B., Miller J.D., Calhoun L., **Findlay** J.A., and Whitney N.J., (1987). The biochemical basis for interference competition among some lignicolous marine fungi. Bot. Mar. **30: 21-26**.

- Takahashi A., Kurosawa S., Ikeda D., Okami Y., and Takeuchi T., (1989). Alteumicidin, a new acaricidal and antitumor substance. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physicochemical and biological properties. *J. Antibiot.* 42: 1556-1561.
- Thomas, M.J., **Mehl**, K.S. and **Pryor**, W.A., (1978). The role of superoxide anion in the xhantine oxidase induced autooxidation of **linoleic** acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83: 927.
- Tilbury R.H., (1980). Xerotolerant yeasts at high sugar **concentrations**. En *Microbial growth and survival in extreme of environment*, Society of Applied Bacteriology Technical Service, Gould G.W. and **Corry** J.E.C. (Eds), Academic press, New York.
- Tomasz, B., Zdzislawa, K., Jadwiga, L., and **Mieczislaw**, B., (1988). Oxy-Radicals in Molecular Biology and pathology, pp **109-123**.
- Uden N.V. and **Castelo Branco**, R., (1963). Distribution and population densities of yeast species in Pacific water, air, animals and help off Southern California. *Limnol. Oceanogr.*, 8: 323-329.
- Uden H. V. and Fell, J.W., (1968). Marine yeasts. *Advances in Microbiology of the Sea*, **10:167-201**.
- Uden N. V., and **Vidal Leiria** M., (1970). The Yeasts- a taxonomic study. 2nd Edition, Lodder Ed, pp **1235-1308**.
- Van Loon, A.P.G.M., Pesold, H. B., and **Schatz**, G., (1986). A yeast mutant lacking **mitochondrial** manganese superoxide dismutase is hypersensitiveto oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3820-3824.
- Watson K., (1987). The Yeast . **Rose-Harrison** (Eds), 2nd edition, Academic press Inc., (London) 2: 41-66
- Wilde E.W., **Saracco** R.J., Mayack L.A., Shealy R.L., Broadwell T.L., and Steffen R.F., (1983). Comparison of chlorine and chlorine dioxide toxicity to fathead minnows and **bluegill**. *Water Res.* Vol 17, 10: **1327-1331**.
- Wratten S.J., Wolfe M.S., Andersen R.J., and Faulkner D.J., (1977). Antibiotic metabolites from marine pseudomonad. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 411.

**Xiu Fen Liu, Elashvili, I., Butler, G.E., Selverstone, V.J., Lapinskas, P. and Cizeswki C.V., (1992). Yeast lacking superoxide dismutase. The Journal of Biological Chemistry, 267, No. 26, pp 18298-18302.**

**Yamasato K., Goto S., Ohwada K., Okuno D., Araki H., and Hzuka H., (1974). Yeasts from the Pacific Ocean. J. Gen. Appl. Microbiol., 20: 289-307.**