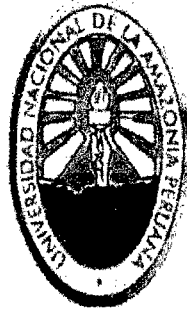


**NO SALE A  
DOMICILIO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE L-GALACTONO/L-GULONO-1,4-  
LACTONA DESHIDROGENASA DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh  
"camu-camu"**



**PROYECTO DE TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR**

**BACH. Q.F ALEX TAPULLIMA PACAYA**

**ASESORES**

**Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ Dr.  
Q.F. LUIS ALBERTO VÍLCHEZ ALCALÁ. Mgr.**

**IQUITOS-PERU**

**2013**

**DONADO POR:**  
*Alex Tapullima Pacaya*  
*Iquitos, 17 de 02 de 2014.*



00139



"Año de la Inversión para el Desarrollo rural y la Seguridad Alimentaria"

## ACTA DE SUSTENTACIÓN

En las Instalaciones del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, del Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los 10 días del mes de DICIEMBRE del dos mil trece, siendo las 16:00 horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 246-FFB-UNAP-2013, integrados por los docentes que a continuación se detalla:

- Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Mgr. Presidente
- Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO Miembro
- Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG Miembro



Se constituyeron en las Instalaciones del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE L-GALACTONO/L-GULONO-1,4-LACTONA DESHIDROGENASA DE *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "camu-camu"**", presentado por el Bachiller **ALEX TAPULLIMA PACAYA**, para optar el **TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de los sustentantes, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:

SATISFACTORIAMENTE

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.- La Tesis ha sido APROBADO POR UNA NIMIDAD
- 2.- Observaciones NINGUNA



Siendo las 17:30 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su ACERTADA DISERTACIÓN.

  
Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Mgr  
Presidente

  
Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO  
Miembro

  
Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG  
Miembro

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE L-GALACTONO/L-GULONO-1,4-  
LACTONA DESHIDROGENASA DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh  
“camu-camu”**

Tapullima P. Alex

**RESUMEN**

*Myrciaria dubia* es un frutal amazónico que presenta alto contenido de vitamina C. Estudios que evidencien, que el excesivo incremento de ácido ascórbico en *M. dubia*, se deba a enzimas, son escasos. L-GulDH es una enzima que sintetiza el paso final a ácido ascórbico en plantas. Para comprender los procesos bioquímicos involucrados, se realizó la caracterización de L-GulDH en *M. dubia*. Se determinó que esta enzima, se encuentra en las fracciones mitocondriales y citosólicas de los diversos tejidos de *M. dubia*, presentando mayor actividad catalítica en la fracción citosólica. También, se evidenció que L-GulDH presenta actividad enzimática con diferentes aceptores de electrones (1,4-benzoquinona, citocromo C, fenazina metosulfato, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>), siendo mayor con 1,4-benzoquinona. Asimismo fue fuertemente inhibida por iones divalentes (Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>), al igual que por N-etilmaleimida y el agente quelante EDTA. Además, se demostró que L-GulDH es estable a pH 7,0 y a temperatura de 26,5 °C. Paralelamente, L-GulDH, presentó un  $K_m$  de 8,27  $\mu\text{mol}$ . En conclusión, estas evidencias experimentales nos indican que L-GulDH, presenta isoenzimas en las fracciones mitocondriales y citosólicas, que incrementa su actividad catalítica a pH fisiológico y a temperatura ambiente. La inhibición enzimática, evidencia que L-GulDH presenta en su centro activo catalítico residuos de cisteína, y ciertos cofactores metálicos. El valor de  $K_m$  determinado indica la alta afinidad de esta enzima por su sustrato, lo que pudiese explicar el excesivo incremento de vitamina C en *M. dubia*

**CHARACTERIZATION BIOCHEMICAL OF L-GALACTONO/L-GULONO-  
1,4-LACTONE DEHYDROGENASE OF *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh  
“camu-camu”**

Tapullima P. Alex

**ABSTRACT**

*Myrciaria dubia* is an Amazonian fruit that has high content of vitamin C. Studies that demonstrate that the excessive increase of ascorbic acid in *M. dubia*, is due to enzymes, are scarce. L-GulDH is an enzyme that synthesizes the final step to ascorbic acid in plants. To understand the biochemical processes involved, the L-GulDH characterization was performed on *M. dubia*. It was determined that this enzyme is found in mitochondrial and cytosolic fractions of various tissues of *M. dubia*, presenting higher catalytic activity in the cytosolic fraction. Also, it showed that L-GulDH has enzymatic activity with different electron acceptors (1,4-benzoquinone, cytochrome C, phenazine methosulfate, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>), being greater with 1,4-benzoquinone. Was also strongly inhibited by divalent ions (Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>), as well as by N-ethylmaleimide and the chelating agent EDTA. Furthermore, it was demonstrated that L-GulDH is stable at pH 7.0 and temperature of 26.5 °C. Similarly, L-GulDH presented a  $K_m$  of 8.27  $\mu\text{mol}$ . In conclusion, these experimental evidence indicates that L-GulDH presents isoenzymes in mitochondrial and cytosolic fractions, which increases its catalytic activity at physiological pH and ambient temperature. Enzyme inhibition, L-GulDH evidence presented in the active site catalytic cysteine residue, and certain metal cofactors. The determined  $K_m$  value indicates the high affinity of the enzyme for its substrate, which could explain the excessive increase of vitamin C in *M. dubia*

## DEDICATORIA

*A Dios, por brindarme las fuerzas necesarias para escalar las montañas de obstáculos que siempre da la vida y por sostener mi mano cada vez que me daba por vencido.*

*A una mujer, que tuvo la valentía de tener un hijo a los 41 años, que apostó toda su pobreza y humildad para su educación. Gracias Isabel Pacaya Mozombite Vda. de Tapullima, mi querida amiga, consejera y Madre.*

*A mi hermana Prined, que entendió que las piedras también derraman lágrimas, y que los ogros por mas malos que parezcan, inventan su felicidad y desean siempre compañía para ser felices.*

*A un hombre que me regalo felicidad, cada madrugada que llegaba cansado y sudado, que me enseño que el sufrimiento sólo es efimero si le muestras una sonrisa. Gracias Román Tapullima Pezo, algún día estaremos juntos para reírnos como antes como siempre, mientras tanto cuidame desde arriba*

*...Alex*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Esta odisea no hubiese sido posible, sin la ayuda de notables investigadores y amigos, a los que voy a estar eternamente agradecido, por contribuir con su granito de arena para este estudio.

Al Dr. Juan Carlos Castro Gómez, gran científico, buen profesional y mejor ser humano, por brindarme la oportunidad de ser parte de este fantástico mundo, y conferirme este gran reto.

A los Drs. Jorge Luis Marapara Del Águila, Lastenia Ruíz Mesía, Marianela Cobos Ruíz, a la Ing. Leonor y al biólogo Jorge Ángulo por brindarme las facilidades para la realización de esta humilde tesis en el CIRNA.

A mi gran familia, comandada por una gran mujer, la Sra Isabel Pacaya. Mi segunda estrella, mi hermana Prined, mis hermanos Jorge Luis y Percy. Además de la Srta. Mery con los terriblemente traviosos Piero, Kalleb, como a mi madrina Karin. Un solo corazón, una sincera lealtad.

A la tripulación de jóvenes investigadores, que acompañaron a lo largo de este periodo en el área especializada de biotecnología: Cinthya Acuña, Alexander Cerdeira, Roberson Ramírez, Alina Egoávil, Freddy Gutiérrez, Julián Torres, Ana Córdova, Mery Siguas, Ángel Araujo, Aurora Romero. Sin olvidarme de Dano Ropón, Gabriel Tuesta, Eliana Santana, Joao Fasabi, Napoleón Rodríguez, Cindy López, Bárbara Valles, Ligia Tello, Anderson Medina.

A los eternos amigos, que pese a las inclemencias del tiempo, siempre están en las buenas y sobre todo en las malas: Junior Dávila, Jaime Martínez, Darwin Rivas, Miguel Ruíz, Raúl Ríos, Octavio López, Elmer Lavajos, Claudio Apagüeño, Jorge Arévalo, Eneas Rivas, Rosaura Martínez y Juan David.

## INDICE

### CAPÍTULO I.

1.- Introducción.....	11
2.- Problema de Investigación.....	13
3.- Objetivos.....	14
3.1.- Objetivo general.....	14
3.2.- Objetivos específicos.....	14

### CAPÍTULO II.

1.- Marco Teórico. ....	16
1.1.- Antecedentes. ....	16
1.2.- Bases Teóricas.....	20
1.2.1.- <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh “Camu-camu”. ....	20
1.2.1.1.- Clasificación Taxonómica.....	20
1.2.1.2.- Morfología general .....	20
1.2.1.3.- Composición química del camu camu .....	21
1.2.2.- Metabolismo del ácido ascórbico en el organismo.....	21
1.2.3.- Metabolismo del ácido ascórbico en las plantas.....	22
1.2.4.- L-Galactono/L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa .....	23
1.2.4.1.- Parámetros fisicoquímicos de L-Galactono/L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa .....	25
2.- Definiciones operacionales.....	26
2.1.- Variables.....	26
2.1.1.- Variable independiente .....	26

2.1.2.- Variable Dependiente .....	26
2.2.- Operacionalización de las Variables .....	27
3.- Hipótesis.....	29

### CAPÍTULO III.

1.- Metodología.....	31
1.1.- Tipo de Estudio. ....	31
2.- Diseño de Investigación.....	31
3.- Población y Muestra.....	31
3.1.- Población Vegetal.....	31
3.2.- Muestra Vegetal .....	31
4.- Instrumentos y Materiales .....	32
4.1.- Equipos .....	32
4.2.- Materiales de Laboratorio .....	33
4.3.- Insumos Químicos.....	33
4.4.- Material Vegetal.....	33
5.- Procedimiento y Recolección de Datos .....	34
5.1.- Recolección de la Muestra Vegetal.....	34
5.2.- Extracción y caracterización enzimática.....	34
5.2.1.- Extracción enzimática de las fracciones celulares .....	34
5.2.1.1.- Actividad enzimática de las enzimas L-GalDH/L-GulDH en fracciones celulares .....	35
5.2.2.- Caracterización bioquímica de L-GulDH.....	35
5.2.2.1.- Extracción enzimática.....	35
5.2.2.2.- Actividad enzimática .....	36



5.2.2.3- Efecto de los aceptores de electrones sobre la actividad catalítica .....	36
5.2.2.4- Efecto de los inhibidores sobre la actividad catalítica .....	36
5.2.2.5.- Efecto del pH sobre la actividad catalítica.....	36
5.2.2.6.- Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica.....	37
5.2.2.7.- Determinación de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).....	37
5.3- Cuantificación de proteínas totales .....	37
6- Análisis e interpretación de datos.....	37

## CAPÍTULO IV

1.- Resultados.....	39
2.- Discusión.....	45
3.- Conclusiones.....	48
4.- Recomendaciones .....	49
5.- Bibliografía.....	50
6.- Anexo.....	56

**TITULO:**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE L-GALACTONO/L-GULONO-1,4-LACTONA DESHIDROGENASA DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh “camu-camu”**

# **CAPÍTULO I**

## 1.- Introducción.

Ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble, importante en la dieta alimenticia, por presentar propiedades antioxidantes, <sup>(1)</sup> y ser cofactor enzimático para muchos organismos, <sup>(2)</sup> además participa en la síntesis de colágeno. <sup>(1)</sup> En humanos y en ciertas especies de animales (murciélago, cerdo de guinea y la paloma) esta capacidad de síntesis ha sido perdida, por deficiencia de la enzima L-Gulono-1,4-lactona oxidasa (GUO), que cataliza la oxidación de L-gulono-1,4-lactona a ácido ascórbico. <sup>(2,3,4,5)</sup>

La ruta biosintética de ácido ascórbico en animales está comprendida hace decenios de años, en tanto, la vía metabólica en plantas, aún no está del todo esclarecida. <sup>(6)</sup> Muchos investigadores pusieron especial énfasis, sobre la comprensión de esta vía metabólica en plantas. Es por ello importante mencionar, el estudio pionero realizado por Haworth y Hirst en 1933, donde reportan la síntesis química de ácido ascórbico mediante D-galactosa. <sup>(7)</sup> A partir de este estudio, muchos investigadores propusieron diversos esquemas, donde inmiscuyeron otras hexosas (D-Sorbitol, L-Sorbosa, D-Xilosa y D-Arabinosa) como sustrato para la síntesis de ácido ascórbico, encontrándose mínima estimulación de estos compuestos, para la formación de ácido ascórbico.

Por cierto tiempo la incógnita fue incrementándose, debido a resultados poco convincentes. Dentro de la gran cantidad de inciertos generados, Mapson *et al.* (1954), propone en su estudio realizado en guisante, una ruta metabólica a partir de D-Galactosa, vía L-Galactono-1,4-lactona, para la formación de ácido ascórbico en plantas, <sup>(8)</sup> luego de verificar sus propiedades bioquímicas. De esta manera, se sugirió realizar estudios sobre esta enzima en diferentes especies vegetales.

De esta manera, L-GalDH fue aislado a partir de muchas plantas, que incluyeron al guisante, <sup>(9)</sup> al coliflor (*Brassica oleracea*), <sup>(8,10,11)</sup> a la papa (*Solanum tuberosum*), <sup>(12)</sup> al camote (*Ipomoea batatas*), <sup>(13,14)</sup> a la espinaca (*Spinacia oleracea*), <sup>(15)</sup> al frejol

(*Phaseolus vulgaris*),<sup>(16,17)</sup> al tabaco (*Nicotiana tabacum*),<sup>(18)</sup> al maíz (*Zea mays*),<sup>(19)</sup> al girasol (*Helianthus annuus*),<sup>(19)</sup> a la avena (*Glycine max*),<sup>(19)</sup> al trigo (*Triticum aestivum*),<sup>(19)</sup> y al arabis (*Arabidopsis thaliana*).<sup>(2),(20)</sup> En cambio el estudio de L-GulDH, la enzima homóloga que también sintetiza el paso final de ácido ascórbico, fue registrada sólo en cultivos bacterianos. El primer estudio de caracterización bioquímica fue realizado por Hoshino *et al.* (1993) en el cultivo celular de la bacteria *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 y luego por Wolucka *et al.* (2006)<sup>(24)</sup> en el cultivo celular de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*.

Sin embargo, teniendo en cuenta la existencia de estos estudios enzimáticos, que indican la presencia de estos precursores, para la síntesis de ácido ascórbico, no existen trabajos de investigación, que atribuyan el excesivo incremento de ácido ascórbico en *Myrciaria dubia*, (valor aproximado de 3000 mg/100g de pulpa fresca),<sup>(21,22)</sup> a ninguno de estas enzimas. Lo que sugiere evaluar ambas enzimas (L-GalDH/L-GulDH) en *Myrciaria dubia*, mediante parámetros fisicoquímicos, que nos permitan entender la funcionalidad de ambas enzimas en esta especie vegetal.

Asimismo una definición concreta de estos parámetros bioquímicos, permitiría a la ingeniería de producción de alimentos, mediante procesos biotecnológicos, aumentar la cantidad de ácido ascórbico, no sólo en *Myrciaria dubia*, sino en diversas especies vegetales amazónicas, de esta forma incrementar su valor alimenticio.<sup>(3)</sup>

## **2.- Problema de investigación.**

¿Existirán diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos de la caracterización bioquímica de L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa y L-Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa en *Myrciaria dubia*?

### **3.- Objetivos.**

#### **3.1.- Objetivo general.**

- Caracterizar bioquímicamente L-Galactono/L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc vaugh “camu camu”.

#### **3.2.- Objetivos específicos.**

- Determinar la actividad catalítica de L-Galactono/L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa en las fracciones mitocondriales y citosólicas de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc vaugh “camu camu”.
- Purificar parcialmente las enzimas L-Galactono/L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc vaugh “camu camu”.
- Determinar el efecto de la temperatura, el pH sobre la actividad catalítica de L-Galactono/L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc vaugh “camu camu”.
- Determinar el efecto de los aceptores de electrones, concentración de sustratos e inhibidores enzimáticos sobre la actividad catalítica de L-Galactono/L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc vaugh “camu camu”.

## **CAPÍTULO II.**



## 1.- Marco teórico.

### 1.1.- Antecedentes.

Mapson *et al* (1954).<sup>(9)</sup> Demostraron el incremento de ácido ascórbico en guisantes (*Pisum sativum*), con la estimulación de L-galactono-1,4-lactona en tan sólo 12 horas a una concentración de 0,30 mg/ml. Posteriormente evaluaron el comportamiento de esta enzima, bajo ciertos parámetros bioquímicos. Establecieron que el pH óptimo es 7,5 y que el cianuro a concentración de 30 mM, inhibe en 90% de actividad.

Mapson y Breslow (1958),<sup>(8)</sup> realizaron la purificación de L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa en tejido de coliflor (*Brassica oleracea*). Demostraron que la actividad específica con citocromo C fue de 250 unidades/mg de proteína y con fenazina metosulfato de 16,5 unidades/mg de proteína. Además demostraron que dicha enzima es estable entre pH de 7,4 a 8,2.

Baig *et al.* (1970),<sup>(17)</sup> evaluaron la conversión de los sustratos homólogos, L-Gulono-1,4-lactona y L-Galactono-1,4-lactona a ácido ascórbico, en tejidos de frejol (*Phaseolus vulgaris*, var. 'Pinto') y fresa (*Fragaria*, cv. 'Redglow'). Demostraron que L-Galactono-1,4-lactona a una solución del 0,25 %, triplicó en menos de 10 horas el contenido de ácido ascórbico, en comparación con el sustrato L-Gulono-1,4-Lactona que a una solución de 0,5% que incrementó de 25% a 30% el contenido de ácido ascórbico en 6 horas.

Hoshino *et al.* (1993),<sup>(23)</sup> realizaron la caracterización de la enzima L-GulDH, a partir del cultivo celular de la bacteria *Gluconobacter oxydans* DSM 4025. Determinaron que la enzima es estable a valores de pH entre 7,0 a 7,5 y a temperatura de 0 °C a 60 °C. Además que el EDTA a una concentración de 1,89 mM, no muestra inhibición y que es estable a metales como el CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 0,19 mM.

Ôba *et al.* (1994), <sup>(12)</sup> realizaron la purificación parcial de L-GalDH en papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Irish Cobbler). Observaron que esta enzima tiene un máximo de actividad a pH 7,9; presenta una afinidad de 6,95  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg}$  de proteínas por L-galactono-1,4-lactona y 1,36  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg}$  de proteínas por L-gulono-1,4-lactona y valores de  $K_m$  de 0,08 mM y 0,23 mM, respectivamente.

Ôba *et al.* (1995), <sup>(13)</sup> efectuaron la purificación enzimática de L-GalDH a partir de raíces de camote (*Ipomoea batatas* L., cv. Kintoki). Demostraron que dicha enzima presenta una masa molecular de 56 kDa, y un  $K_m$  de 0,12 mM. Además determinaron que el valor óptimo de pH fue 7,9.

Mutsuda *et al.* (1995), <sup>(15)</sup> elaboraron ensayos enzimáticos sobre L-GalDH en el tejido de espinaca (*Spinacia oleracea*). Determinaron que el  $K_m$  de la enzima para L-Galactono-1,4-lactona y citocromo C fue de 0,192 mM y 0,180 mM, respectivamente.

Østergaard *et al.* (1997), <sup>(10)</sup> efectuaron estudios enzimáticos sobre tejidos de coliflor (*Brassica oleracea*, var. botrytis). Demostraron que la enzima L-GalDH presenta una masa molecular de 56 kDa y un  $K_m$  de 3,3 mM. Asimismo presentó una actividad catalítica óptima a concentraciones de pH entre 8,0 y 8,5.

Imai *et al.* (1998), <sup>(14)</sup> realizaron estudios enzimáticos sobre L-GalDH en papa (*Ipomoea batatas* L., cv. Beniazuma). Demostraron que la actividad fue inhibida por cationes divalentes ( $\text{CuSO}_4$  0,05 mM y  $\text{ZnSO}_4$  0,5 mM) en 1% y 31% de actividad relativa, correspondientemente. Asimismo presentó una actividad específica de 44 unidades  $(\text{mg proteínas})^{-1}$  y un valor de  $K_m$  de 0,12 mM.

Siendones *et al.* (1999), <sup>(16)</sup> comprobaron In Vitro que la estimulación enzimática de L-GalDH en semillas de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L) aumentó en tan solo 24 horas en 180 mU al ser inoculados. Además demostró que L-GalDH, se encuentra en la fracción mitocondrial de este tejido vegetal.

Yabuta *et al.* (2000), <sup>(18)</sup> realizaron una purificación parcial sobre la enzima L-GalDH en tejidos de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*). Mencionan en sus estudios que la enzima presenta un peso molecular de 56,926 kDa y que el valor de  $K_m$  fue de 0,06 mM con respecto a L-GalDH. Además que presenta una actividad optima a pH 8,0.

Bauw *et al.* (2002), <sup>(11)</sup> indican en sus estudios de purificación enzimática de L-GalDH, realizados en el tejido de *Brassica oleracea* (coliflor) que dicha enzima presenta un peso molecular de 57 KDa y una actividad específica de 50800 unidades/mg.

Wolucka *et al.* (2003). <sup>(40)</sup> Mencionan en sus estudios realizado en papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Irish Cobbler), que L-GalDH y L-GulDH, presentan actividad enzimática en las fracciones mitocondriales y citosólicas de esta especie vegetal. Sin embargo L-GulDH en la fracción citosólica presenta mayor actividad catalítica (4,51 mU/g de tejido) que L-GalDH (4,06 mU/g de tejido).

Bartoli *et al.* (2005), <sup>(19)</sup> indican en sus estudios que L-GalDH presenta una masa molecular de 64 kDa en las especies vegetales *Zea mays* (maíz), *Helianthus annuus* (girasol), *Glycine max* (avena) y *Triticum aestivum* (trigo), asimismo presentan actividad enzimática de 20 nmol.mg<sup>-1</sup>protein.min<sup>-1</sup>, 10 nmol.mg<sup>-1</sup>protein.min<sup>-1</sup>, 7 nmol.mg<sup>-1</sup>protein.min<sup>-1</sup>, 3 nmol.mg<sup>-1</sup>protein.min<sup>-1</sup> respectivamente.

Wolucka *et al.* (2006), <sup>(24)</sup> determinaron la presencia de la enzima L-GulDH a partir de la expresión y purificación recombinante en la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, mencionan que es específica para el sustrato L-gulono-1,4-lactono ( $K_m$  5,5 mM) y no para L-galactono-1,4-lactono. Además la actividad específica estuvo en un rango de 40 a 66 mU.mg.proteína y desarrollado eficazmente a 24°C.

Leferink *et al.* (2008), <sup>(2)</sup> reportaron en sus estudios las propiedades bioquímicas en arabis (*Arabidopsis thaliana*) de AtGalDH recombinante. AtGalDH fue oxidado, en adición de L-galactono-1,4-lactona y L-gulono-1,4-lactona, estos sustratos

presentaron un  $K_m$  de 0,17 mM y 13,1 mM respectivamente. Además utilizaron al citocromo C como aceptor de electrones.

Schertl *et al.* (2012),<sup>(20)</sup> demostraron en sus estudios realizado en arabis (*Arabidopsis thaliana*) que L-GalDH es una enzima que forma parte de tres subcomplejos en el complejo mitocondrial I y que presenta una masa molecular de 68 kDa.

Tapullima *et al.* (2013).<sup>(41)</sup> Reportan en sus estudios realizados en plántulas de *M. dubia*, que L-GulDH presenta actividad catalítica en las fracciones mitocondriales y citosólicas, siendo mayor en la fracción citosólica que en la mitocondrial (1,1 a 1,67 veces) para ambos sustratos (L-gulono-1,4-lactona y L-Galactono-1,4-lactona). Asimismo, se observó que la luz indujo la actividad catalítica de la enzima (de 1,26 a 1,43 veces)

## **1.2.- Bases teóricas.**

### **1.2.1.- *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh “Camu camu”**

#### **1.2.1.1.- Clasificación taxonómica.** <sup>(25)</sup>

**APG III** (Angiosperm Phylogeny Group 2009). La especie a estudiar se le clasifica en base a los estudios taxonómicos actuales y es como sigue:

Clase: Magnoliopsida; Sub clase: Rosiidae; Orden: Myrtales; Familia: Myrtaceae

Sub familia: Mytoideae; Tribu: Myrteae; Género: Myrciaria; Especie: *M. dubia*

Nombre científico: *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh; Nombre común: camu camu

#### **1.2.1.2.- Morfología general.**

*M. dubia* es una planta arbustiva, perenne de crecimiento indeterminado. Se distinguen tres tipos de plantas: tipo columnar, que se caracteriza por tener poca o nula ramificación; tipo intermedio, cuya ramificación esta a una altura de 50 a 70 cm del suelo; y el tipo copa abierta o cónica, que es la planta ideal, tiene muchas ramificaciones desde el suelo, con muchas ramas fructíferas. <sup>(26)</sup>

Las hojas varían entre 4,5 y 12 cm de longitud y el ancho entre 1,5 y 4,5 cm; tienen el ápice puntiagudo y la base redondeada, a menudo simétrica. Las inflorescencias son axilares, emergen del mismo punto, con cuatro flores subsésiles, dispuestos en dos pares. Las bractéolas son anchamente aovadas y de ápice redondeado. Los pétalos están de número de cuatro, son de color blanco, de 3 a 4 mm, aovados, cóncavos, glandulosos y ciliados. <sup>(27)</sup>

Los frutos son bayas de color rosado hasta granate oscuro, presentan cuatro estado de maduración, verde (0% de color granate), verde pintón (25 a 50% de coloración granate), pintón (50 a 75% de coloración granate), y el estado maduro (mayor de 75% de coloración granate). El peso del fruto varía en rango que van desde 2 a 4 gramos.

Las semillas son de color marrón, aplanadas cubiertas por fibrillas de color blanco.  
(28)

### **1.2.1.3.- Composición química del camu camu.**

El camu camu es reconocido por presentar alto contenido de vitamina C en relación a otras plantas cítricas conocidas a nivel mundial. De hecho contiene de 30 a 60 veces la cantidad de vitamina C de la naranja <sup>(29)</sup>. La composición química del camu camu en 100 g de pulpa es la siguiente: agua 94,4 g; proteínas 0,5 g; carbohidratos 4,7; grasa 0,1; ceniza 0,2; fibra 0,6; fósforo 17 mg; calcio 27 mg; hierro 0,5 mg; tiamina 0,001 mg; riboflavina 0,04 mg; niacina 0,062 mg; ácido ascórbico total 2,994 mg. <sup>(30)</sup>

### **1.2.2.- Metabolismo del ácido ascórbico en el organismo.**

Ácido ascórbico es absorbida fácilmente en el intestino delgado, principalmente en el duodeno, pudiendo ocurrir en el yeyuno y en el íleon, este proceso activo depende de sodio, siendo SVTC-1 (sodium-dependent vitamin C transporter 1), el transportador que tiene selectividad para el isómero -L del ácido ascórbico y el ácido L-dehidroascórbico (ADA) pero no para glucosa. <sup>(31)</sup> En el cromosoma humano 5q31.2-31.3 se encuentra el gen SLC23A2 que codifica para el transportador SVTC-1 y el SLC23A1 que codifica para el transportador SVTC-2. <sup>(32)</sup> A pesar de que ambos transportadores poseen una gran homología estructural y similitud funcional su distribución es altamente definida ya que SVCT-1 se encuentran en intestino, pulmón e hígado, mientras que SVTC-2 está en ojo y cerebro. <sup>(32,33)</sup>

El Ácido ascórbico puede ser incorporado a una serie de células como neutrófilos y células del sistema nervioso a través de un transportador de la glucosa GLUT 1. Este transportador sólo conduce a la forma oxidada del Ácido ascórbico, el Ácido L-dehidroascórbico y el mecanismo es dependiente de las concentraciones de glucosa plásmatica. <sup>(33)</sup>

Debido a su estructura química el Ácido ascórbico es muy sensible a la degradación. Numerosos factores influyen en los mecanismos degradativos, entre ellos el pH, la concentración de oxígeno, las enzimas, los catalizadores metálicos, la concentración

inicial del ácido y la relación Ácido ascórbico-Ácido L-dehidroascórbico. La degradación del Ácido ascórbico se lleva a cabo mediante procesos oxidativos que resultan de la transferencia de dos electrones. La primera reacción origina el monoanión ascorbato (AH<sup>-</sup>), el cual, con la pérdida adicional de un segundo electrón forma el Ácido L-dehidroascórbico, altamente inestable y susceptible a la hidrólisis del anillo lactona que se hidrolisa con gran facilidad para producir ácido 2,3-dicetogulónico, que posteriormente se degrada por descarboxilación, con la consiguiente pérdida del valor nutricional del Ácido ascórbico. <sup>(34)</sup>

### **1.2.3.- Metabolismo del ácido ascórbico en las plantas.**

La ruta propuesta en plantas sugiere un proceso para la síntesis de L-galactono-1,4-lactono desde D-Glucosa que no involucra la inversión del esqueleto de carbono, <sup>(35)</sup> esto se basa en la observación de que los tejidos de las plantas rápidamente convierten L-galactosa aportada exógenamente a Ácido ascórbico y también en la identificación de una nueva enzima, la L-galactosa deshidrogenasa que oxida L-galactosa en C-1, produciendo L-galactono-1,4-lactona. <sup>(3)</sup>

El sustrato para L-Galactono-1,4-lactono deshidrogenasa, L-galactono-1,4-lactono, fue reportado como un componente natural en extractos de plantas. Estudios de radio marcaje con <sup>14</sup>C realizadas in vivo demuestran que la [<sup>14</sup>C] manosa es rápidamente convertido a ácido ascórbico. Consistentemente el 80% de D-glucosa es incorporada a ácido ascórbico por una senda que no involucra la inversión del esqueleto carbonado. La función de carbonil (C<sub>1</sub>) de Ácido ascórbico, se forma por la oxidación del C<sub>1</sub> de D-glucosa. Otra característica de la senda biosintética de ácido ascórbico de la planta es que el grupo hidroximetil en C<sub>6</sub> es conservado durante la síntesis y hay una pérdida de [5-<sup>3</sup>H]-D-glucosa, sugiriendo que este sitio es el lugar de la epimeración que causa la conversión de Dextrorrotatorio (-D) para la configuración de Levorotatorio (-L). <sup>(36)</sup>

Asimismo el contenido de ácido ascórbico en plantas puede ser aumentado (aunque en menor intensidad) con L-gulonolactona (en algunas especies), D-galacturonato

(metil éster) y D-glucorono-3,6-lactona.<sup>(37)</sup> El C-6 de los últimos dos compuestos se transforma en el C<sub>1</sub> del ácido ascórbico resultante<sup>(38)</sup> y estos derivados de ácido urónico formarían L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa. El significado fisiológico de estas conversiones es difícil de asegurar y no se puede descartar que parte del ácido ascórbico se forme a partir de D-galacturonato liberado de la pectina de a pared celular (ácido poligalacturónico). La forma de los intermediarios no se ha establecido aún. Debido a la reciente identificación de la ruta biosintética del ácido ascórbico. (Anexo 01)

#### **1.2.4.- L-Galactono/L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa.**

L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (L-GalDH) es una enzima ubicada en la membrana mitocondrial interna de las células vegetales, que participa en la etapa final de la biosíntesis de ácido ascórbico en plantas superiores.<sup>(6)</sup>

La actividad de L-GalDH ha sido informado en diferentes especies de plantas, como el frijol, fresa, espinaca, avena, papa blanca, maíz, camote, y coliflor, asimismo ha sido purificada en batata<sup>(13,14)</sup> y coliflor,<sup>(10)</sup> componiéndose de un polipéptido de 56 kDa y que presenta residuos de cisteína importantes para la actividad enzimática. Los datos obtenidos con respecto a la cinética de L-GalDH difieren algo entre la enzima extraída de la coliflor y de la patata dulce. Fue demostrado que L-GalDH en coliflor presenta una constante de Michaelis aparente ( $K_m$ ) de 3,3 mM,<sup>(10)</sup> mientras que la enzima en el camote demostró un  $K_m$  para el mismo sustrato de 0,12 mM.<sup>(13)</sup>

La L-galactosa liberada desde el nucleótido al parecer es el precursor inmediato de L-GalDH,<sup>(3)</sup> enzima que es bastante específica para L-galactono-1,4-lactona como sustrato en plantas,<sup>(8,10,13)</sup> que al contrario de otras enzimas que participan en la biosíntesis de ácido ascórbico en mamíferos (L-gulono-1,4-oxidasa lactona) y en hongos (D-arabino-1,4-lactona oxidasa),<sup>(19)</sup> está no produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un sub-producto,<sup>(16)</sup> que podría deberse a la evolución de la enzima, que evita la excesiva oxidación y de esta forma mantiene su actividad, asimismo la estimulación de la



síntesis de ácido ascórbico debe resultar de una mayor actividad en L-GalDH, que podría explicarse por aumento de la catálisis de L-GalDH. <sup>(16)</sup>

La alta especificidad de L-GalDH (In vitro) por el citocromo C como receptor de electrones <sup>(8,10,12,15)</sup> generó examinar el papel de esta enzima en el transporte de electrones mitocondriales. Utilizando las fracciones de mitocondrias purificada a partir de tubérculos de patata. <sup>(12,14)</sup> se encontró que la velocidad de respiración y la síntesis de ácido ascórbico aumentaron significativamente cuando galactono-1,4-lactona se añadió a la inducción de la síntesis del medio. Este ácido ascórbico se suprimió a partir de la adición del citocromo C oxidasa, y un inhibidor, cianuro de potasio, lo que sugiere que L-GalDH es incapaz de catalizar la síntesis de ácido ascórbico cuando su aceptor de electrones, el citocromo C, está totalmente reducido. <sup>(18)</sup> De esta manera L-GalDH también puede actuar como una fuente alternativa de electrones para la reducción del citocromo C, a pesar de que la entrega de L-galactono-1,4-lactona puede ser limitado, el impacto de esta actividad en la respiración mitocondrial no se conoce. <sup>(18)</sup> Datos de secuencia de N-terminales de aminoácidos de L-GalDH indican que aparentemente es sintetizado como una preproteína de 68 kDa (600 aminoácidos), y que luego se procesa en un aparentemente aminoácido maduro (calculado) 57,8 kDa de 509 aminoácidos. <sup>(10)</sup>

Nuevos reportes describen rutas alternativas para la biosíntesis de ácido ascórbico, lo que sugiere su complejidad. GDP-Gulosa y *myo*-inositol son propuestos como nuevos intermediarios, que catalizadas por diversas enzimas, originan el ácido L-gulónico, sustrato que mediante la enzima aldono-lactonasa, origina el sustrato L-gulono-1,4-lactona. Este sustrato genera el paso final de la biosíntesis de ácido ascórbico mediante la enzima L-gulono-1,4-lactono deshidrogenasa. <sup>(24)</sup> Sin embargo los estudios acerca de esta enzima fueron realizada en los cultivos celulares de las bacterias *Mycobacterium tuberculosis* y *Gluconobacter oxydans* DSM 4025, microorganismos que presentan segmentos de gen que codifican la enzima L-gulono-1,4-lactono deshidrogenasa y que es capaz de convertir el L-gulono-1,4-lactono en ácido ascórbico.

#### 1.2.4.1- Parámetros fisicoquímicos de L-Gulono/L-Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa

Los parámetros fisicoquímicos, nos permiten comprender el comportamiento de compuestos celulares (enzimas) ante ciertos estímulos exógenos, de esta manera, se pudiesen entender los procesos bioquímicos involucrados en los sistemas celulares. L-Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (L-GalDH), es una enzima que presenta más de 50 años de estudio en comparación con L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa (L-GulDH). L-GalDH es una enzima mitocondrial, que presenta una masa molecular de 56 kDa <sup>(11,13,18,20)</sup>, un máximo de actividad a pH 7,5 <sup>(13, 14)</sup> y mínima a pH 5.9 <sup>(8)</sup>, puede ser inhibida por sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>) y licorina a concentraciones de 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-4</sup> M y 10<sup>-5</sup> M <sup>(14)</sup> respectivamente, muy estable a temperaturas entre 25 °C a 40 °C <sup>(15)</sup>, y presenta afinidad por el Citocromo C <sup>(8,10,12,14,15)</sup> como aceptor de electrones, y con respecto a su  $k_m$ , presenta diversos valores como 0,08 mM, 0,23 mM <sup>(12)</sup>, 0,12 mM <sup>(13)</sup>, 0,192 mM <sup>(15)</sup>, 3,3 mM <sup>(10)</sup> y 0,17 mM <sup>(20)</sup>, 0,06 mM <sup>(18)</sup>. En tanto L-GulDH, es una enzima estable a pH entre 7,5 a 8,0, invariable a temperaturas de 25 °C y 30 °C, e inestable a 60 °C, inhibida por CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O a 0,89 mM, MnSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O a 0,89 mM, el efecto de inhibidores como el EDTA y el KCN a concentraciones de 1,89 mM, <sup>(23)</sup> aparentemente no afectan la cinética enzimática de L-GulDH y presenta valores de  $k_m$  13,1 mM <sup>(20)</sup> y 5,5 mM <sup>(24)</sup>.

## **2.- Definiciones operacionales.**

### **2.1.- Variables.**

#### **2.1.1.- Variable independiente.**

Parámetros fisicoquímicos de L-Gulono/L-Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa de *Myrciaria dubia*.

##### **- Indicadores**

- Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de L-Gul/L-GalDH de *Myrciaria dubia*.
- Efecto del pH sobre la actividad enzimática de L-Gul/L-GalDH de *Myrciaria dubia*.
- Efecto de aceptores de electrones (Citocromo C, Fenasa metasulfato, benzoquinona,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ) sobre la actividad enzimática de L-Gul/L-GalDH de *Myrciaria dubia*.
- Efecto de inhibidores enzimáticos sobre la actividad enzimática de L-Gul/L-GalDH de *Myrciaria dubia*.

#### **2.1.2.- Variable dependiente.**

Actividad catalítica de L-Galactono/L-Gulono-1,4-Lactona Deshidrogenasa

##### **- Indicadores**

- $\mu\text{mol}$  de sustratos (L-Gulono/L-Galactono-1,4-lactona) que convierte un producto en minuto

## 2.2.- Operacionalización de las variables

Variable Independiente	Definición conceptual	Indicador	Definición operacional	Tipo de variable	Índices
Caracterización bioquímica de L-Gulono/L-Galactono-deshidrogenasa de <i>Myrciaria dubia</i> "camu-camu"	Medición de los parámetros fisicoquímicos sobre la actividad catalítica de L-Gulono/L-Galactono deshidrogenasa	Sustratos (mM)	Cantidad de sustratos (mM) convertidos en productos en un minutos	Cuantitativa	0,10-100 mM
		Potencial de hidrógeniones (pH)	Efecto del potencial de hidrógeniones (pH) sobre la actividad enzimática de L-GulDH/L-GalDH	Cuantitativa	4,0-8,5
		Temperatura (°C)	Efecto de la temperatura (°C), sobre la actividad catalítica L-GulDH/L-GalDH	Cuantitativa	0-90 °C
		Aceptores de electrones (µmol)	Cantidad de Citocromo C, fenasina metasulfato y benzoquinona, NAD*,NADP+ (µmol) reducido por minuto	Cuantitativa	10 mM
		Inhibidores	Efecto de EDTA, Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> ), Sulfato de Zinc (ZnSO <sub>4</sub> ), Cloruro de mercurio (HgCl <sub>2</sub> ) y N-etilamilamida (1mM) sobre la actividad catalítica de L-GulDH/L-GalDH	Cuantitativa	1 mM

Variable dependiente	Definición conceptual	Indicador	Definición operacional	Tipo de variable	Índices
Actividad catalítica de L-Gulono/L-Galactono-deshidrogenasa de <i>Myrciaria dubia</i> "camu-camu"	Cantidad de sustrato que transforma un $\mu\text{mol}$ de enzima en un minuto	L-Galactono/L-Gulono-1,4-lactona ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Cantidad de L-Gulono-1,4-lactona ( $\mu\text{mol}$ ) que convierte un producto en minuto.	Cuantitativa	1-100 $\mu\text{mol}/\text{min}$
			Cantidad de L-Galactono-1,4-lactona ( $\mu\text{mol}$ ) que convierte un producto en minuto.	Cuantitativa	1-100 $\mu\text{mol}/\text{min}$

### **3.- Hipótesis.**

Los parámetros fisicoquímicos establecidos en la caracterización bioquímica, influyen en la actividad catalítica de Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa y L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa de *Myrciaria dubia*.

## **CAPITULO III**

## **1.- Metodología.**

### **1.1.- Tipo de estudio.**

**Experimental:** porque los objetivos o variables fueron planeados.

**Prospectivo:** porque los datos fueron recogidos a propósito por el investigador.

**Transversal:** porque todas las variables fueron medidas en un solo momento.

**Analítico:** porque se plantea y pone a prueba hipótesis.

### **2.- Diseño de investigación.**

Se realizó la extracción de las fracciones celulares (mitocondrial y citosólica) de acuerdo al protocolo de Siendones *et al.* (1999).<sup>(16)</sup> La purificación parcial de L-GALDH y L-GULDH fue realizado en el tejido liofilizado de *M. dubia* mediante los protocolos utilizados por Ôba *et al.* (1995)<sup>(13)</sup> e Imai *et al.* (1998).<sup>(14)</sup> La caracterización bioquímica se realizará de acuerdo a los métodos planteados por Ôba *et al.* (1995),<sup>(13)</sup> Imai *et al.* (1998)<sup>(12)</sup> y Hoshino *et al.* (1993).<sup>(23)</sup> La cuantificación de proteínas se determinó mediante el método Bradford (1976).<sup>(39)</sup>

### **3.- Población y muestra.**

#### **3.1.- Población vegetal.**

La población estuvo constituida por todas las plantas de *M. dubia* en estado de fructificación, constituido por un total de 43 accesiones provenientes del Campo experimental el "DORADO", Km 25½ de la carretera Iquitos-Nauta.

#### **3.2.- Muestra vegetal.**

La muestra vegetal estuvo constituida por 100 plantas en estado de fructificación seleccionadas de forma aleatoria.



- **Criterios de inclusión**

- Plantas de *M. dubia* vegetales en buen estado, sin presencia de hongos o parásitos
- Plantas de *M. dubia* que pertenezcan al banco de germoplasma del INIA
- Plantas de *M. dubia* en estado de fructificación.

- **Criterios de exclusión**

- Plantas de *M. dubia* en mal estado, con presencia de hongos o parásitos
- Plantas de *M. dubia* que no pertenezcan al banco de germoplasma del INIA
- Plantas de *M. dubia* que no presenten fructificación.

#### **4.- Instrumentos y materiales.**

##### **4.1.- Equipos.**

Agitador magnético digital con placa calefactora (Thermo Scientific, velocidad: 60 a 1200 rpm, temperatura: 5 a 300 °C); Autoclave (Yamato SM 510, rango de ajuste de temperatura: esterilizado 105 °C~128 °C, secado 150 °C~180 °C); Balanza Analítica (Sartorius, rango de pesaje 100-220 g, con variación entre 0,001-0,1 mg); Baño María (Labnet, capacidad 6 litros, rango de temperatura: +5 °C a 100 °C); Cámara de congelamiento (Labconco, temperatura de trabajo: -40 °C, líquido de transmisión: etanol 96°); Centrífuga (Hettich Zentrifugen, capacidad máxima: 30 x 2 ml, velocidad (rpm): 1500, aceleración (g): 21380); Cocina eléctrica (Oxford, temperatura máxima de trabajo: 100 °C); Destilador de agua (Barnstead Fistream III Glass Still, temperatura de agua fría: 4 °C-20 °C, agua tratada: más de 1-2 litros/min.), Espectrofotómetro (Genesys 6.0, rango UV-Visible: 190 nm-1110 nm), Incubadora (Ecocell III, capacidad: 22 litros, temperatura máximo de trabajo: 250 °C). Equipo de liofilización (Labconco, presión de trabajo: 120 mBar a 140 mBar), pHmetro (Thermo Scientific, rango de pH: -2 a 20, precisión:  $\pm 0,002$ , rango de temperatura: 5 a 105 °C), Purificador de agua (EASY pure RoDi Ultrapure, rango de presión: 2 bar a 6,0 bar, rango de temperatura: 4-49% humedad relativa), Vortex. (Labnet, voltaje de trabajo 220 V).

#### **4.2.- Materiales de laboratorio.**

Cuaderno de laboratorio, cubetas de plásticos, cubeta de cuarso, fiola graduada de 200 ml, guantes estériles N° 7, lápices, lapiceros, Matraz Erlenmeyer de 2000 ml, Membrana de diálisis (Fisher brand nominal MWCO 6000-8000), Micropipetas de 0,5-10  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l y 100-1000  $\mu$ l, Microtubos de 200  $\mu$ l, 1.5 ml, Mortero, pilón, Parafilm, Pastilla magnética, Pissetas, Probeta graduada de 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml, Rotulador, Tips de 1-10  $\mu$ l, 1-20  $\mu$ l, 1-200  $\mu$ l, Vasos precipitados de 10 ml, 50 ml, 250 ml, 2000 ml, 1000ml.

#### **4.3.- Insumos químicos**

Azul de Coomassie G-250, ácido clorhídrico (HCl), ácido ortofosfórico, benzamedina hidrocioruro, etanol absoluto (96°), etildimetilamida (EDTA), fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), dihidrogeno fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), di-potasio hidrogenofosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), glicerol, glutation Reducido (GSH), hidróxido de sodio (NaOH), polivinil pirrolidona(PVP), sulfato de amonio, suero Bovino Albúmina (BSA), tris-HCl, triton X-100, sucrosa, Cianuro de potasio (KCN), L-Galactono-1,4-lactona, L-Gulono-1,4-lactona, Nicotinamida adenin dinucleótido (NAD), Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADP), Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ), Cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ), riboflavina, citocromo C, 1,4-benzoquinona, fenazina metosulfato, acetato de sodio, citrato de sodio, ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico (MES), sulfato de *N*-2-hidroxietilpiperazina-*N'*-2-etano (HEPES), ácido 2-(ciclohexilamino) etanosulfónico (CHES), flavina adenin dinucleótico (FAD), 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP).

#### **4.4.- Material vegetal**

Constituido por frutos y hojas de *M. dubia*

## **5.- Procedimiento y recolección de datos.**

### **5.1.- Recolección de la muestra vegetal.**

La muestra vegetal fue colectado al azar del Campo Experimental “El Dorado” del Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA, ubicado a la altura Km 25½ de la carretera Iquitos-Nauta, ubicada en las coordenadas 03° 57' 17'' LS y 73° 24' 55'' LO con altitud de 112 msnm, el cual se encuentra constituido por 43 accesiones, que son muestras representativas de la variabilidad genética de esta especie; pertenecientes a 8 principales cuencas hidrográficas de la región Loreto (Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre y Amazonas).

### **5.2.- Extracción y caracterización enzimática.**

Todos los procedimientos realizados sobre las fracciones celulares y la caracterización bioquímica, fueron realizados a 4 °C.

#### **5.2.1.- Extracción enzimática de las fracciones celulares.**

El aislamiento de las fracciones mitocondriales y citosólicas, fue realizado de acuerdo a Siendones *et al.* (1999).<sup>(16)</sup> Se utilizó 500 mg del tejido vegetal de *M. dubia* (hoja, cáscara y pulpa), las cuales fueron fraccionadas individualmente, trituradas y homogenizadas con 5 ml del tampón de extracción (Buffer fosfato de potasio pH 7,5 200 mM, Sucrosa 400 mM, GSH 5 mM, PVP 2,5%, ácido aminocaproico 1mM, benzamedina 1mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM). Las muestras homogenizadas fueron filtradas en 2 capas de miracloth y sonicadas por 5 minutos. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 1500g por 15 minutos a 4 °C. Se descartó el precipitado y el sobrenadante fue centrifugado a 21380g por 20 minutos. El precipitado obtenido corresponde a la fracción mitocondrial. El sobrenadante fue mezclado con acetona fría, a una proporción de 1:1 (v/v). Se centrifugó a 21380g por 20 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido consiste en la fracción citosólica. Ambas fracciones fueron homogenizadas con el buffer de resuspensión (Tris pH 7,5, 25 mM, glicerol 5%, PMSF 1 mM, Tritón X-100 0,3%, GSH 5 mM) a pH 7.5.

### **5.2.1.1.- Actividad enzimática de las enzimas L-GalDH y L-GulDH en las fracciones celulares.**

Fue realizado de acuerdo a Hoshino *et al.* (1993)<sup>(23)</sup> y Ôba *et al.* (1995)<sup>(13)</sup>. Los ensayos estándares contenían tampón fosfato de potasio 10 mM pH 7,5, Triton X-100, 0,03 %, Cianuro de potasio 0,1 mM, 2,6-diclorofenolindofenol 0,16 mM, L-Gulono-1,4-lactona 5 mM. La reacción se inició por la adición de 10 µl del extracto enzimático, registrándose la absorbancia a 600 nm cada 5 segundos por 5 min a 25 °C. El control negativo de los ensayos contenía 10 µl del extracto enzimático inactivo (tratado a 100 °C por 10 min) y los demás componentes de la reacción. Los valores de velocidad inicial fueron calculados usando la diferencia del coeficiente de extinción molar ( $\Delta\epsilon$ ) de 14.5 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para el 2,6-diclorofenolindofenol.

### **5.2.2.- Caracterización bioquímica L-Gulono-1,4-Lactona deshidrogenasa.**

#### **5.2.2.1.- Extracción enzimática.**

Se realizó de acuerdo al protocolo de Ôba *et al.* (1995)<sup>(13)</sup> e Imai *et al.* (1998).<sup>(14)</sup> Se peso 25 gr de la muestra, y se trituró con 200 ml del tampón de extracción (Buffer fosfato de potasio pH 7,5 200 mM, Sucrosa 400 mM, GSH 5 mM, PVP 2,5%, ácido aminocaproico 1mM, benzamedina 1mM, EDTA 1 mM, PMSF 1mM). El homogenizado se filtro a través de 3 capas de miracloth y se centrifugó a 1789g. El sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio al 10%, se centrifugó a 1789g. El sobrenadante obtenido fue precipitado con sulfato de amonio al 80% y se centrifugó a 1789g. El precipitado fue homogenizado con 4 ml del buffer de resuspención (Tris pH 7.5 25 mM, glicerol 5%, PMSF 1 mM, Tritón X-100 0,3%, GSH 5 mM). Luego fue dializado por 4 horas. El producto obtenido fue purificado y concentrado en filtros de centrifugación de 30 K (12,400 KDa-67 KDa), y se adicionó FAD<sup>+</sup> 1 mM. Luego fue almacenado a 4 °C para su posterior caracterización.

#### **5.2.2.2.- Actividad enzimática**

Los ensayos enzimáticos fueron realizados de acuerdo a Hoshino *et al.* (1993)<sup>(23)</sup> y Ôba *et al.* (1995)<sup>(13)</sup> a 25 °C, por la medición decreciente de la absorbancia del 2,6-diclorofenolindofenol por espectrofotometría a 600 nm.

La reacción enzimática contuvo: tampón fosfato de potasio pH 7,5, 10 mM, tritón x-100, 0,03%, cianuro de potasio 10 mM, 2,6-diclorofenolindofenol 0,16 mM, sustrato 5 mM, extracto enzimático 10 µl, agua; en un volumen final de reacción de 1 ml.

#### **5.2.2.3.- Efecto de los aceptores de electrones sobre la actividad catalítica.**

Se evaluó la afinidad de aceptores de electrones (Citocromo C 0,1 mM a 550 nm, Fenasina metasulfato 0,1 mM a 600 nm, 1,4-benzoquinona 0,1 mM a 290 nm, NAD 0,1 mM a 340 nm y NADP 0,1 mM a 340 nm) sobre la actividad enzimática, mediante el método descrito en el primer paso, cambiándose sólo el 2,6-diclorofenolindofenol por los aceptores de electrones establecidos para este experimento. Fueron evaluados a sus longitudes de onda correspondientes.

#### **5.2.2.4.- Efecto de los inhibidores sobre la actividad catalítica.**

Utilizando el método descrito en el primer paso, se examinó el efecto de varios inhibidores enzimáticos, (Cloruro de mercurio 1 mM, sulfato de cobre 1 mM, sulfato de zinc 1 mM, N-etilmaleimida 1 mM y EDTA 1 mM). Estos inhibidores enzimáticos fueron incubadas junto al extracto enzimático por 10 minutos, posteriormente se realizó la cinética enzimática.

#### **5.2.2.5.- Efecto del pH sobre la actividad catalítica.**

La correlación entre el efecto del pH y la actividad catalítica de L-GulDH fue determinado, usando el método enzimático descrito anteriormente. Se determinó la estabilidad de la enzima utilizando diferentes soluciones amortiguadoras (tampón citrato 25 mM pH 4,03; tampón acetato 25 mM pH 5,01; tampón MES 25 mM pH 6,0; tampón PBS 25 mM pH 7,02; tampón HEPES 25 mM pH 8,0; tampón Tris 100 mM pH 9,01; tampón CHES 100 mM pH 10,0).



#### **5.2.2.6.- Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica.**

Las enzimas son un extracto de proteínas que fueron tratadas por 20 minutos a temperaturas entre 0 °C a 90 °C en tampón fosfato de potasio 10 mM pH 7,5, posteriormente fueron colocados en un recipiente con agua helada. La actividad enzimática fue determinado mediante el método descrito en el primer paso.

#### **5.2.2.7.- Determinación de la Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ )**

La determinación del  $K_m$  fue realizado, utilizando diversas concentraciones de los sustratos (L-GalDH y L-GulDH) entre 10 mM a 0,3125 mM. Se empleó el método descrito en el primer paso.

#### **5.3.- Cuantificación de proteínas totales.**

Se realizó de acuerdo al método de Bradford. <sup>(39)</sup> Se preparó soluciones estándares de albúmina suero bovino (B.S.A.) entre 1,0 mg/ml a 0,0078125 mg/ml, y se obtuvo la ecuación en la recta ( $R^2 > 0,9959$ ), la reacción consistió en adicionar 1 ml del reactivo de Bradford (azul de coomassie G-250, etanol absoluto 5% y ácido ortofosfórico 10%) 50  $\mu$ l de NaOH 1 N y 10  $\mu$ l de cada estándar. Las lecturas se realizaron en el equipo espectrofotométrico Génesys 6,0 UV/Vis a 596 nm, a partir de estos resultados se obtuvo la ecuación en la recta. La determinación de la cantidad de proteínas totales de las muestras desconocidas, se realizó con la medición de las absorbancias.

#### **6.- Análisis e interpretación de datos**

Los datos experimentales sobre la cuantificación de proteínas totales y la medición de la actividad catalítica de las enzimas L-GalDH y L-GulDH fueron almacenados en una base de datos del programa Microsoft Excel 2010. Los análisis estadísticos (promedios, error estándar de la media,) se realizaron empleando el programa IBM SPSS Statistics v 21 y BioEstat.

## **CAPITULO IV**

## 1.- Resultados

Las enzimas L-GalDH y L-GulDH, mostraron actividad catalítica en *M. dubia*, se observó que L-GulDH ( $18,37 \pm 4,51 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ) muestra hasta 3 veces más actividad catalítica que L-GalDH ( $5,59 \pm 3,97 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ). Siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $t= 6,873$ ,  $GL= 18$ ,  $P < 0,001$ ), se decidió a analizar las propiedades bioquímicas de la enzima L-GulDH.

Respecto a la ubicación celular de la enzima L-GulDH, los hallazgos indican que esta enzima se encuentra en diferentes tejidos analizados de *M. dubia* (Fig. 1). La enzima presentó diferencias significativas entre las fracciones mitocondriales y citosólicas de las hojas ( $t= -13,2293$ ,  $GL= 22$ ,  $P < 0,001$ ), como en las fracciones celulares mitocondriales y citosólicas de la pulpa madura ( $t=-11,425$ ,  $GL= 22$ ,  $P < 0,001$ ). En tanto, las fracciones mitocondriales y citosólicas de la cáscara madura, no mostró diferencias significativas ( $t=2,5955$ ,  $GL= 22$ ,  $P < 0,0168$ ). Mientras, que en la fracción mitocondrial de las hojas, L-GulDH incrementó en 4,70 y 4,01 veces su actividad enzimática con respecto a pulpa y cáscara madura. Además L-GulDH en la fracción citosólica de hojas, evidenció un incremento de 3,13 y 6,89 veces su actividad enzimática con respecto a pulpa y cáscara madura.

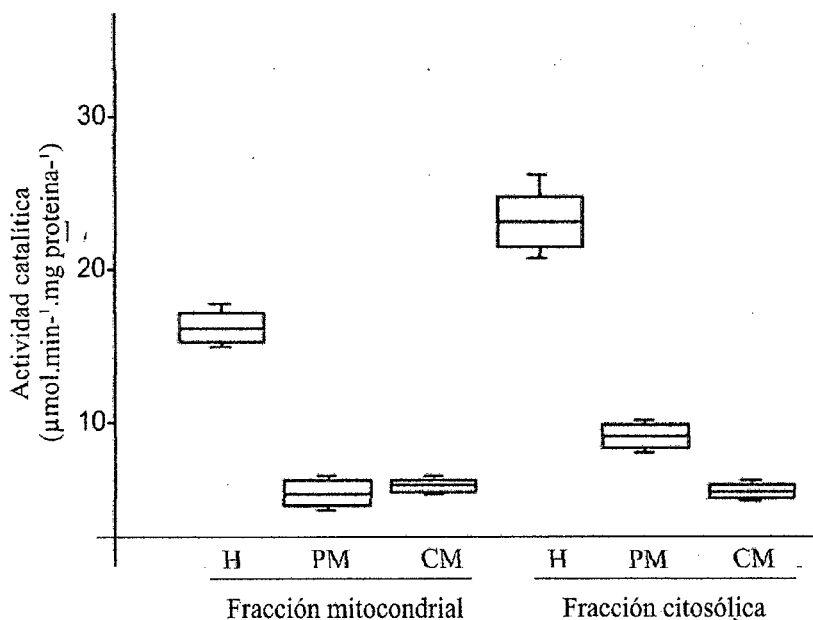
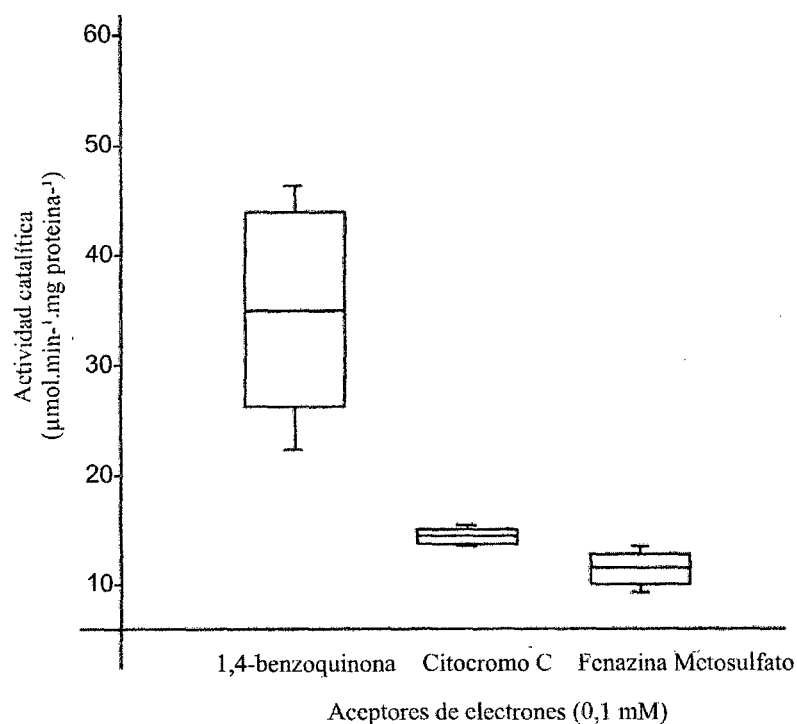


Fig. 1. H: Hoja, PM: Pulpa madura, CM: Cáscara madura. Actividad catalítica de L-GulDH en la fracción mitocondrial y citosólica de tejidos de *M. dubia*. Las barras de errores corresponden a la desviación estándar



La enzima L-GulDH de *M. dubia*, mostró actividad catalítica con diferentes aceptores de electrones. (Fig. 2). Sin embargo la actividad catalítica de L-GulDH, fue mayor con 1,4-benzoquinona ( $36,88 \pm 8,90 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ), que con los otros aceptores de electrones, de tal modo que fue 2,29 y 2,81 veces a la obtenida por citocromo C ( $16,09 \pm 0,59 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ) y Fenazina metosulfato ( $13,01 \pm 1,41 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ). El efecto de la actividad catalítica de L-GulDH, no se detectó con los aceptores de electrones  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ . Mediante los análisis estadísticos, se encontró que existen diferencias significativas en la actividad catalítica con los aceptores de electrones evaluados. ( $F= 61,688$ ,  $GL= 2$ ,  $P < 0,01$ ).



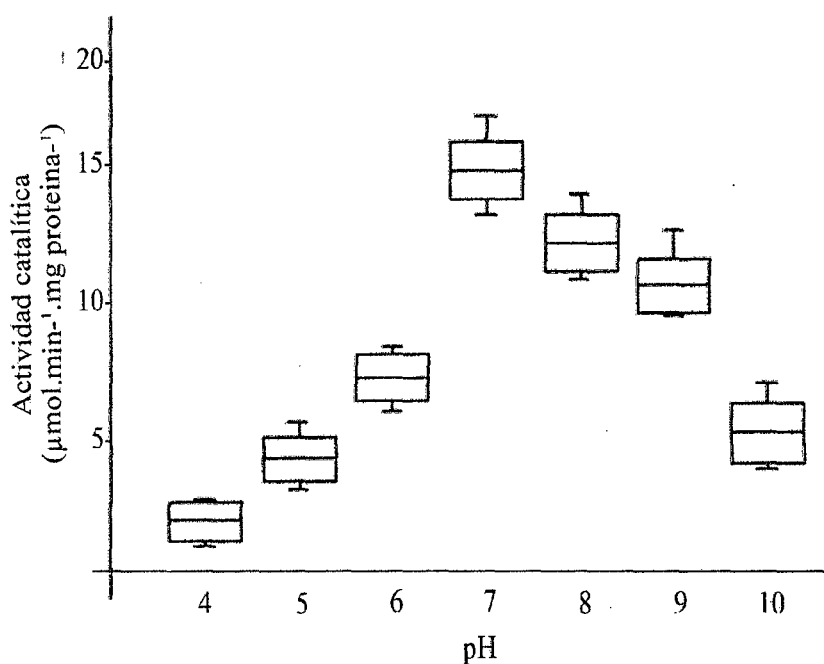
**Fig. 2:** Actividad catalítica específica de L-GulDH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ ) con diferentes aceptores de electrones. Las barras de errores corresponden a la desviación estándar.

Asimismo, varios compuesto inhibieron la actividad catalítica de L-GulDH de *M. dubia*. En la Fig.3, se observó una fuerte inhibición por parte de iones metálicos, presentes en el sulfato de cobre (97,740% de inhibición), cloruro de mercurio (95,950% de inhibición), y en el Sulfato de Zinc (83,523% de inhibición). También se observó la inhibición con N-etilmaleimida (91,895% de inhibición) y con el agente quelante, EDTA (85,172% de inhibición). Estos resultados presentaron diferencias significativas ( $F= 24,794$ ,  $GL= 4$ ,  $P< 0,01$ ).

<b>Efecto de inhibidores sobre la actividad catalítica de L-GulDH</b>		
Inhibidor	Actividad específica	
	( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ )	Inhibición (%)
Sulfato de Cobre	$1.80 \pm 0,66$	97.740
Cloruro de Mercurio	$3.21 \pm 0,90$	95.950
N-Etilmaleimida	$6.42 \pm 1,12$	91.895
EDTA	$11.73 \pm 2,40$	85.172
Sulfato de Zinc	$26.38 \pm 13,86$	83.523
Sin inhibidor	$80.78 \pm 7,55$	-

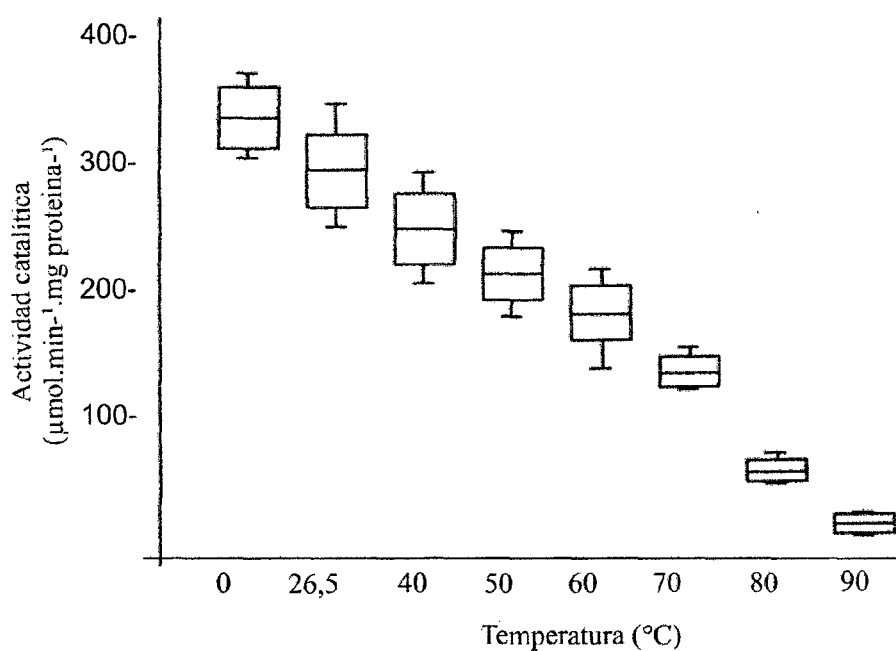
**Tabla. 1.** Los datos representan el promedio y la desviación estándar de la Actividad catalítica específica de L-GulDH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$ ) ante varios inhibidores.

En cuanto al efecto del pH sobre la actividad catalítica de L-GulDH, se observó que presenta un pH óptimo de 7 (100% de actividad relativa). En la Fig. 4, se muestra que la actividad catalítica de la enzima, disminuye en el rango de pH ácido (4-6), de 13% a 18%. Mientras que en el rango de pH alcalino (8-10), la actividad catalítica de la enzima disminuyó de 35% a 81%. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, con respecto al pH óptimo ( $F= 248,645$ ,  $GL= 6$ ,  $P< 0,01$ ).



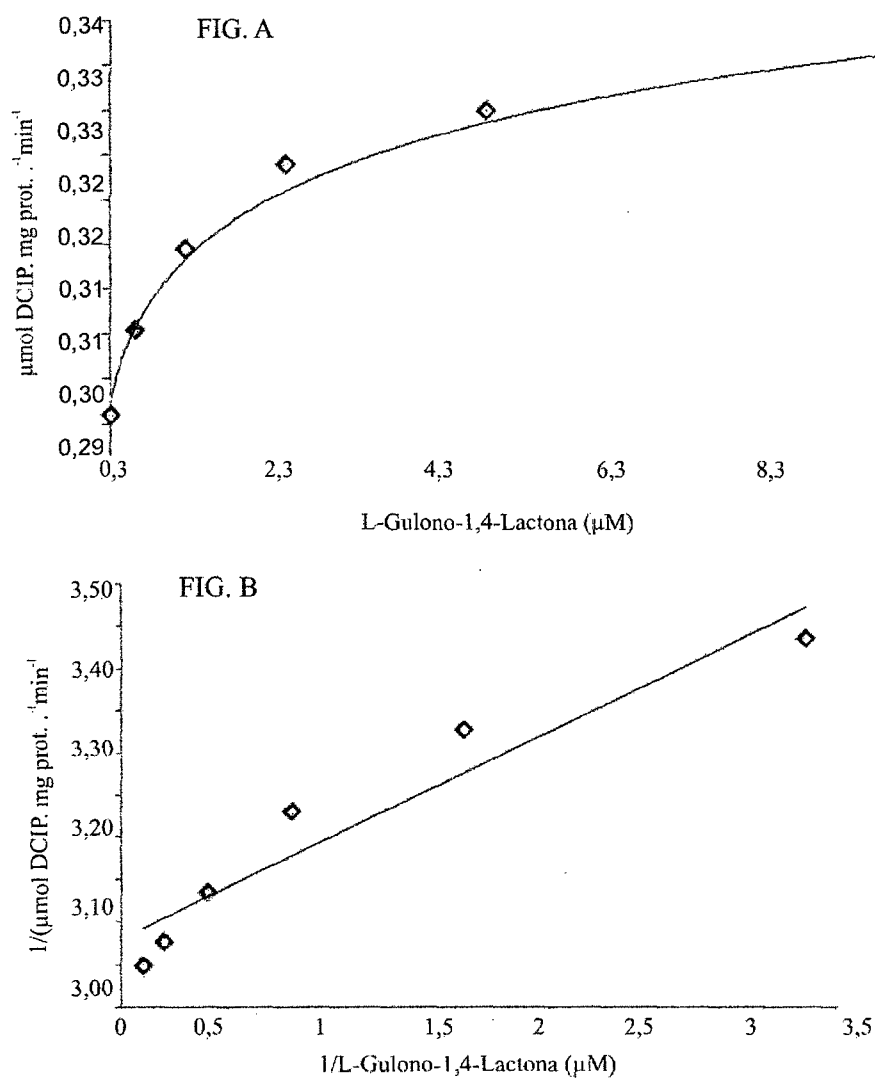
**Fig. 3** Actividad catalítica específica de L-GulDH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ ) a diversos valores de pH. Las barras de errores corresponden a la desviación estándar.

La actividad catalítica de la enzima no es afectada significativamente a bajas temperaturas desde 0 °C a 26,5 °C. (Fig. 5). Sin embargo al someter a la enzima a elevadas temperaturas (40 °C a 90 °C) se evidenció una disminución de gradual y significativa de 74% a 7% de la actividad catalítica de L-GulDH. Los resultados obtenidos mostraron valores estadísticos significativos ( $F= 298,009$ ,  $GL= 7$ ,  $P< 0,01$ )



**Fig. 4.** Actividad catalítica específica de L-GulDH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ ) con diversos grados de temperatura. Las barras de errores corresponden a la desviación estándar

Respecto al efecto de la concentración del sustrato L-Gulono-1,4-lactona sobre la actividad de L-GulDH, se observa que la enzima muestra una cinética Michaelis-Menten, debido a la forma de hipérbola de la actividad enzimática en diferentes concentraciones del sustrato (Fig. A). Al representar los datos de acuerdo a Lineweaver-Burk (Fig. B) se pudo determinar que el  $K_m$  de la enzima fue de 0,00827 mM. La velocidad media y máxima fue de 0,162 mmol.mg prot<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> y 0,324 mmol.mg prot<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> respectivamente.



**Fig.5.** Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de la enzima

## 2.- Discusión

La enzima L-GulDH, presento actividad catalítica en las fracciones mitocondriales y citosólicas de hojas, pulpa y cáscara madura de *M. dubia*. Estos resultados coinciden con las investigaciones realizados por Wolucka *et al.* (2003), quien reporta actividad catalítica de L-GulDH en las fracciones mitocondriales y citosólicas del tubérculo de *Solanum tuberosum*, pero encuentra mayor actividad catalítica en la fracción citosólica de esta planta. Asimismo, Tapullima *et al.* (2013), menciona en su trabajo realizado en plántulas de *M. dubia*, que la exposición durante 48 horas de luz artificial, incrementa la actividad enzimática en las fracciones mitocondriales y citosólicas de L-GulDH, y al igual que Wolucka *et al.* (2003) encontró mayor actividad en la fracción citosólica. En contraste estudios realizados en *Brassica oleracea* (Mapson *et al.* (1957), Østergaard *et al.* (1997), Bauw *et al.* (2002) *Solanum tuberosum* (Ôba *et al.* (1994), *Ipomoea batatas* (Ôba *et al.* (1995), Imai *et al.* (1998), *Spinacia oleracea* (Mutsuda *et al.* (1995), *Phaseolus vulgaris* L (Siendones *et al.* (1999), *Nicotiana tabacum* (Yabuta *et al.* (2000), *Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Glycine max* y *Triticum aestivum* (Bartoli *et al.* (2005) indican que L-GalDH, se encuentra ubicada en la fracción mitocondrial de las células vegetales. Probablemente estas diferencias de *M. dubia* respecto a las otras especies explique la mayor capacidad de biosíntesis y acumulación de ácido ascórbico. Además estos resultados indicarían la existencia de isoenzimas de L-GulDH en las fracciones mitocondriales y citosólicas de *M. dubia*.

Asimismo, la enzima L-GulDH, mostró actividad catalítica con los diversos aceptores de electrones. Observándose mayor actividad catalítica en 1,4-benzoquinona que en citocromo C y fenazina metosulfato. Mientras que la actividad catalítica de L-GulDH con  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ , fue insignificante. Lo que nos sugiere que  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ , no pueden ser utilizados como aceptores de electrones para L-GulDH. Las quinonas son compuestos que se encuentran en las fracciones citosólicas de diversas células, es por ello evidente la gran afinidad que haya tenido L-GulDH por 1,4-benzoquinona que por Citocromo C, lo que confirmaría la naturaleza citosólica de esta enzima en *M.*

*dubia*. Mientras estudios realizados en *Brassica oleracea* (Mapson *et al.* (1957), Østergaard *et al.* (1997), Bauw *et al.* (2002) *Solanum tuberosum* (Ôba *et al.* (1994), *Ipomoea batatas* (Ôba *et al.* (1995), Imai *et al.* (1998), *Spinacia oleracea* (Mutsuda *et al.* (1995), *Phaseolus vulgaris* L (Siendones *et al.* (1999), *Nicotiana tabacum* (Yabuta *et al.* (2000), *Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Glycine max* y *Triticum aestivum* (Bartoli *et al.* (2005) mencionan que la enzima L-GalDH, solamente utiliza como aceptor de electrones al citocromo C.

En tanto la actividad enzimática de L-GulDH, fue reducida fuertemente al ser incubadas con sulfato de cobre, cloruro de mercurio, N-etilmaleimida, EDTA y sulfato de zinc. Resultado similar fue obtenido en el cultivo celular de la bacteria *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (Hoshino *et al.* (1993). En tanto, en vegetales como el *Ipomoea batatas* (Ôba *et al.* (1995), Imai *et al.* (1998), *Brassica oleracea*, *Spinacia oleracea* (Mutsuda *et al.* (1995) y *Nicotiana tabacum* (Yabuta *et al.* (2000), indican que L-GalDH, es fuertemente inhibida por estos compuestos. Asimismo, en *Mycobacterium tuberculosis* (Wolucka *et al.* (2006), se describió que la enzima L-GulDH, requiere para su actividad, trazas de iones metálicos divalentes, esto se evidenció luego que el agente quelante EDTA inhibiera la actividad enzimática. Suceso parecido aconteció en este estudio. Aunque en *Brassica oleracea* (Østergaard *et al.* (1997), se menciona que el agente quelante EDTA no afecto la actividad catalítica de L-GalDH y que la inhibición con N-etilmaleimida a 12,5 mM, sólo afecto el 18% de actividad relativa. Por lo que asumimos que L-GulDH en *M. Dubia*, presenta algún cofactor que esté implicado en la actividad catalítica de esta enzima. Los iones divalentes  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , inhiben al residuo de cisteína del centro activo de la enzima, al formar sulfuros estables. En tanto que N-etilmaleimida, inhibe a la enzima, modificando el grupo tiol de la cisteína.

La enzima mostró un valor de pH óptimo de 7. Además, se observó que esta enzima presenta buena disposición catalítica a valores de pH 8 y 9. Resultados similares fueron reportados en el cultivo bacteriano *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (Hoshino *et al.* (1993). Asimismo, estudios efectuados en *Brassica oleracea* (Mapson

*et al.* (1957), Østergaard *et al.* (1997), *Solanum tuberosum* (Ôba *et al.* (1994), *Ipomoea batatas* (Ôba *et al.* (1995) y *Nicotiana tabacum* (Yabuta *et al.* (2000) mencionan que L-GalDH es una enzima estable en un rango de pH de 7 a 9. Aunque, un estudio realizado en la enzima recombinante AtGalDH en *Arabidopsis thaliana* (Leferink *et al.* (2008), indica que es estable a pH 8,8 e inestable a valores menores. De esta manera, para que proceda la reacción enzimática, los residuos de aminoácidos de la enzima y del sustrato deben estar en estado de ionización.

También se demostró que la enzima L-GulDH es estable a temperaturas entre 0 °C a 26,5 °C y muy inestable entre 40 °C a 90 °C. Resultados similares fue reportado en el cultivo bacteriano *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (Hoshino *et al.* (1993) y en *Mycobacterium tuberculosis* (Wolucka *et al.* (2006). En tanto, estudios realizados *Brassica oleracea* (Østergaard *et al.* (1997) y en *Nicotiana tabacum* (Yabuta *et al.* (2000), indican que L-GalDH, se desarrolla favorablemente a 27 °C. Un aumento de temperatura incrementa, no sólo la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, sino también la energía cinética y los choques de moléculas reactivas. Este incremento de energía cinética, afecta la barrera energética, debilitando las interacciones no covalente, tales como interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, puentes salinos, fuerzas de Van der waals, que estabilizan a la estructura tridimensional de la enzima, desnaturalizándola.

De esta manera se dispuso evaluar el  $K_m$  de L-GulDH mediante los plot de de Lineweaker-Burk y Michaelis-Menten, y se obtuvo un  $K_m$  de 0,00827 mM y una velocidad máxima de 0,324 mmol.mg prot<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. En tanto, el valor de  $K_m$  para L-GalDH, es muy distinto en cada especie, en *Solanum tuberosum*<sup>12</sup>, presentó un  $K_m$  de 0,08 mM, en *Ipomoea batatas*<sup>13</sup> 0,12 mM, en *Spinacia oleracea* 180 µM, en *Brassica oleracea*<sup>10</sup> 3,3 mM, en *Arabidopsis thaliana* 0,17 mM. para a los valores Diferentes a los obtenidos en otro estudios de L-GulDH, como los de Ôba *et al.* (1994), Wolucka *et al.* (2006) y Leferink *et al.* (2008) que obtuvieron un  $K_m$  de 0,12 mM, 5,5 mM, 13,1 mM respectivamente. Este resultado demuestra la alta afinidad de la enzima L-GulDH por el sustrato L-Gulono-1,4-lactona en *M. Dubia*.



### 3.- Conclusiones

Se logró aislar y caracterizar la enzima L-GulDH a partir del tejido liofilizado de *M. dubia*.

Se demostró que la enzima presenta actividad catalítica en las fracciones mitocondriales y citosólicas de diferentes tejidos de *M. dubia*, lo que indicaría la existencia de isoenzimas de L-GulDH

Se determinó que L-GulDH es estable a pH entre 7 a 8 y a temperaturas residuales de 0 °C a 26,5 °C. Asimismo es fuertemente inhibido por el cloruro de mercurio, sulfato de cobre, N-etilmaleimida, y el agente quelante EDTA a concentraciones de 1 mM.

El compuesto 1,4 benzoquinona, mostró buena predisposición, como aceptor de electrones, lo que nos pudiese indicar la naturaleza citosólica de L-GulDH en *M. dubia*.

Se obtuvo un valor de  $K_m$  de 0,00827 mM. Este dato en comparación con los antecedentes mostrados en otras especies vegetales, indica la alta afinidad de L-GulDH por el sustrato L-Gulono1,4-Lactona en *M. dubia*, lo que explicaría la excesiva cantidad de vitamina C en este frutal amazónico.

#### **4.- Recomendaciones**

Corroborar los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica en otros tejidos de *M. dubia*.

Utilizar marcadores enzimáticos, para determinar la ubicación celular de estas enzimas en *M. dubia*

Determinar la masa molecular de las enzimas aisladas mediante un gel desnaturizante y realizar cristalografía

Caracterizar estas enzimas en otras especies vegetales amazónicas

## 5.- Bibliografía

1. Basabe Tuero B. (2000). Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Rev Cubana Aliment Nutr*; 14 (1): 46-54.
2. Leferink NGH, Van den Berg WAM, Van Berkel WJH. (2008). L-Galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS journal* 275: 713-726.
3. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365–369.
4. Chatterjee IB. (1973). Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science* 182: 1271–1272
5. Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K (1994). Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for l-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for l-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem* 269, 13685–13688.
6. Smirnoff N. (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann Bot* 78: 661–669
7. Isherwood FA, Chen YT, Mapson LW. (1954). Synthesis of L-Ascorbic Acid in Plants and Animals. *Biochem.* 56.
8. Mapson LW, Breslow E. (1958). Biological synthesis of L-ascorbic acid: L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase. *Biochem. J.* 68: 395-406.

9. Mapson LW, Isherwood FA, Chen YT. (1954). Biological synthesis of L-ascorbic acid: the conversion of L-galactono- $\gamma$ -lactone into L-ascorbic acid by plant mitochondria. *Biochem. J.* 56: 21-28.
10. Østergaard J, Persiau G, Davey MW, Bauw G, Van Montagu M. (1997). Isolation of a cDNA coding for L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 272: 30009–30016.
11. Bauw GJC, Davey MW, Ostergaard J, Van Montagu MCE. (2002). Production of Ascorbic Acid in Plants. United States Patent 6,469,149 B1. Oct 22.
12. Ôba K, Fukui M, Imai Y. (1994). L-galactono- $\gamma$ -Lactona Deshidrogenasa: Partial characterization, Induction of Activity and Role in the Synthesis of Ascorbic Acid in Wounded White Potato Tuber Tissue. *Plant Cell Physiol.* 35(3): 473-478.
13. Ôba K, Ishikawa S, Nishikawa M, Mizuno H, Yamamoto T. (1995). Purification and properties of L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *Journal of Biochemistry.* 117: 120–124.
14. Imai T, Karita S, Shiratori G, Hattori M, Nunome T, Ôba K, Hirai M. (1998). L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiology* 39: 1350–1358.
15. Mutsuda M, Ishikawa T, Takeda T, Shigeoka S. (1995). Subcellular Localization and Properties of L-Galactono- $\gamma$ -Lactone Dehydrogenase in Spinach Leaves. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(10): 1983-1984.

16. Siendones E, González-Reyes JA, Santos-Ocaña P, Córdoba F. (1999) Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiol.* 120: 907–912.
17. Baig MM, Kelly S, Loewus F. (1970). L-Ascorbic Acid Biosynthesis in Higher Plants from L-Gulono-1,4-lactone and L-Galactono-1,4-Lactone. *Plant Physiol.* 46: 277-280.
18. Yabuta Y, Yoshimura K, Takeda T, Shigeoka S. (2000). Molecular Characterization of Tobacco Mitochondrial L-Galactono-gamma-Lactone Dehydrogenase and Its Expression in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 41(6): 666-675.
19. Bartoli CG, Guamet JJ, Kiddle G, Pastori GM, Di Dagno R, Theodoulou FL, Foyer CH. (2005). Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell and Environment.* 28: 1073–1081.
20. Schertl P, Sunderhaus S, Klodmann J, Grozeff GEG, Bartoli CG, Braun HP. (2012). L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) Forms Part of Three Subcomplexes of Mitochondrial Complexes I in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry.* 287 (18): 14412-14419
21. Pinedo MP, Riva RR. et al. (2001). Sistema de producción de camu camu en restinga. IIAP/pet, Iquitos-Perú, 141 p.
22. Villachica H. (1996). El cultivo del Camu-camu (*Mvrciaria dubia* H B.K. McVaugh) en la Amazonía Peruana. TCA /SPT. *Limno* N° 46, Pág. 95

23. Hoshino T, Matzinger PK, Ojima S, Sugisawa T. (1993). L-Gulono-gamma-Lactone-dehydrogenase for producing Vitamin C. United States Patent. Patent Number: 5,250,428. Oct 5.
24. Wolucka BA, Communi D. (2006). Mycobacterium tuberculosis possesses a functional enzyme for the synthesis of vitamin C, L-gulono-1,4-lactone dehydrogenase. FEBS Journal 273. 4435-4445.
25. APG III (Angiosperm Phylogeny Group). (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Grups classification for the orders and families of flowering plants. The Linnean Society of London, Botanical Journal of the Linnean Society,141: 399-439.
26. Correa S, Aldana M. (2007). Tecnología para la producción de camu camu Myrciaria dubia (H.B.K) Mc Vaugh”, 1ra edición, Lima, Perú. 7-44.
27. Mendoza H. (2006). “camu Camu”, disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos51/camu-camu/camu-camu2.shtml>.
28. James W, Penn J. (2006). “The cultivation of camu camu (Myrciaria dubia): a tree planting programme in the Peruvian amazon”, disponible en: [http://www.google.com/search?q=cache:EIUIA51m5dQJ:www.icuciwmi.org/files/News/\(08\)Penn.pdf+Myrciari+dubia&hl=es&ct=clnk&cd=12&gl=ec](http://www.google.com/search?q=cache:EIUIA51m5dQJ:www.icuciwmi.org/files/News/(08)Penn.pdf+Myrciari+dubia&hl=es&ct=clnk&cd=12&gl=ec).
29. Aranha FQ, Barros ZF, Moura LS, Gonçalves M, Barros J, Metri JC, Souza M. (2000). The Role of Vitamin C in organic changes in aged people. Rev. Nut campinas. 13(2).
30. FAO y AGROMET. (2004). “Cultivo de frutales amazonicos”, disponible en: <http://www.siamazonia.org.pe/archivos/publicaciones/amazonia/libros/44/texto00.htm>.

31. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, Parque JB, Lazarev A, Graumlich JK. (1996). Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: Evidence for recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci*; 93: 3704-9.
32. Wang Y, Mackenzie B, Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. (2000). Human Vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochem Biophys Res Commun*; 267 (2): 488-94.
33. Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Brubaker RF, Hediger MA. (1999) A Family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporter. *Nature*; 399 (6731): 70-5.
34. Jesse F, Gregory III. (2000). Vitaminas. En: Fennema OR, editor. *Química de los alimentos*. 2º. ed. Zaragoza (España): ACRIBIA.
35. Smirnoff N. (2001). L-Ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm*. 61: 241-266.
36. Davey MW, Montagu MV, Inze D, Sanmartin M, Kanelis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favel LD, Fletcher J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric*. 80 (7): 825-860.
37. Davey MW, Gilot C, Persiau G, Ostergaard J, Han Y, Bauw G, Van Montagu MC. (1999). Ascorbate biosynthesis in arabidopsis cel suspensión culture. *Plant Physiol*. 121: 535-543.
38. Loewus FA. (1999). Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry* 52: 193-210.

39. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
40. Wolucka BA, Van Montagu M. (2003). GDP- Mannose 3',5'-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a putative Intermediate for the novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 278, N° 48, pp 47483-47490.
41. Tapullima A, Cerdeira LA, Acuña C, Imán SA, Castro JC (2013). Efecto de la luz sobre la actividad catalítica de L-Gulono/L-Galactono-1,4-Lactona deshidrogenasa y biosíntesis de vitamina C en plántulas de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "camu-camu". Encuentro Científico Internacional-ECI-2013.



# **ANEXOS**

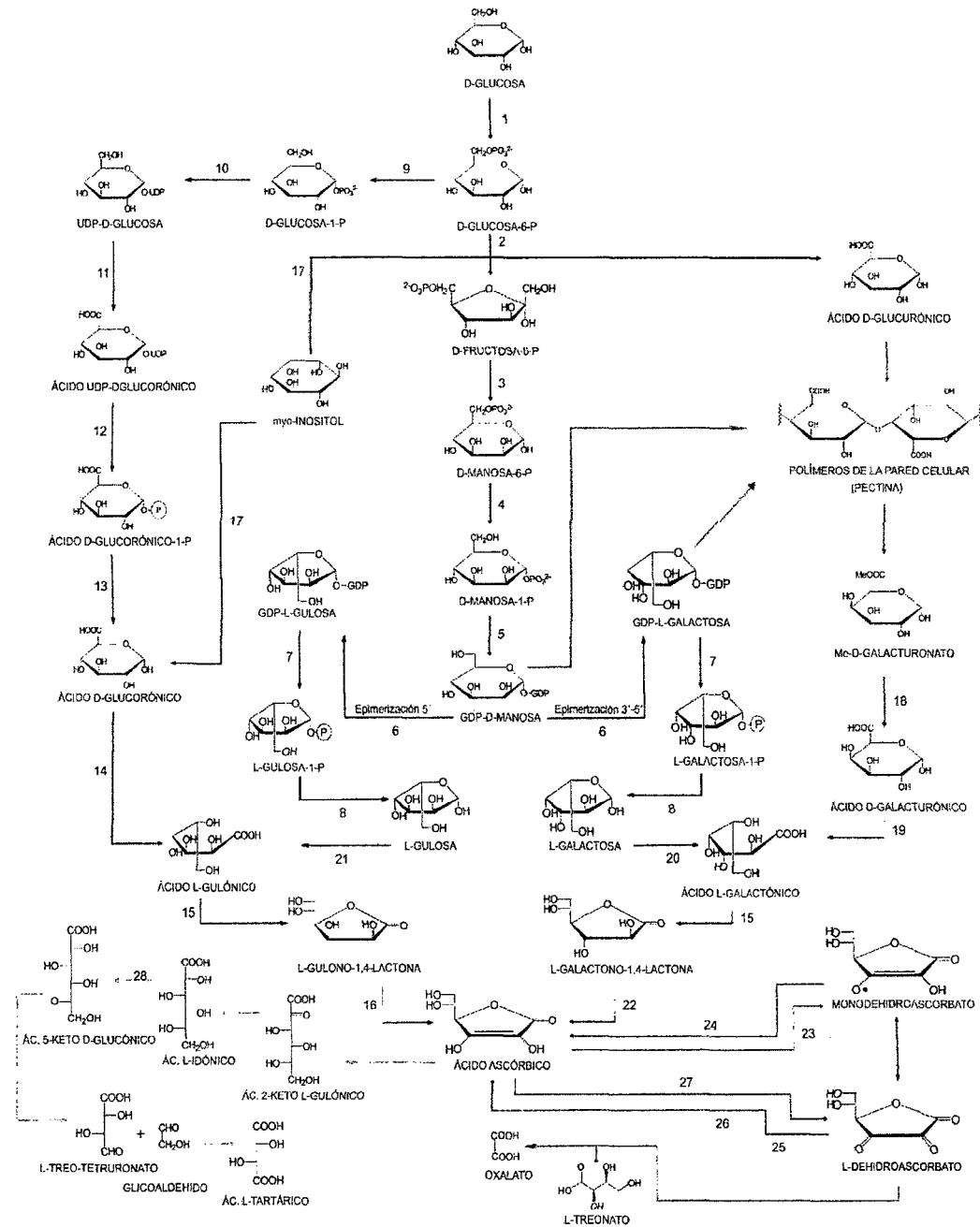


FIGURA 01. Ruta Biosintética del Ácido Ascórbico. Las enzimas que catalizan cada reacción están representadas en números y son: 1, Hexoquinasa; 2, Glucosa-6-Fosfato Isomerasa; 3, Manosa-6-Fosfato Isomerasa; 4, Fosfomanomutasa; 5, GDP-manosa Pirofosforilasa; 6, GDP-manosa-3'-5'-Epimerasa; 7, Fosfodiesterasa; 8, Azúcar Fosfatasa; 9, Fosfoglucomutasa; 10, UDP-Glucosa Pirofosforilasa; 11, UDP-Glucosa Deshidrogenasa; 12, Glucoronato-1-Fosfato Uridiltransferasa; 13, Glucoronolactonasa; 14, Glucoronato Reductasa; 15, Aldono-Lactonasa; 16, L-Gulonolactona Deshidrogenasa; 17, *myo*-Inositol Oxigenasa; 18, Metilesterasa; 19, D-Galacturonato Reductasa; 20, L-Galactosa Deshidrogenasa; 21, L-Gulosa Deshidrogenasa; 22, L-Galactono-1,4-Lactona Deshidrogenasa; 23, Ascorbato Peroxidasa; 24, Monodehidroascorbato Reductasa; 25, Dehidroascorbato Reductasa; 26, Glutatión Reductasa; 27, Ascorbato Oxidasa; 28, L-Idonato deshidrogenasa.

Figura 1. Ruta biosintética de ácido ascórbico en plantas superiores. Adaptación propia

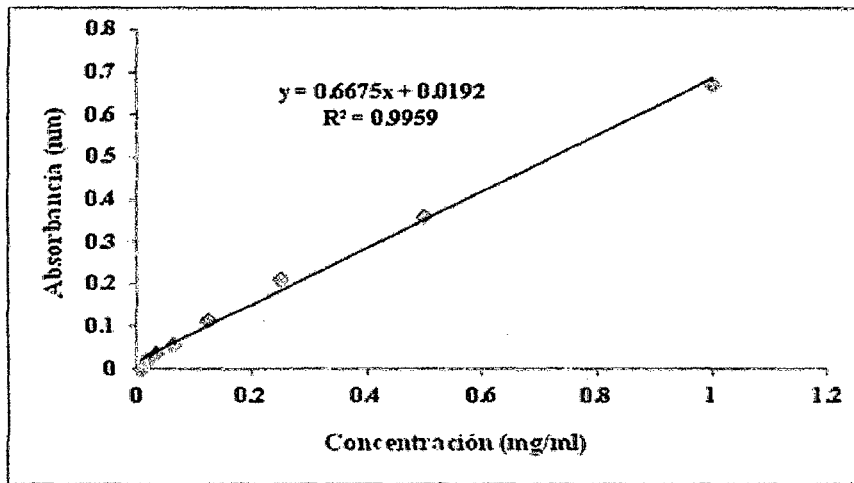


Fig. 2. Curva de calibración para proteínas.

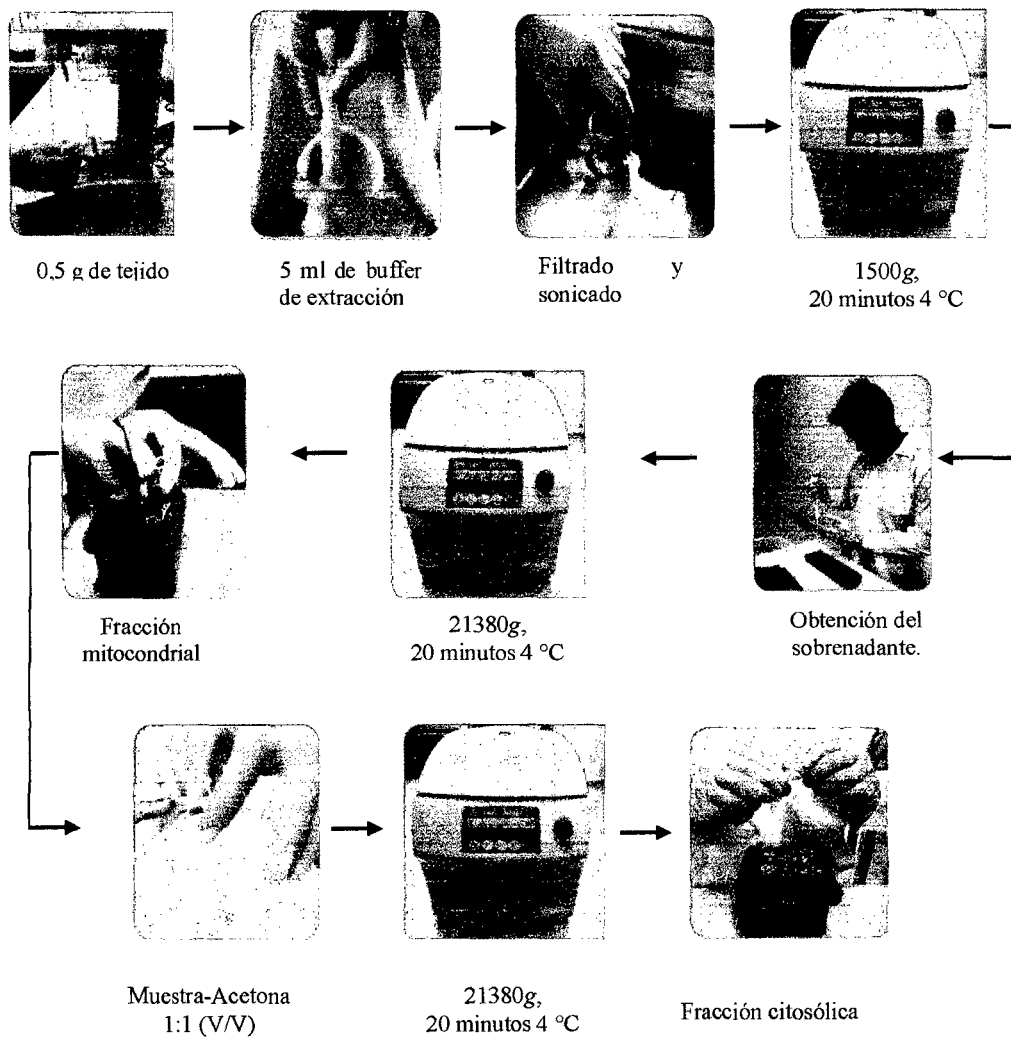
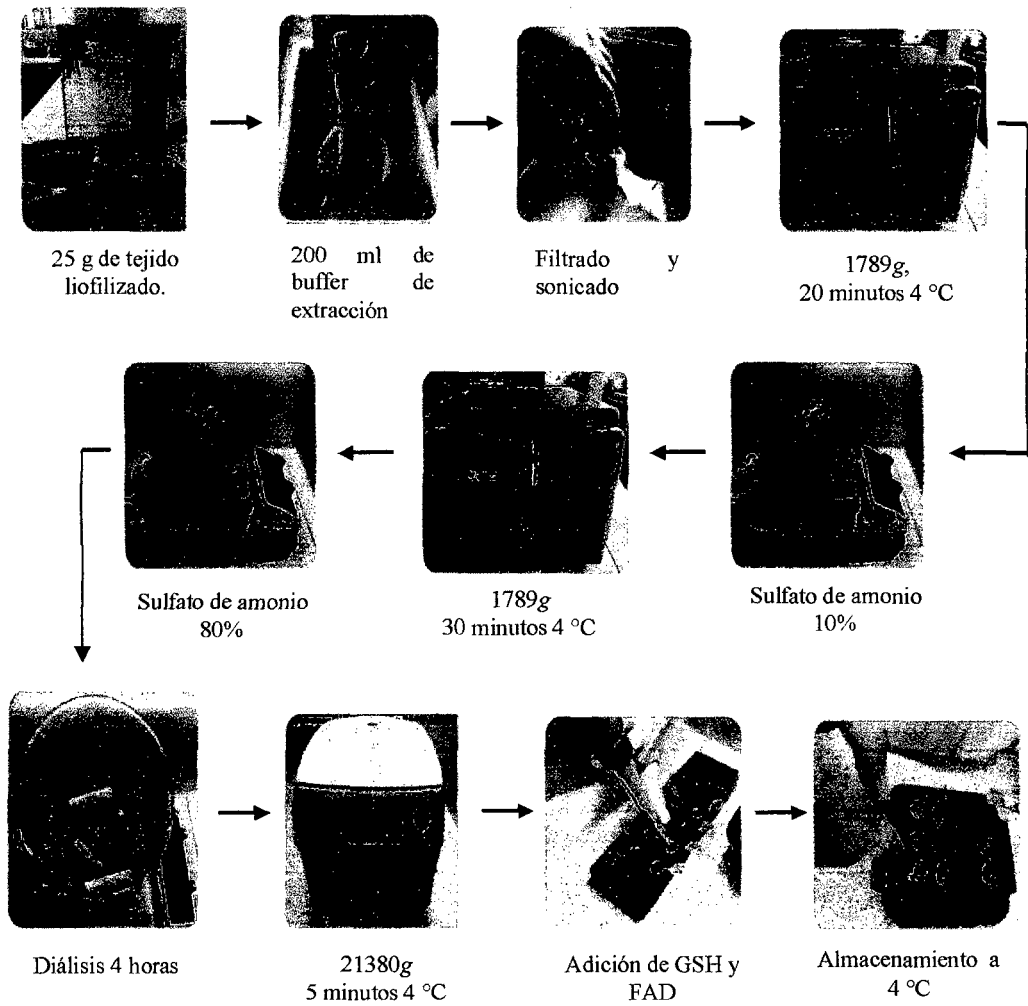


Fig. 3. Flujograma de extracción de fracciones celulares.



**Fig. 4.** Flujo de extracción, utilizado en el aislamiento parcial de L-GulDH

**Tabla 2.** Condiciones cinéticas utilizadas en la inhibición enzimática de L- GulDH (Hoshino *et al.* 1993)

Item (en orden)	Volumen ( $\mu$ l)							Concentración	Stock
<b>H2O</b>	718	668	568	568	568	568	620		
<b>Buffer fosfato de potasio</b>	100	100	100	100	100	100	100	pH 7.5/0.01 M	0.1 M
<b>Triton X-100</b>	10	10	10	10	10	10	10	0.03%	3%
<b>KCN (cianuro de potasio)</b>	10	10	10	10	10	10	10	0.1 mM	10 mM
<b>Muestra 30K</b>	2	2	2	2	2	2			10 mM
<b>ZnSO4</b>			100					1 mM	10 mM
<b>CuSO4</b>				100				1 mM	10 mM
<b>HgCl2</b>					100			1 mM	10 mM
<b>Riboflavina</b>						100	100	1 mM	10 mM
<b>DCIP</b>	160	160	160	160	160	160	160	0.16 mM	1 mM
<b>L-gulono-<math>\gamma</math>-lactono</b>	0	50	50	50	50	50		5 mM	100 mM
<b>Longitud de onda</b>	600	600	600	600	600	600	600		

**Tabla 3.** Condiciones enzimáticas utilizadas para aceptores de electrones en L-GulDH. (Laferink et al. 2009)

Item (en orden)	Volumen (µl)					Concentración	Stock
H2O	568	728	728	728	728		
Buffer fosfato de potasio	100	100	100	100	100	pH 7.5/0.01 M	0.1 M
Triton X-100	10	10	10	10	10	0.03%	3%
KCN (cianuro de potasio)	10	10	10	10	10	0.1 mM	10 mM
Muestra 30K	2	2	2	2	2		
DCIP	160					0.16 mM	1 mM
Fenazina metasulfato	100					0.1 mM	1 mM
Citocromo C		100				0.1 mM	1 mM
1,4-Benzoquinona			100			0.1 mM	1 mM
NAD				100		0.1 mM	1 mM
NADP					100	0.1 mM	1 mM
L-gulono-γ-lactona	50	50	50	50	50	5 mM	100 mM
Longitud de onda (nm)	600	550	290	340	340		

**Tabla 4.** Condiciones enzimáticas utilizadas para el efecto de la temperatura sobre L-GulDH. (Hoshino *et al.* 2009)

Item (en orden)	Volumen ( $\mu$ l)								Concentración	Stock
<b>H2O</b>	418	418	418	418	418	418	418	418		
<b>Buffer fosfato de potasio</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	pH 7.5/0.01 M*	0.1 M
<b>Triton X-100</b>	10	10	10	10	10	10	10	10	0.03%	3%
<b>KCN (cianuro de potasio)</b>	10	10	10	10	10	10	10	10	0.1 mM	10 mM
<b>Muestra 30K</b>	2	2	2	2	2	2	2	2		
<b>DCIP</b>	160	160	160	160	160	160	160	160	0.16 mM	1 mM
<b>L-gulono-<math>\gamma</math>-lactono</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	5 mM	100 mM
<b>Longitud de onda (nm)</b>	600	600	600	600	600	600	600	600		

\* Las muestras enzimáticas fueron homogenizadas con el tampón fosfato de potasio a temperaturas entre 0 °C a 90 °C

**Tabla 5.** Condiciones enzimáticas utilizadas en el efecto del pH sobre L-GulDH. (Hoshino *et al.* 2009)

Item (en orden)	Volumen ( $\mu$ l)							Concentración	Stock
<b>H2O</b>	418	418	418	418	418	418	418		
<b>Buffer Citrato</b>	250							pH 4.00/25 mM	0.1 M
<b>Buffer acetato</b>		250						pH 5.01/25 mM	0.1 M
<b>Buffer MES</b>			250					pH 6.00/25 mM	0.1 M
<b>Buffer PBS</b>				250				pH 7.03/25 mM	0.1 M
<b>Buffer HEPES</b>					250			pH 8.00/25 mM	0.1 M
<b>Buffer Tris</b>						250		pH 9.02/25 mM	0.1 M
<b>Buffer CHES</b>							250	pH 10.0/25 mM	0.1 M
<b>Triton X-100</b>	10	10	10	10	10	10	10	0.03%	3%
<b>KCN (cianuro de potasio)</b>	10	10	10	10	10	10	10	0.1 mM	10 mM
<b>Muestra 30K</b>	2	2	2	2	2	2	2		
<b>DCIP</b>	160	160	160	160	160	160	160	0.16 mM	1 mM
<b>Fenazina</b>	100	100	100	100	100	100	100	0.1 mM	1 mM
<b>L-gulono-<math>\gamma</math>-lactono</b>	50	50	50	50	50	50	50	5 mM	100 mM
<b>Longitud de onda (nm)</b>	600	600	600	600	600	600	600		



**Tabla 6.** Condiciones enzimáticas utilizadas en la determinación del  $K_m$  de L-GulDH.

Item (en orden)	Volumen ( $\mu$ l)						Concentración	Stock
<b>H2O</b>	418	418	418	418	418	418		
<b>Buffer fosfato de potasio</b>	100	100	100	100	100	100	pH 7.5/0.01 M	0.1 M
<b>Triton X-100</b>	10	10	10	10	10	10	0.03%	3%
<b>KCN (cianuro de potasio)</b>	10	10	10	10	10	10	0.1 mM	10 mM
<b>Muestra 30K</b>	2	2	2	2	2	2		
<b>DCIP</b>	160	160	160	160	160	160	0.16 mM	1 mM
<b>L-gulono-<math>\gamma</math>-lactono</b>	100	100	100	100	100	100	10 mM a 0,3125 mM	200 mM
<b>Longitud de onda (nm)</b>	600	600	600	600	600	600		

**Tabla 7.** Análisis estadístico (T-student) utilizado sobre la actividad catalítica de L-GulDH/L-GalDH

**Estadísticos de grupo**

	GALDH	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
GULDH	1,00	10	18,9009	4,50781	1,42550
	2,00	10	5,8441	3,97061	1,25562

**Prueba de muestras independientes**

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% de intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior	
GULDH	Se han asumido varianzas iguales	0,023	0,881	6,873	18	0,001	13,05680	1,89964	9,06581	17,044779
	No se han asumido varianzas iguales			6,873	17,718	0,001	13,05680	1,89964	9,06125	17,05235

**Tabla 8.** Análisis estadístico (T-student) utilizado sobre la actividad catalítica de L-GulDH en la fracción mitocondrial y citosólica de hojas de *M. dubia*

Estadísticos de grupo					
	H-CITO	N	Media	Desviación t.p.	Error t.p. de la media
H-MITO	1,00	12	17,1239	1,15722	0,33406
	4,00	12	25,8685	1,97575	0,57035

Prueba de muestras independientes											
			Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error t.p. de la diferencia	95% de intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior	
HMITO	Se han asumido varianzas iguales		2,396	0,136	-13,230	22	0,001	-8,74455	0,66098	-10,11534	-7,37376
	No se han asumido varianzas iguales				-13,230	17,753	0,001	-8,74455	0,66098	-10,13460	-7,35449

**Tabla 9.** Análisis estadístico (T-student) utilizado sobre la actividad catalítica de L-GulDH en la fracción mitocondrial y citosólica de pulpa madura de *M. dubia*

<b>Estadísticos de grupo</b>					
	PM-CITO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la
					media
PM-MITO	2	12	3,6376	1,098	0,317
	5	12	8,2424	0,863	0,249

<b>Prueba de muestras independientes</b>										
		<b>Prueba de Levene para la igualdad de varianzas</b>		<b>Prueba T para la igualdad de medias</b>						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% de intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
PM-MITO	Se han asumido varianzas iguales	3,11	0,092	-11,425	22	0,001	-4,605	0,40305	-5,440	-3,769
	No se han asumido varianzas iguales			-11,425	20,841	0,001	-4,605	0,40305	-5,443	-3,766

**Tabla 10.** Análisis estadístico (T-student) utilizado sobre la actividad catalítica de L-GulDH en la fracción mitocondrial y citosólica de cáscara madura de *M. dubia*

Estadísticos de grupo										
	CM-CITO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media					
CM-MITO	3	12	4,2599	0,475	0,137					
	6	12	3,7526	0,483	0,139					

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% de intervalo de confianza para la diferencia	
						Inferior	Superior			
CM-MITO	Se han asumido varianzas iguales	0,002	0,963	2,595	22	0,017	0,50725	0,19543	0,10194	0,91254
	No se han asumido varianzas iguales			2,595	21,994	0,017	0,50725	0,19543	0,10193	0,91255

**Tabla 11.** Estadística descriptiva del análisis de varianza (ANVA) utilizado en la actividad catalítica de L-GULDH ante aceptores de electrones.

<b>FUENTES DE VARIACIÓN</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>
Tratamientos	2	3355,945	1677,973
Error	27	734,429	27,201
F=	61,689		
P=	0,000		
Media (columna 1)=	36,883		
Media (Columna 2)=	16,097		
Media (Columna 2)=	13,097		
<b>Tukey:</b>	<b>Dif. Medias</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>
Medias (1 y 2)=	20,785	12,602	<0,01
Medias (1 y 3)=	23,786	14,422	<0,01
Medias (2 y 3)=	3,001	1,820	<0,05

**Tabla 12.** Estadística descriptiva del análisis de varianza (ANVA) utilizado en la actividad catalítica de L-GULDH ante inhibidores.

<b>FUENTES DE VARIACIÓN</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>
Tratamientos	4	3974,516	993,629
Error	45	1803,370	40,075
F=	24,794		
P=	0,000		
Media (columna 1)=	1,7959		
Media (Columna 2)=	3,2074		
Media (Columna 3)=	6,4228		
Media (Columna 4)=	11,7309		
Media (Columna 5)=	26,3785		
<b>Tukey:</b>	<b>Dif. Medias</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>
Medias (1 y 2)=	1,4115	0,7051	>0,05
Medias (1 y 3)=	4,6269	2,3113	>0,05
Medias (1 y 4)=	9,9350	4,9629	<0,01
Medias (1 y 5)=	24,5826	12,2798	<0,01
Medias (2 y 3)=	3,2154	1,6062	>0,05
Medias (2 y 4)=	8,5235	4,2578	<0,05
Medias (2 y 5)=	23,1711	11,5747	<0,01
Medias (3 y 4)=	5,3081	2,6516	>0,05
Medias (3 y 5)=	19,9557	9,9685	<0,01
Medias (4 y 5)=	14,6476	7,3170	<0,01

**Tabla 13.** Estadística descriptiva del análisis de varianza (ANVA) utilizado en la actividad catalítica de L-GULDH ante diversos pH.

<b>FUENTES DE VARIACIÓN</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>
Tratamientos	6	1264,447	210,741
Error	63	53,396	0,848
F=	248,6457		
P=	0,0000		
Media (columna 1)=	1,9235		
Media (Columna 2)=	4,1904		
Media (Columna 3)=	7,1321		
Media (Columna 4)=	14,6334		
Media (Columna 5)=	11,9904		
Media (Columna 6)=	10,4672		
Media (Columna 7)=	5,1218		
<b>Tukey:</b>	<b>Dif. Medias</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>
Medias (1 y 2)=	2,2669	7,7864	<0,01
Medias (1 y 3)=	5,2086	17,8906	<0,01
Medias (1 y 4)=	12,7099	43,6563	<0,01
Medias (1 y 5)=	10,0669	34,5780	<0,01
Medias (1 y 6)=	8,5437	29,3461	<0,01
Medias (1 y 7)=	3,1983	10,9856	<0,01
Medias (2 y 3)=	2,9417	10,1042	<0,01
Medias (2 y 4)=	10,4430	35,8699	<0,01
Medias (2 y 5)=	7,8000	26,7916	<0,01
Medias (2 y 6)=	6,2768	21,5597	<0,01
Medias (2 y 7)=	0,9314	3,1992	>0,05
Medias (3 y 4)=	7,5013	25,7656	<0,01
Medias (3 y 5)=	4,8583	16,6874	<0,01
Medias (3 y 6)=	3,3351	11,4555	<0,01
Medias (3 y 7)=	2,0103	6,9050	<0,01
Medias (4 y 5)=	2,6430	9,0782	<0,01
Medias (4 y 6)=	4,1662	14,3102	<0,01
Medias (4 y 7)=	9,5116	32,6707	<0,01
Medias (5 y 6)=	1,5232	5,2319	<0,01
Medias (5 y 7)=	6,8686	23,5924	<0,01
Medias (6 y 7)=	5,3454	18,3605	<0,01

**Tabla 14.** Estadística descriptiva del análisis de varianza (ANVA) utilizado en la actividad catalítica de L-GULDH ante diversas temperaturas.

<b>FUENTES DE VARIACIÓN</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>
Tratamientos	7	883,42	126,20 e+03
Error	72	30490,784	423,483
F=	298,009		
P=	0,0000		
Media (columna 1)=	348,6656		
Media (Columna 2)=	306,6060		
Media (Columna 3)=	260,4654		
Media (Columna 4)=	224,9325		
Media (Columna 5)=	193,5146		
Media (Columna 6)=	147,1723		
Media (Columna 7)=	68,0015		
Media (Columna 8)=	25,5880		
<b>Tukey:</b>	<b>Dif. Medias</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>
Medias (1 y 2)=	42,0596	6,4632	△,01
Medias (1 y 3)=	88,2002	13,5535	△,01
Medias (1 y 4)=	123,7331	19,0138	△,01
Medias (1 y 5)=	155,1510	23,8417	△,01
Medias (1 y 6)=	201,4933	30,9630	△,01
Medias (1 y 7)=	280,6641	43,1289	△,01
Medias (1 y 8)=	323,0776	49,6465	△,01
Medias (2 y 3)=	46,1406	7,0903	△,01
Medias (2 y 4)=	81,6735	12,5506	△,01
Medias (2 y 5)=	113,0914	17,3785	△,01
Medias (2 y 6)=	159,4337	24,4998	△,01
Medias (2 y 7)=	238,6045	36,6658	△,01
Medias (2 y 8)=	281,0180	43,1833	△,01
Medias (3 y 4)=	35,5329	5,4603	△,01
Medias (3 y 5)=	66,9508	10,2882	△,01
Medias (3 y 6)=	113,2931	17,4095	△,01
Medias (3 y 7)=	192,4639	29,5754	△,01
Medias (3 y 8)=	234,8774	36,0930	△,01
Medias (4 y 5)=	31,4179	4,8279	△,05
Medias (4 y 6)=	77,7602	11,9492	△,01
Medias (4 y 7)=	156,9310	24,1152	△,01
Medias (4 y 8)=	199,3445	30,6328	△,01
Medias (5 y 6)=	46,3423	7,1213	△,01
Medias (5 y 7)=	125,5131	19,2873	△,01
Medias (5 y 8)=	167,9266	25,8049	△,01
Medias (6 y 7)=	79,1708	12,1660	△,01
Medias (6 y 8)=	121,5843	18,6836	△,01
Medias (7 y 8)=	42,4135	6,5176	△,01