



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**“LA ENZIMA HIDROPERÓXIDO LIASA DEL ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*):
EXTRACCIÓN Y PRIMERA ETAPA DE PURIFICACIÓN UTILIZANDO
CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

ROCÍO ESPINOZA RIVERA

DIRECTORA:

DRA. MIRNA PATRICIA SANTIAGO GÓMEZ

HEROICA CIUDAD DE HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, ABRIL 2015.

DEDICATORIAS

Mi tesis la dedico con todo mi amor.

A mi madre por su amor, comprensión, ayuda, paciencia y por creer en mí. Por darme consejos e inculcarme los valores morales con los cuales dirijo mi vida. Por darme esta gran herencia, el de estudiar una carrera profesional que me ayudó a crecer en todos los sentidos.

A mis hermanos: Jorge, César, Carlos y Neftalí que de alguna manera estuvieron presentes en esta etapa de mi vida que fue dura pero satisfactoria, gracias por los buenos y malos momentos que vivimos juntos y espero que nos volvamos a reunir todos juntos.

A José Luis por ayudarme a creer en mí y sembrar en mi interior la idea de estudiar una carrera profesional, por todo tu apoyo, ayuda, comprensión y las pláticas que me ayudaban a reflexionar, de todo corazón gracias por estar aquí.

A mi tía Rosalía por ser una buena persona y a quien le deseo todo lo mejor.

Por último a mis amigos y compañeros que estuvieron a lo largo de la carrera; Antonio, Malinali, Ulises Pedro, Yair Josué, Karina, Maleny, Juan Manuel, Mónica, Francisco, Joaquín Tenoch, Alberto, Evelyn, Maleny, Abimael y Francisca, que ya sea que convivimos mucho o poco tiempo siempre me acordaré de ustedes por las buenas y malas vivencias; y así con todo esto hacer única mi estancia en la Universidad.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez por los conocimientos y orientación transmitida durante el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales la Dra. Beatriz Hernández Carlos, la M.C. Leslie S. Arcila Lozano y la Dra. Luicita Lagunez Rivera, CIIDIR-IPN quienes colaboraron en la revisión de este trabajo.

A todos los profesores que me impartieron clases en la universidad, por el conocimiento transmitido.

A los técnicos de los diferentes laboratorios, que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme con el material y equipo para la realización del proyecto.

RESUMEN

La enzima hidroperóxido liasa (HPL) rompe los hidroperóxidos de ácidos grasos insaturados provenientes de los ácidos linoleico y linolénico para la formación de aldehídos y oxo-ácidos. Los aldehídos están presentes en el aroma de muchas frutas, verduras y plantas que producen el llamado “olor verde”. Algunos de los aldehídos más importantes son el hexanal que provee una descripción de olores afrutados, verde intenso; y el (*E*)-2-hexenal imparte olores cítricos, a naranja, olores verdes y olor a acre. Estos aldehídos se utilizan industrialmente para reconstituir el "olor fresco" de frutas y verduras que se pierde durante el procesamiento industrial. El presente trabajo se desarrolló con la finalidad de extraer y purificar en una primera etapa la enzima HPL del orégano utilizando cromatografía de intercambio iónico, además de implementar una metodología de separación de clorofilas en el extracto crudo que contenía la enzima. Para la separación de clorofilas se empleó una mezcla de hexano:acetona (3:2). Posteriormente se purificó la enzima en cromatografía de intercambio iónico utilizando la resina TOYOPEARL DEAE-650M. La fracción eluida que contenía la enzima HPL mostró un valor de actividad total de 12.42 U y una concentración de proteína de 4.75 µg. Las pruebas de electroforesis SDS-PAGE mostraron un peso molecular de 56.6 KDa para las sub-unidades de la HPL. Por último se calculó la concentración óptima de sustrato para la enzima HPL del orégano, la cual fue de 19 mM.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Definición de la enzima hidroperóxido liasa (HPL)	4
2.2 Localización de HPL	5
2.3 Fuentes de obtención de enzima hidroperóxido liasa	5
2.3.1 Fuentes vegetales.....	6
2.4 Sustratos de HPL	7
2.4.1 Sustrato más común con excepciones.	7
2.5 Productos de la enzima HPL.....	7
2.6 Estructura de la enzima hidroperóxido liasa (HPL).....	8
2.7 Actividad enzimática de la HPL	11
2.8 Condiciones óptimas de pH y temperatura	12
2.9 Mecanismo de acción propuesto para la enzima hidroperóxido liasa (HPL)	12
2.10 Purificación de la enzima HPL.	13
2.11 Métodos de ruptura celular	15
2.12 Fundamentos y mecanismo de acción de la cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica y en hidroxiapatita	16
2.12.1 Cromatografía de Intercambio Iónico	16
2.12.1.1 Tipos de Intercambiadores Iónicos	17
2.12.2 La cromatografía de interacción hidrofóbica	19
2.12.3 La cromatografía en hidroxiapatita	19
2.13 Electroforesis	20
2.13.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	21
2.13.1.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	22
2.13.1.2 Formación del gel de poliacrilamida.....	22
2.14 Orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	24

2.14.1 Historia.....	24
2.14.2 Descripción.....	24
2.14.3 Parte útil	24
2.14.4 Quimiotaxonomía del género <i>Origanum</i>	25
2.14.5 Usos del Orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	25
2.14.6 Estudios de Orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	26
III. JUSTIFICACIÓN.....	28
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. OBJETIVO GENERAL.....	29
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
VII. METAS	30
VIII. PROCESO METODOLÓGICO	31
8.1 Reactivos y Materiales.....	31
8.2 Preparación de sustratos para la enzima HPL.....	31
8.3 Extracción de la enzima HPL	32
8.4 Determinación de concentración de proteína por el método de Bradford	33
8.5 Actividad enzimática	33
8.6 Precipitación con sulfato de amonio	34
8.7 Purificación.....	35
8.7.1 Preparación de la resina.....	35
8.8 Primera etapa de purificación	36
8.9 Electroforesis	37
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
9.1 Producción del sustrato para la enzima.....	39
9.2 Extracción de la enzima HPL	40
9.3 Precipitación con sulfato de amonio.....	48
9.4 Purificación.....	52
9.5 Electroforesis	58
9.6 Actividad de la enzima HPL con diferentes concentraciones de sustrato 13-HPOT..	61
X. CONCLUSIONES.....	63
XI. PERSPECTIVAS	64

XII. BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXO 1	72
ANEXO 2	74
ANEXO 3	75
ANEXO 4	76
ANEXO 5	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ruta lipoxigenasa (Long, Kong, Zhang, Jiang, & Hua, 2010).....	2
Figura 2. Formación de aldehídos y oxo-ácidos, a partir de 13-HPOT.....	4
Figura 3. Formación de aldehídos y oxo-ácidos, a partir de 9-HPOT.....	4
Figura 4. Imagen de cloroplasto.	5
Figura 5. A. Estructura del ácido linoleico y B. Estructura del ácido α -linolénico.....	7
Figura 6. Nucleótido y secuencia de aminoácidos de la HPL del pimiento verde.	10
Figura 7. Estructura cristalina del dominio hemo de la P450BM-3, una mono-oxigenasa que metaboliza los ácidos grasos.	10
Figura 8. Mecanismo de acción HPL.	13
Figura 9. Fase estacionaria y fase móvil.	17
Figura 10. Tamaño del poro de la resina.	19
Figura 11. Equipo de electroforesis.....	21
Figura 12. A. Formación de gel de poliacrilamida y B. Gel de poliacrilamida.....	23
Figura 13. Preparación de la resina.	36
Figura 14. Sistema de cromatografía y colector de fracciones.....	37
Figura 15. Desnaturalización de las muestras.	38
Figura 16. Equipo de electroforesis.....	38
Figura 17. Barrido en el espectrofotómetro de 200-400 nm.....	39
Figura 18. Orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	40
Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE de diferentes extractos de plantas.	41
Figura 20. Diagrama para la obtención del extracto crudo.....	41
Figura 21. Extracción de clorofilas.	42
Figura 22. Extracto crudo centrifugado durante 150 minutos.....	43
Figura 23. Curva de calibración de proteína.....	45
Figura 24. Fases del saturado.	48
Figura 25. Extracto saturado y centrifugado.	48
Figura 26. Columna empacada.	52
Figura 27. Cromatograma de purificación.....	53

Figura 28. Curva generada al graficar el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas del estándar contra las distancias recorridas.....	59
Figura 29. A. Gel de electroforesis SDS-PAGE (hojas de orégano). B. Gel de electroforesis SDS-PAGE (hojas de amaranto, Long <i>et al.</i> , 2010).....	59
Figura 30. Gráfica para calcular la concentración óptima de sustrato para la enzima HPL del orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Reinos biológicos, fuentes de extracción de la enzima HPL.....	5
Tabla 2. Fuentes de extracción de la enzima HPL.	6
Tabla 3. Productos de HPL.....	8
Tabla 4. Actividad total y específica de la enzima HPL.	11
Tabla 5. Temperatura y pH óptimos de la enzima HPL.	12
Tabla 6. Etapas de purificación de la enzima HPL.....	14
Tabla 7. Tipos de resinas de intercambio iónico.	18
Tabla 8. Curva estándar para la concentración de proteína a 595 nm.	33
Tabla 9. Características de la columna MT20 (BIORAD).	35
Tabla 10. Proteínas contenidas en el estándar de pesos moleculares.	37
Tabla 11. Concentración de proteína y actividad total en el extracto crudo con y sin tritón X-100R, utilizando 10 mM de sustrato.	46
Tabla 12. Concentración de proteína y actividad total en el extracto crudo con y sin tritón X-100R, utilizando 24 mM de sustrato.	46
Tabla 13. Resumen de actividad específica de diferentes extractos crudos.	47
Tabla 14. Actividad y concentración de proteína del precipitado con y sin tritón X-100R, utilizando 10 mM de sustrato.	50
Tabla 15. Actividad y concentración de proteína del precipitado con y sin tritón X-100R, utilizando 24 mM de sustrato.	50
Tabla 16. Programa empleado en el equipo BIOLOGIC LP CHROMATOGRAPHY SYSTEM	52
Tabla 17. pI de la HPL extraída de diferentes fuentes.....	55
Tabla 18. Resumen de los datos observados en el cromatograma. Purificación de la muestra con tritón X-100R.....	56
Tabla 19. Resumen de los datos observados en el cromatograma. Purificación de la muestra sin tritón X-100R.....	57
Tabla 20. Actividad y concentración de proteína de las fracciones eluidas con y sin tritón X-100R, utilizando 10 mM de sustrato.	57
Tabla 21. Concentración de proteína de las muestras eluidas.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

HPL	Hidroperóxido liasa
13- HPOD	Ácido 13(<i>S</i>)-hidroperóxiocadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-dienoico
13-HPOT	Ácido 13(<i>S</i>)-hidroperóxiocadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>),15(<i>Z</i>)-trienoico
U	Unidades [=] $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mL}}$
mM	Milimolar
mS	MiliSiemens
A.U.	Absorbancia
pI	Punto Isoeléctrico

I. INTRODUCCIÓN

El aroma está constituido por diferentes compuestos orgánicos volátiles, estos compuestos son moléculas de bajo peso molecular ($M < 400$ daltons) y cuya presión de vapor a presión atmosférica y a temperatura ambiente, es lo suficientemente alta para que se evaporen en el ambiente y puedan ponerse en contacto con la mucosa olfativa.

Todos los compuestos volátiles pertenecen a diferentes clases de compuestos químicos orgánicos, como son: los hidrocarburos, los terpenos, que son compuestos que tienen uno o más grupos funcionales (alcohol, éter, óxido, aldehído, cetona, éster, amina, amida) y diversos heterociclos. Éstos compuestos son los responsables de que los alimentos sean apetecibles (Richard, & Multon, 1995). Algunos compuestos aromáticos pueden ser sensibles al calor y a la luz, lo que provoca su degradación.

Las sustancias volátiles de importancia en este trabajo son los aldehídos. Los aldehídos están presentes en el aroma de muchas frutas, verduras y plantas, que producen el llamado "olor verde" (Hatanaka, 1993). Uno de los más importantes es el hexanal que provee una descripción de olores afrutados, verde intenso; y el (*E*)-2-hexenal imparte olores cítricos, a naranja, olores verdes y olor a acre (Gigot, Ongena, Fauconnier, Wathelet, Du Jardin, & Thonart, 2010). Estos aldehídos se utilizan industrialmente para reconstituir el "olor fresco verde" de frutas y verduras que se pierde durante el procesamiento.

Las enzimas hidropéroxido liasa (HPL) rompen los hidropéroxidos de ácidos grasos insaturados, provenientes de los ácidos linoleico y linolénico, para la formación de aldehídos y oxo-ácidos. La enzima hidropéroxido liasa pertenece a la familia CYP74 del citocromo P450 (Hughes, De Domenico, & Santino, 2009), que incluye tres tipos de enzimas: óxido aleno sintasa (AOS, deshidrasa), hidropéroxido liasa (HPL, isomerasa) y divinil éter sintasa (DES, deshidrasa).

En un inicio la enzima lipoxigenasa (LOX), cataliza la oxidación de ácidos grasos insaturados formando hidropéroxidos, éstos compuestos serán los sustratos de la enzima

HPL y los cuales sufrirán una oxidación y posteriormente una ruptura química. La HPL puede producir ya sea aldehídos de 6 carbonos y oxo-ácidos de 9 carbonos, a partir de los 13-hidroperóxidos (13-HPOD y 13-HPOT); y aldehídos de 9 carbonos y oxo-ácidos de 9 carbonos, a partir de 9-hidroperóxidos (9-HPOD y 9-HPOT). La producción de aldehídos volátiles que surgen de ácidos grasos poliinsaturados de los tejidos vegetales fue reportada por primera vez hace más de 40 años (Drawert, Heimann, Emberger, & Tressl, 1966). En la figura 1 se muestra como en la ruta de la lipoxigenasa a partir del ácido linoleico se forman; el ácido 13 (*S*)-hidroperóxiooctadeca-9(*Z*),11(*E*)-dienoico (13- HPOD) y el ácido 9 (*S*)-hidroperóxiooctadeca-10(*E*),12(*Z*)-dienoico (9-HPOD); a partir del ácido linoléico se obtiene; el ácido 13(*S*)-hidroperóxiooctadeca-9(*Z*),11(*E*),15(*Z*)-trienoico (13-HPOT) y el ácido 9(*S*)-hidroperóxiooctadeca-10(*E*),12(*Z*),15(*Z*)-trienoico (9-HPOT), que son los sustratos de la enzima HPL.

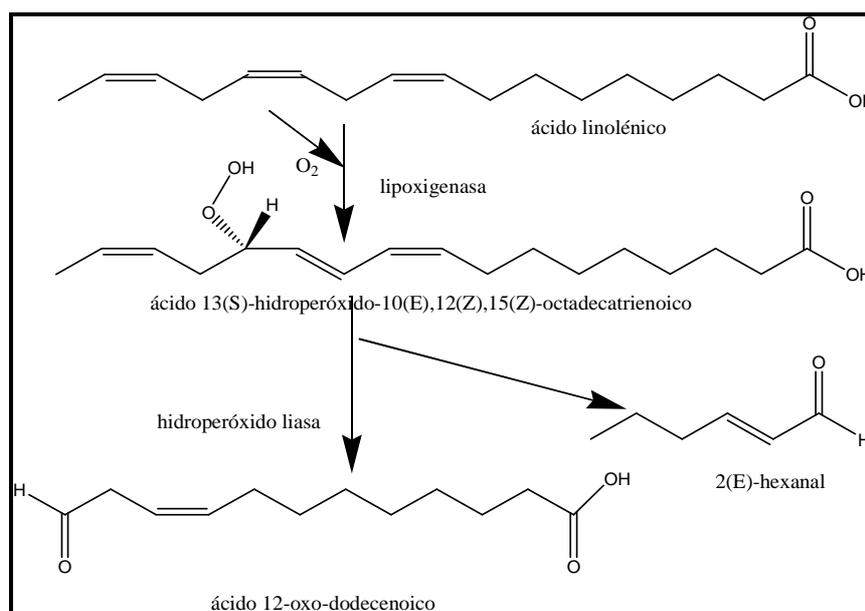


Figura 1. Ruta lipoxigenasa (Long, Kong, Zhang, Jiang, & Hua, 2010)

Los productos volátiles formados son compuestos de 9 y de 6 carbonos, entre ellos se encuentran a los aldehídos que han demostrado tener una actividad antibacteriana y antifúngica (Croft, Jüttner, & Slusarenko, 1993; Zeringhe, 1992) así como para ser utilizados como repelentes de insectos.

En el presente trabajo se llevó a cabo la primera etapa de purificación de la enzima HPL extraída de las hojas de orégano (*Origanum vulgare L.*) utilizando cromatografía de intercambio iónico, debido a que se encontró actividad de la enzima HPL en esta planta en trabajos previos realizados en la Universidad Tecnológica de la Mixteca. Se implementó una metodología para la eliminación de clorofilas del extracto crudo del orégano utilizando una mezcla de hexano:acetona (3:2).

Por otro lado, en el laboratorio se realizó la producción de los sustratos (hidroperóxidos) de la enzima HPL provenientes del ácido linoleico y linolénico. Con los cuales se realizaron lecturas de actividad total en el extracto crudo para conocer con que hidroperóxido la enzima HPL del orégano tenía más actividad obteniéndose una actividad más elevada con los hidroperóxidos provenientes del ácido linolénico, los cuales se utilizaron para calcular la actividad total de la HPL semi-purificada.

En este estudio se trabajó con dos extractos, uno con la presencia del detergente tritón X-100R y otra muestra sin la adición de éste detergente. De manera general el valor de la actividad total se mostró más alta en la muestra que no contenía tritón X-100R. Por otra parte se llevó a cabo la lectura de concentración de proteína durante las diferentes etapas de purificación utilizando el método de Bradford. Después de llevar a cabo la primera etapa de purificación se realizaron geles de electroforesis SDS-PAGE para conocer el peso molecular de las sub-unidades de la enzima HPL encontrándose un peso molecular de 56.6 KDa para las unidades de la enzima HPL presentes en el orégano.

II. ANTECEDENTES

2.1 Definición de la enzima hidroperóxido liasa (HPL)

La enzima HPL cataliza la escisión de hidroperóxidos de los ácidos grasos para la formación de aldehídos y oxo-ácidos (Zamora, Hidalgo, & Alaiz, 1991). En las figuras 2 y 3 se pueden observar las rutas metabólicas que siguen los 13-hidroperóxidos (13-HPOD y 13-HPOT) y 9-hidroperóxidos (9-HPOD y 9-HPOT) para la síntesis de los compuestos mencionados anteriormente.

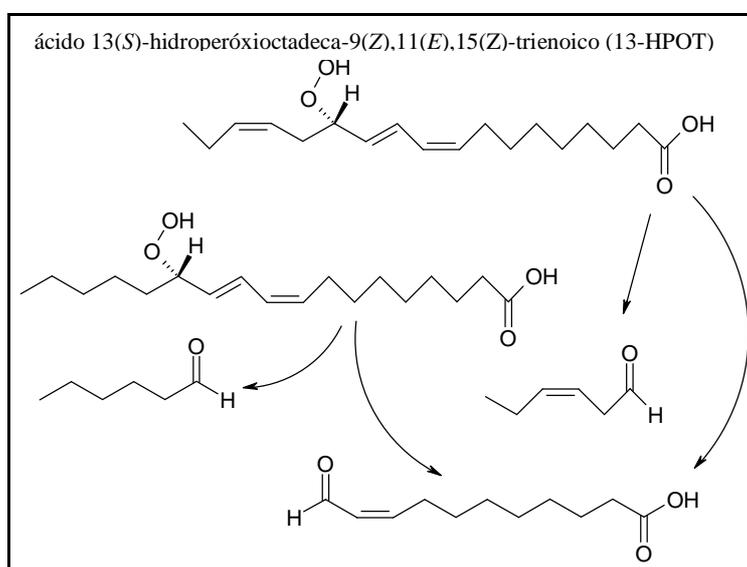


Figura 2. Formación de aldehídos y oxo-ácidos, a partir de 13-HPOT.

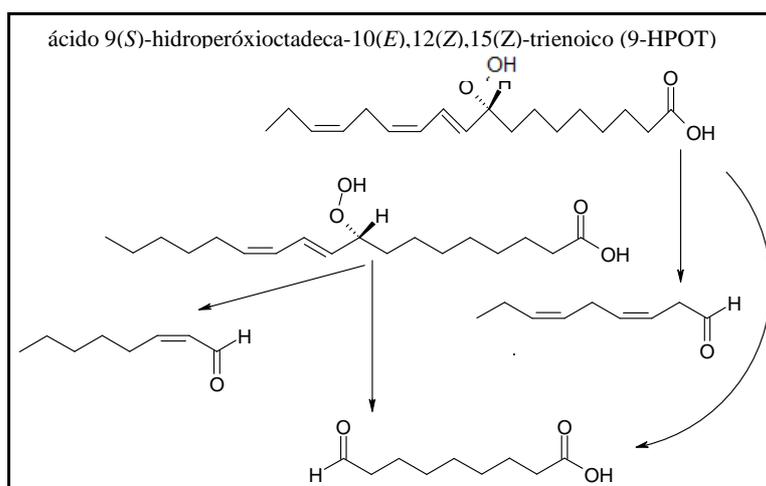


Figura 3. Formación de aldehídos y oxo-ácidos, a partir de 9-HPOT.

2.2 Localización de HPL

En tejidos verdes la enzima HPL está localizada en las lamelas del cloroplasto (Fig. 4) (Hatanaka,, Kajiwara, Sekiya, & Inouye, 1982). En tejidos no verdes se encuentra en el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la membrana plasmática (Wardale, Lambert, & Galliard, 1978).

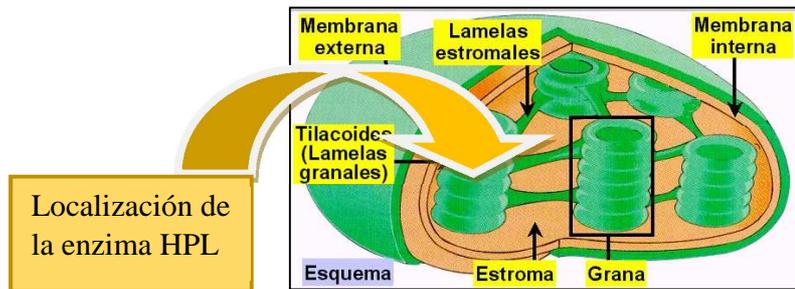


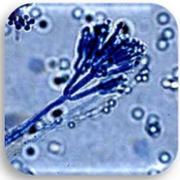
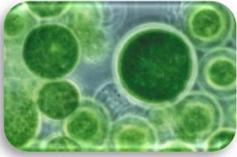
Figura 4. Imagen de cloroplasto.

2.3 Fuentes de obtención de enzima hidropéroxido liasa

En la tabla 1, se resumen los tres reinos biológicos (Plantae, Fungi y Protista) de donde se ha extraído la enzima hidropéroxido liasa. No se puede generalizar a partir de donde se puede extraer la enzima ya que la obtención de energía de los organismos que poseen la enzima son tanto autótrofos como heterótrofos. Se podría pensar que solo los organismos que tienen clorofila en sus células son los únicos poseedores de la enzima, pero esto excluiría a los hongos. De una manera global se puede mencionar que la enzima HPL se extrae a partir de células eucariotas.

Tabla 1. Reinos biológicos, fuentes de extracción de la enzima HPL.

Reino biológico	Células	Obtención de energía
Plantas superiores 	Eucariotas Multicelulares	Autótrofos Llevan a cabo la fotosíntesis Tienen clorofila

<p>Hongos</p> 	<p>Eucariotas Unicelulares Multicelulares</p>	<p>Heterótrofos No poseen clorofila, para su alimentación pudren tejidos vegetales y absorben los productos resultantes de la descomposición.</p>
<p>Algas</p> 	<p>Eucariotas Unicelulares Forman cadenas de células</p>	<p>Autótrofos Llevan a cabo la fotosíntesis Tienen clorofila</p>

2.3.1 Fuentes vegetales

Las fuentes de extracción de la enzima HPL son: hojas, raíces, cotiledones, semillas y frutas (Tabla 2). La primera fuente de extracción reportada para la enzima fue en el plátano en la década de los 70's (Tressl, & Drawert, 1973).

Tabla 2. Fuentes de extracción de la enzima HPL.

Fuente de extracción	Autores
Plátano	(Tressl y Drawert, 1973)
Sandía	(Vick y Zimmerman, 1976)
Pepino	(Galliard y Phillips, 1976)
Tomate	(Galliard <i>et al.</i> , 1977)
Hojas de frijol	(Matthew y Galliard, 1978)
Plántulas de alfalfa	(Sekiya <i>et al.</i> , 1979)
Semillas de soja	(Matoba <i>et al.</i> , 1985)
Pera	(Kim y Grosch, 1981)
Manzana	(Schreier y Lorenz, 1982)
Tabaco	(Sekiya <i>et al.</i> , 1984)
Hojas de té	(Hatanaka <i>et al.</i> , 1982)
Hojas de espinaca	(Vick <i>et al.</i> , 1987)

2.4 Sustratos de HPL

La enzima lipoxigenasa (LOX) cataliza la oxidación y ruptura de ácidos grasos de 18 carbonos como el ácido linoleico y linolénico (aceites esenciales). Los productos de esta oxidación son; 13-hidroperóxidos (13-HPOD y 13-HPOT) y 9-hidroperóxidos (9-HPOD y 9-HPOT). Estos compuestos químicos son los sustratos de la enzima HPL (Zamora et al., 1991). En la figura 5 se muestran las estructuras químicas de los ácidos linoleico y linolénico.

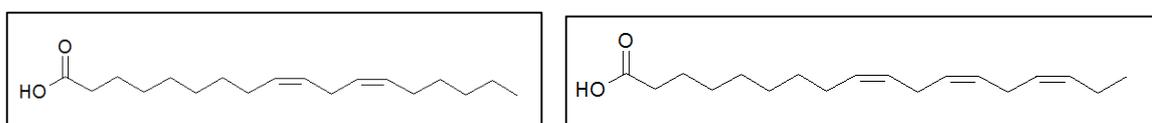


Figura 5. A. Estructura del ácido linoleico y B. Estructura del ácido α -linolénico.

2.4.1 Sustrato más común con excepciones.

En la mayoría de las plantas estudiadas, enumeradas en la tabla 2, los 13-hidroperóxidos (13-HPOD y 13-HPOT) son los sustratos más activos para la HPL y en menor proporción lo son 9-hidroperóxidos (9-HPOD y 9-HPOT).

En el pepino, la enzima puede utilizar cualquiera de los dos isómeros, el 9-hidroperóxido (9-HPOD) o el 13-hidroperóxido (13-HPOD), como sustratos (Galliard, Phillips, & Reynolds, 1976). En la pera el único sustrato es el 9-hidroperóxido (9-HPOD) (Kim, & Grosch, 1981). En el caso de los champiñones utiliza como sustrato solamente el 10-(*S*)-hidroperóxido produciendo fragmentos de 8 y 10 átomos de carbono, el 1-octen-3-ol y el ácido 10-oxo-(*E*)-8-decenoico (Wurzenberger, & Grosch, 1984).

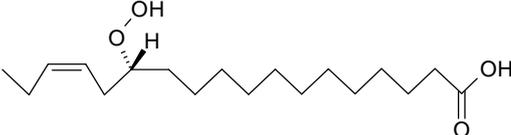
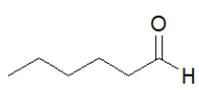
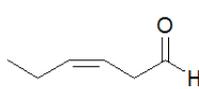
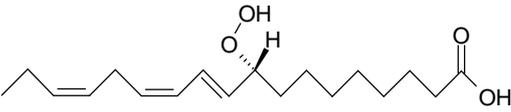
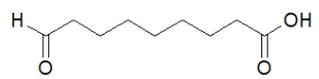
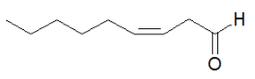
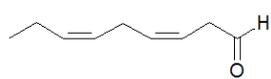
2.5 Productos de la enzima HPL

Son compuestos químicos de bajo peso molecular, como lo son aldehídos y oxo-ácidos. Estos aldehídos volátiles juegan un papel importante en la formación del aroma de muchas frutas, flores y plantas. Además, los aldehídos tienen actividad antimicrobiana *in vitro* y por

lo tanto se cree que participan en la respuesta de defensa de las plantas contra plagas y el ataque de patógenos.

En la tabla 3, se muestra los productos de obtención de la enzima HPL, entre los que se encuentran el hexanal, un aldehído muy utilizado en la industria de bebidas para conferir notas frescas, 3(Z)-hexenal y los oxo-ácidos.

Tabla 3. Productos de HPL.

SUSTRATO	PRODUCTOS	
	Nombre IUPAC	Estructura química
ácido 13(<i>S</i>)-hidroperóxi octadeca-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-dienoico (13-HPOD) 	hexanal	
	3(<i>Z</i>)-hexenal	
	Ácido 12-oxo-9(<i>Z</i>)-dodecenoico.	
ácido 9(<i>S</i>)-hidroperóxi octadeca-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>),15(<i>Z</i>)-trienoico (9-HPOT) 	ácido 9-oxononenoico	
	3(<i>Z</i>)-nonenal	
	3(<i>Z</i>),6(<i>Z</i>)-nonadienal	

2.6 Estructura de la enzima hidroperóxido liasa (HPL)

El análisis del código genético de la enzima hidroperóxido liasa ha mostrado hasta ahora un peso molecular de 55 KDa. Las enzimas HPL aisladas de plantas han mostrado contener

sub-unidades de 55-60 KDa (Howe, Lee, Itoh, Li, & De Rocher, 2000; Bate, Sivasankar, Moxon, Riely, Thompson, & Rothstein, 1998). Basados en pruebas de electroforesis (PAGE-nativa) de la enzima se ha sugerido que está integrada por trímeros o tetrámeros de alrededor de 200-250 KDa (Vick, & Zimmerman, 1976; Tijet, Waspi, Gaskin, Hunziker, Muller, Vulfson, Slusarenko, Brash, & Whitehead, 2000). Otras pruebas de electroforesis SDS-PAGE realizadas para calcular el peso molecular de las sub-unidades que conforman la HPL mostraron lo siguiente: un peso molecular de 55 KDa para la enzima HPL extraída de las hojas de amaranto tricolor, (Long et al., 2010), 55 KDa para la HPL del pepino, (Hornostaj et al., 1999), 53 KDa para la HPL de las hojas de té, (Hatanaka et al., 1982) y 48 y 50 KDa para la HPL de la guayaba, (Tijet et al., 2000). En el trabajo de investigación de Tijet et al., (2000) donde primero extrajeron la HPL de la guayaba y después la clonaron en *Escherichia coli*, encontraron una secuencia de 489 aminoácidos que constituyen a la enzima y obtuvieron un peso molecular para las sub-unidades de 54.8 KDa.

Por otro lado, basados en la homología de la secuencia genética, la enzima HPL fue identificada como una enzima citocromo P450 (Fig. 6). El peso molecular de la enzima HPL además del grupo hemo que contiene en el sitio activo (identificado como hemo b) son similares a este tipo de enzimas, razón por la cual la estructura de la enzima HPL se ha correlacionado con las enzimas citocromo P450.

Las enzimas del citocromo P450 son mono-oxigenasas que contienen grupos hemo, se encuentran presentes en todos los organismos vivos. Esta superfamilia de enzimas se origina a partir de un gen ancestral que pudo haber existido hace 3.5×10^9 años. El nombre de citocromo P450 se origina debido a que presenta un máximo de absorción característico a 450 nm después de la reducción con ditionito de sodio y un tratamiento con monóxido de carbono (P por el pigmento) (Omura, & Sato, 1964). Sin embargo, la enzima HPL no muestra una absorbancia máxima a 450 nm después de la reducción y tratamiento con CO. Este comportamiento es similar a la óxido aleno sintasa (AOS) que muestra una baja afinidad por el CO.

```

-45 attcataaaacaacaactacacaagaaaaatcaacaaat taaaaatgatacctataatgagctctgctctctatcaactgtacaccaaatctctccccgtagttaaattccaggg
1 M I P I M S S A P L S T A T P I S L P V R K I P G
76 agctacgggtttccattattaggccactttgggatcgattagactataactggttccaaaagctccagatttcttccagcaagagagtcgaaaagtataacagcacggtattcagaacg
26 S Y G F P L L G P L W D R L D Y N W F Q K L P D F F S K R V E K Y N S T V F R T
196 aatglaccgcttgtttccattttttgggtgtaaatccaaatgagtgccggtactggatgtcaagtcatttgccactctatttgataggagattgttgagaagctaatgtgctt
66 N V P P C F P P F L G V N P N V V A V L D V K S E A H L F D M E I V E K A N V L
316 gttgggtatttcagccagctgttttactgggtgatatgctgtttgtgcttatcttgatactctgaacctaaacatactcagattaagaacttttcattggacatcctaaaaaga
106 V G D F M P S V V Y T C D M R V C A Y L D T S E P K H T Q I K N F S L D I L K R
436 agttcaagacatgggtgcctacactagttaagaacttgatacactgttcggaacttttgaatcagatcttcaaaatccaaatcagcttctctctcctgcatggcaaaaatcctc
146 S S K T W V P T L V K E L D T L E G T P R S D L S K S K S A S L L P A L Q K F L
556 ttcaacttctctccttaactttcctggggccgattccactcagcctcaccggagatgccaaactctggcttgcctatcttgatgcatggctagcttaactagcactactgttagc
186 F N F F S L T F L G A D P S A S P E I A N S C G F A Y L D A W L A I Q L A P T V S
676 attgggttcttcaacccttgaagaactcttcgctccactcttttcatacctctatttcttctgctggaggttacgaaaaactcattaagtttgtaaaagtgaagctaaaggaagt
226 I G V L Q P L E E I F V H S F S Y P Y F L V R G C Y E K L I K F V K S E A K E V
796 ttaacgagggcacaacagacttccagctaacgaaagaagccattcataaccctttgttctcttggattcaatgcttttgggtgttccaccatcttctgccaacctctggga
266 L T R A Q T D P Q L T E Q E A I H N L L F I L G F N A F G G P T I P L P T L L G
916 aacctggagacgagaaaaatgctgagatgcaagagaaactgagaaaaagaagtgggaaaaaagttgggacaaaatcaagaaaacttgagtttgagagtgtaaaagaatggaactgtt
306 N L G D E K N A E M Q E K L R K E V R E K V G T N Q E N L S F E S V K E M E L V
1036 cagcttttgggttatgaatcacttaggctaacccaccagtgccaagtcaatctgcaagagcaagaaaagctcagctcagttccatgattcagtttccgaaatcaagaaagtgaa
1346 Q S P V Y E S L R L S P P V P S Q Y A R A R K D F M L S S H D S V Y E I K K G E
1156 ctcttttgggttaccagccattagtgatgaagatccaaagggtgtttgatgaacctgaaaagtttatgttggagaggtttacaaggagaaagggaaagaattgctgaattattgttt
386 L L C G Y Q P L V M K D P K V F D E P E K F M L E R E F T K E K G K E L L N Y L F
1276 tggctaaatggctccagactgggagacctactgaatcaaacagcaatgtgctgctaaaggatgctgcttactcttactgcttcttctgattgtggcttacatcttccaaagtatgattct
426 W S N C P Q T G R P T E S N K Q C A A K D A V T L T A S L I V A Y I P Q K Y D S
1396 gtgagtttctctctgttctcactcactctgtgaaaaagcctgctgagttattgtactatgtagtactaaagggtgctaaacatggtgaaattaagtcatcagctgctttctctc
466 V S F S S G S L F S V K K A C *
1516 cacctattgtgatgtaacattatttcatgaataaaagttcaagaagagtgcttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 6. Nucleótido y secuencia de aminoácidos de la HPL del pimienta verde.

Las enzimas citocromo P450 contienen sub-unidades con un peso molecular de 45-60 KDa. Se estudiaron seis estructuras cristalinas de enzimas citocromo P450, (Poulos, Finzel, Gunsalus, Wagner, & Kraut, 1985). Los análisis revelaron que estas enzimas son ricas en estructura secundaria (Figura 7).

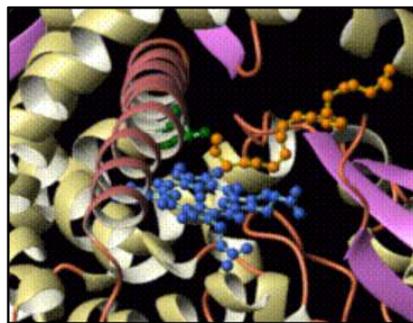


Figura 7. Estructura cristalina del dominio hemo de la P450BM-3, una mono-oxigenasa que metaboliza los ácidos grasos.

El grupo prostético de las enzimas citocromo P450 es una fracción de protoporfirina IX (hemo b). Sin embargo, se han utilizado una variedad de métodos físicos para el estudio de la estructura del sitio activo (Weiner, 1986). El hierro del grupo hemo está localizado en el

centro del anillo de la protoporfirina enlazado por cuatro nitrógenos de pirrol. El dominio de la unión hemo contiene las características secuenciales FxxGxxCxxG, en el que el anión tiolato es conservado de la cisteína sirve como el quinto ligando (axial) al hierro hemo, el sexto ligando es un grupo OH- de una molécula de agua H₂O.

2.7 Actividad enzimática de la HPL

La actividad enzimática: es aquella actividad que cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto. En la tabla 4 se observa la actividad total y la actividad específica encontrada para la enzima HPL en diferentes investigaciones.

Tabla 4. Actividad total y específica de la enzima HPL.

Long et al., (2010), hojas de amaranto tricolor	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo	285	312	0.9
0–35% (NH ₄) ₂ SO ₄	246	130	1.9
DEAE toyopearl	140	30.9	4.5
Suurmeijer et al., (1999) tomate	actividad total (μ kat)	Actividad (nkat/ml)	Actividad específica (nkat/mg)
Extracto crudo	5.4	8.4	7.5
DEAE	0.9	21.7	65.1
Tijet el al., () guayaba	Actividad total (nkat)	Proteína total (mg)	Actividad específica (nkat/mg)
Extracto crudo	172050	1111	155
30–60% (NH ₄) ₂ SO ₄	62300	762	82
Cromatografía de permeación en gel	32640	39	837
Itoh et al., (1999) cotiledones de girasol	Actividad total actividad total (μ kat)	Proteína total (mg)	Actividad específica (μ kat/mg)
Extracto crudo	4495	555.0	8.1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 50-75%	3820	69.3	55.1
DEAE-celulosa	2964	38.8	76.4

* 1 kat = 6×10^{-7} U

2.8 Condiciones óptimas de pH y temperatura

En la tabla 5 podemos observar las condiciones óptimas de pH y temperatura para la enzima hidropéroxido liasa extraídas de tejidos vegetales como hojas y frutos. El pH encontrado varía de 6.0-7.5 y la temperatura de 15-22°C.

Tabla 5. Temperatura y pH óptimos de la enzima HPL.

Autores	Fuente de extracción	pH óptimo	Temperatura óptima
Rabetafika <i>et al.</i> , (2008)	Hojas de remolacha azucarera (<i>Beta vulgaris L.</i>)	6.7	22°C
Long <i>et al.</i> , (2012)	Hojas de amaranto tricolor (<i>Amaranthus mangostanus L.</i>)	7.5	20°C
Gargouri <i>et al.</i> , (2004)	Hojas de hierbabuena (<i>Mentha veridis</i>)	7.0	15°C
Suurmeijer <i>et al.</i> , (2000)	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	6.5	Nd
Tijet <i>et al.</i> , (2000)	Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)	6.0	Nd

Nd: no determinado

2.9 Mecanismo de acción propuesto para la enzima hidropéroxido liasa (HPL)

Desde la caracterización de la enzima hidropéroxido liasa y de que se conoce que la HPL pertenece a la familia de enzimas citocromo P450, los investigadores mencionan que la HPL sigue un mecanismo hemolítico. Teniendo un proceso donde intervienen radicales y una inhibición de la actividad enzimática por captadores de radicales (Fig. 8).

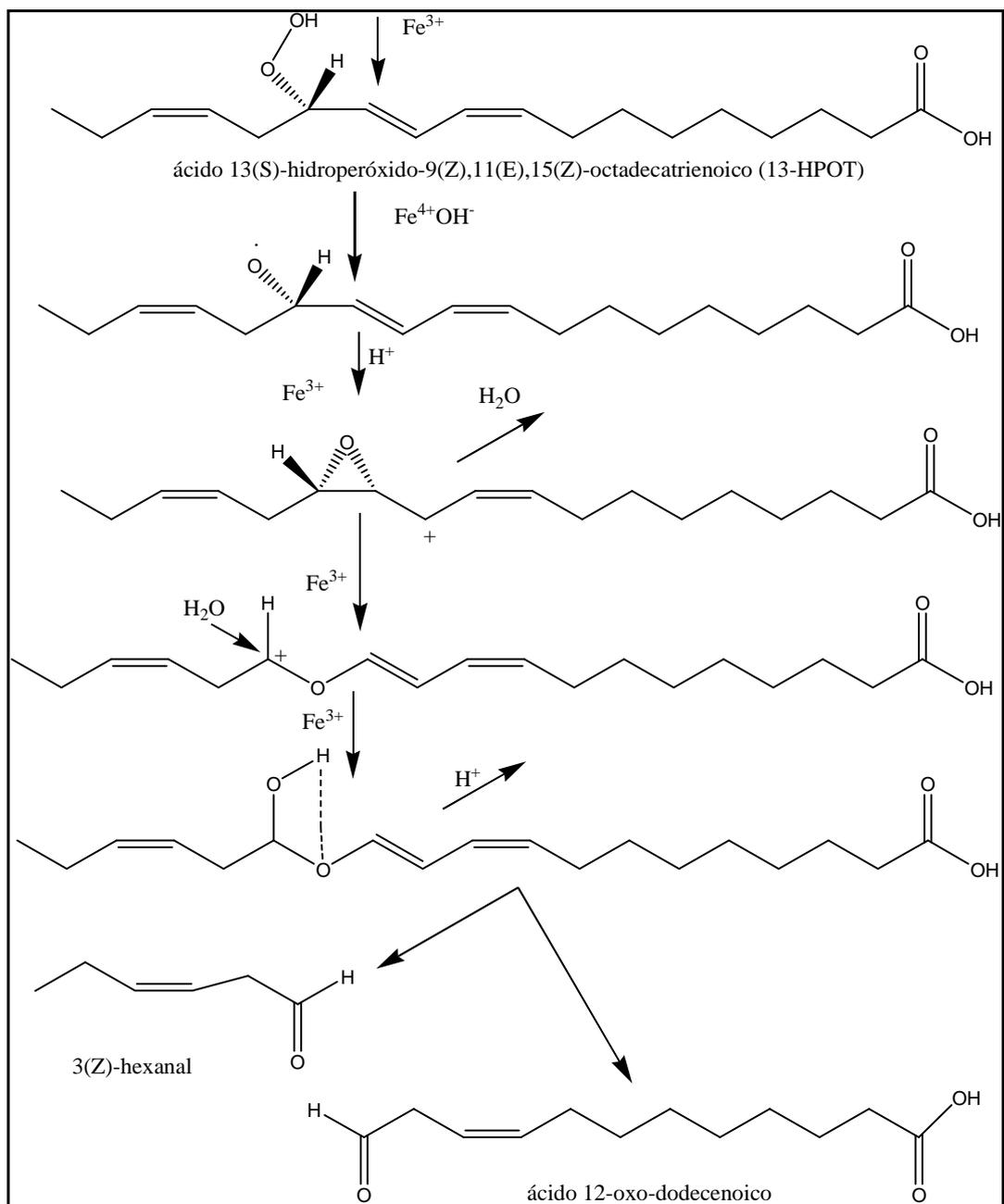


Figura 8. Mecanismo de acción HPL.

2.10 Purificación de la enzima HPL.

En la tabla 6 se observan las tres etapas de purificación que se han realizado a la enzima HPL; en la primera etapa se ha empleado cromatografía de intercambio iónico, en la segunda cromatografía de interacción hidrofóbica y en la tercera etapa cromatografía en

hidroxiapatita. La HPL extraída de la guayaba (*Psidium guajava*) se purificó 26.2 veces en tres etapas (Tijet *et al.*, 2000). Mediante la purificación en tres etapas de la enzima HPL extraída de las hojas de amaranto tricolor (*Amaranthus mangostanus L.*) se logró una purificación de 34.9 veces (Long *et al.*, 2010). En los trabajos de investigación se han realizado generalmente para el caso de la purificación de la enzima HPL tres etapas de purificación.

Tabla 6. Etapas de purificación de la enzima HPL.

HPL NO PURIFICADA		HPL PURIFICADA			
FUENTE	AUTORES	FUENTE	AUTORES	ETAPAS DE PURIFICACIÓN	PURIFICACIÓN
Plátano (<i>Musa sapientum</i>) 	Tressi y Drawert, (1973)	Hojas de amaranto tricolor. (<i>Amaranthus mangostanus L.</i>) 	Long <i>et al.</i> , (2010).	1-cromatografía de intercambio iónico	5 veces
				2-cromatografía de interacción hidrofóbica.	17.6 veces
				3- cromatografía en hidroxiapatita.	34.9 veces
Plántulas de sandía (<i>Citrullus kanatos</i>) 	Vick y Zimmerman, (1976)	Guayaba (<i>Psidium guajava</i>) 	Tijet <i>et al.</i> , (2000)	1- cromatografía de intercambio iónico.	5.4 veces
				2- cromatografía de interacción hidrofóbica.	6.1 veces
				3- cromatografía en hidroxiapatita.	26.2 veces
Hojas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Mateo y Galliard, (1978)	Cotiledones de girasol (<i>Helianthus annuus L.</i>) 	Itoh y Vick, (1999)	1- cromatografía de intercambio iónico, columna DEAE	6.8 veces
				2- Phenyl-Sepharose	56.6 veces
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	Galliard y Phillips, (1976)			3- Superdex-200 (gel de filtración)	166 ces

2.11 Métodos de ruptura celular

Los métodos de ruptura celular se utilizan para obtener las enzimas intracelulares, que son aquellas enzimas que se encuentran en el interior de la célula. Después de separar las enzimas se prosigue con una concentración, enriquecimiento y purificación de la misma. A continuación se mencionan los métodos de ruptura celular.

a) Químicos: son aquellos en donde se utilizan: álcalis, detergentes, disolventes orgánicos, lisozima con EDTA y choque por enfriamiento.

b) Físicos: en los métodos físicos se emplea: sonicación, choque osmótico, congelación y descongelación y homogenización (o trituración mecánica).

c) Enzimáticos: para este último método se emplea lisozima (que hidroliza la pared celular) y una vez sin protección, la membrana celular puede romperse fácilmente.

Enzimas extracelulares: la enzima es segregada fuera de la célula y no se requieren técnicas de ruptura celular. El número de proteínas que se segregan es limitado, y por eso es relativamente fácil aislar una enzima concreta a partir de una mezcla.

a) Fuentes de obtención de enzimas:

- Las enzimas extraídas de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), se consideran seguras porque son extractos naturales, la producción industrial de enzimas requiere tres pasos: 1° la fermentación o cultivo del microorganismo productor de la enzima deseada en fermentadores de hasta 1000 m³ de tipo aerobio o anaerobio, con medios de cultivo que contienen sales inorgánicas y materias primas renovables, 2° la recuperación del producto mediante la extracción y purificación de la enzima, utilizando diferentes procedimientos como: centrifugación, técnicas de precipitación de proteínas y la separación con cromatografía, y 3° la formulación o preparación del producto enzimático en polvo,

granulados o disoluciones (Castillo, Roldan, Blasco, Huertas, Caballero, Moreno-Vivían, & Martínez, 2005).

- Manipulación genética: en la cual se necesitan cepas de un determinado microorganismo, donde las enzimas son clonadas para que se produzcan en condiciones más idóneas (producción específica) o más baratas (medios de cultivo económicos (Gonzales, Pérez-González, Ventura, Sánchez, Sanz, Fernández, Vallés Piñaga, & Ramón, 1993). Por ejemplo la introducción de genes fúngicos en levaduras o bacterias.
- Enzimas extraídas de plantas: se necesita realizar una ruptura celular de la parte de la planta de donde se va a extraer la enzima, utilizando métodos físicos o químicos, obteniéndose así el extracto crudo (EC); posteriormente se purifica siguiendo los procedimientos mencionados anteriormente.

2.12 Fundamentos y mecanismo de acción de la cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica y en hidroxiapatita

2.12.1 Cromatografía de Intercambio Iónico

La cromatografía de intercambio iónico es un método que permite la separación de moléculas basada en sus propiedades de carga eléctrica. Se compone de dos fases: la fase estacionaria y la fase móvil (Fig. 9). La fase estacionaria insoluble lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil, la cual suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas generalmente en forma de buffer. Los iones de ésta compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria.

Desde finales del siglo XIX en los inicios de la cromatografía de intercambio iónico, se utilizaron caolines y zeolitas. Las resinas sintéticas intercambiadoras de iones se produjeron en 1935 y han encontrado una gran aplicación como: en el ablandamiento del agua,

desionización del agua, purificación de soluciones, separación de iones, separación de proteínas.

El principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el ambiente iónico. La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza por lo general, en dos fases como se muestra en la figura 9; en la primera fase, las sustancias a separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye de la columna con buffers de diferentes pH o diferente fuerza iónica, en donde los componentes del buffer compiten con las moléculas a separar, por los diferentes sitios de unión de la resina (Nelson, & Cox, 2008).

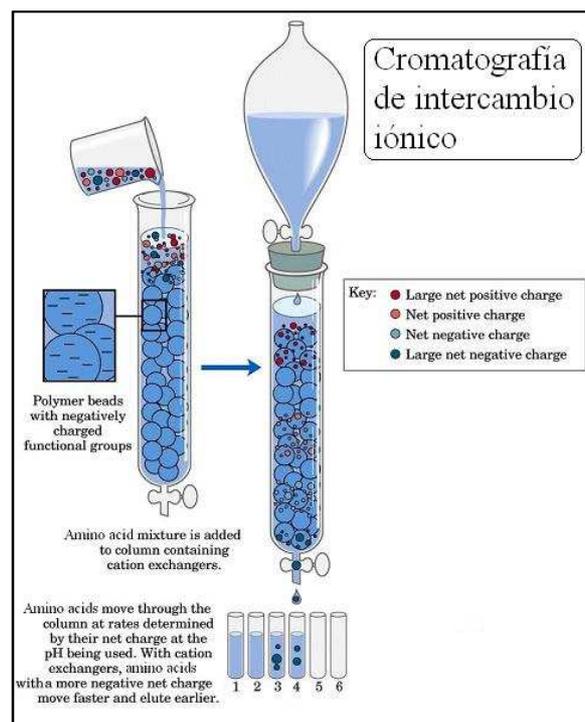


Figura 9. Fase estacionaria y fase móvil.

2.12.1.1 Tipos de Intercambiadores Iónicos

Los intercambiadores iónicos se clasifican en ácidos o básicos, fuertes o débiles, como se muestra en la tabla 7. Los grupos sulfonatos ($-\text{SO}_3^-$) de resinas ácidas fuertes siguen ionizadas incluso en disoluciones muy ácidas. Los grupos carboxilo ($-\text{CO}_2^-$) de las resinas ácidas débiles

se protonan a un pH próximo a 4 y pierden su capacidad de intercambio catiónico (Harris, 2001).

Los intercambiadores iónicos de celulosa y dextrano que son polímeros de la glucosa, poseen tamaños de poro más grandes y menores densidades de carga y sirven para intercambio iónico de macromoléculas como las proteínas. Un dextrano entrelazado por moléculas de glicerina se vende bajo el nombre de Sephadex, otros intercambiadores iónicos basados en polisacáridos son la agarosa y la poliacrilamida. El Sephadex-DEAE por ejemplo es un Sephadex de intercambio aniónico que contiene grupos dietilaminoetilo.

Tabla 7. Tipos de resinas de intercambio iónico.

Tipo de resina	Constitución química	Forma usual como se vende	selectividad	Estabilidad térmica
Intercambiador catiónico ácido fuerte	Grupos de ácidos sulfónicos unidos al copolímero de estireno y divinilbenceno	$\Phi\text{-SO}_3\text{-H}^+$	$\text{Ag}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+ > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$	Buena hasta 150°C
Intercambiador catiónico ácido débil	Grupos de ácido carboxílico unidos a copolímero de acrílico y divinilbenceno	R-COO-Na^+	$\text{H}^+ >> \text{Ag}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{H}^+ >> \text{Fe}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$	Buena hasta 100°C
Intercambiador aniónico base fuerte	Grupos de amonio cuaternario unidos a copolímero de estireno y divinilbenceno	$\Phi\text{-CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Cl}^-$	$\text{I}^- > \text{fenolato}^- > \text{HSO}_4^- > \text{ClO}_3^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{CN}^- > \text{HSO}_3^- > \text{NO}_2^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{IO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{acetato}^- > \text{OH}^- > \text{F}^-$	La forma OH- buena hasta 50°C; la forma Cl- y otras formas buenas hasta 150°C
Intercambiador aniónico base débil	Grupos de poli-alquilamina unidos a copolímeros de estireno y divinilbenceno	$\Phi\text{-NH}(\text{R})_2^+ \text{Cl}^-$	$\Phi\text{SO}_3\text{H} > \text{cítrico} > \text{CrO}_3 > \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{tartárico} > \text{oxálico} > \text{H}_3\text{PO}_4 > \text{H}_3\text{AsO}_4 > \text{HNO}_3 > \text{HI} > \text{HBr} > \text{HCl} > \text{HF} > \text{HCO}_2\text{H} > \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} > \text{H}_2\text{CO}_3$	Recomendado limitarse a 65°C

FUENTE: Adaptado de Khyrn, J.X. (1974). Analytical Ion-Exchange Procedures in Chemistry and Biology. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Como se puede observar en la figura 10, el tamaño del poro de la resina determina el acomodo de las moléculas que se quieren separar. En la resina donde existe un mayor tamaño de los poros, el compuesto de la fase móvil se puede unir más fácilmente dentro de los poros incrementando la cantidad de intercambiadores iónicos teniendo una gran

superficie de contacto, y no así como en la resina que tiene poros pequeños donde las moléculas tienen menor superficie de contacto.

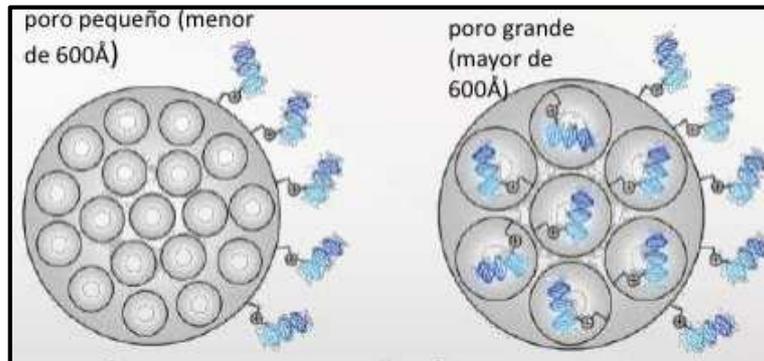


Figura 10. Tamaño del poro de la resina.

2.12.2 La cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica aprovecha la hidrofobicidad de las proteínas para promover su separación, tiene como base utilizar las interacciones hidrofóbicas entre los ligandos hidrófobos inmovilizados y las regiones no polares de la superficie de las proteínas. La adsorción aumenta con alta concentración de sal en la fase móvil y la elución se logra mediante la disminución de la concentración de sal del eluyente (fase móvil) (Melander & Horváth, 1977; Fausnaugh & Regnier, 1986; Roe, 1989).

2.12.3 La cromatografía en hidroxiapatita

La cromatografía en hidroxiapatita (biocristal formado de calcio, fósforo e hidrógeno, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$), fue introducida en 1956 para la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Las proteínas nativas pueden unirse muy fuertemente a la hidroxiapatita, pero la retención decrece drásticamente con la desnaturalización de las proteínas. La hidroxiapatita se une tanto a proteínas ácidas como básicas, La superficie de hidroxiapatita tiene dos tipos de sitios de adsorción, uno es el dominio cargado positivamente donde ocurre la adsorción de los componentes aniónicos, se componen de iones calcio y sirve como intercambiador aniónico. El otro sitio conlleva cambios negativos con iones fosfato que puede ser considerado como un

intercambiador catiónico. La cromatografía en hidroxapatita se lleva a cabo utilizando un gradiente linear de buffer de fosfato a un pH de 6.8 (Karger, 1996).

2.13 Electroforesis

La electroforesis es un método electroanalítico que se utiliza para determinar el peso molecular de proteínas. Se basa en el movimiento o desplazamiento diferencial de especies cargadas (iones), sustancias neutras o migración pasiva, por atracción o repulsión en un campo eléctrico. Dependiendo de las características del movimiento realizado por los diferentes componentes de la muestra analizada, podemos determinar de una forma cualitativa las diferentes sustancias que componen la muestra. La determinación cuantitativa se puede llevar a cabo por diferentes métodos.

Las partículas que presenten carga y que se encuentren suspendidas en un medio actuarán igual que un ion normal; si sometemos esta suspensión a la acción de un campo eléctrico el resultado será la aparición de movimientos en las diferentes partículas presentes en el medio. Estas partículas pueden tener una carga propia o presentar una que se deba al fenómeno de adsorción sobre una superficie de los iones presentes en el medio. En algunos casos esta carga dependerá del pH del medio en el que se encuentran, de tal forma que existirá un pH determinado en el que las partículas se comportan como partículas neutras. Este pH se denomina pH isoeléctrico (Silvia, García, Del Castillo, Ania, & Gómez, 2006). El movimiento originado en estas partículas debido a la acción del campo magnético (migración electroforética) se ve alterado por una serie de factores como, pH, temperatura, corriente eléctrica, soluciones buffer, entre otros.

a)- Clasificación

Existen diferentes clasificaciones de la electroforesis, una de las más empleadas se basa en la naturaleza del medio en el que se realiza la prueba.

1-Electroforesis libre o de superficie de separación móvil: se colocan dos disoluciones a concentraciones diferentes bajo los efectos de un campo eléctrico y se observa su

movimiento. Las proteínas con carga positiva irán hacia el cátodo y las que presentan carga negativa hacia el ánodo.

2-Electroforesis de zona: se puede llevar a cabo con soporte (papel, celulosa, etc.) o sin soporte (electrodecantación, gradiente de densidad).

2.13.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Dentro de la electroforesis libre se encuentran los geles de poliacrilamida que es una de las técnicas más ampliamente usadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra dado que se requieren solo cantidades del orden de microgramos de proteína.

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro. En la figura 11 se puede observar el equipo de electroforesis, que cuenta con una cámara de electroforesis, soporte para geles, cuñas de plástico, tapa, etc.

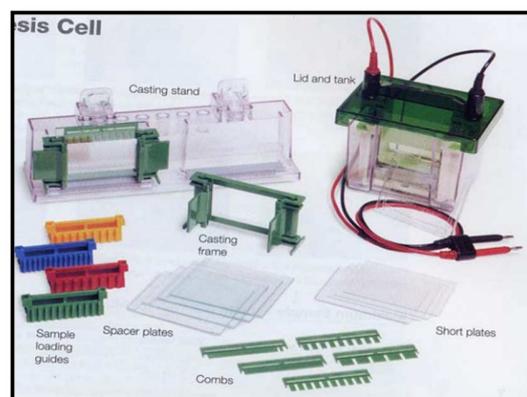


Figura 11. Equipo de electroforesis.

2.13.1.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del peso molecular de las subunidades de proteínas.

La estructura del detergente SDS empleado en geles de electroforesis desnaturalizantes es $C_{12}H_{25}NaO_4S$. El anión se une a las proteínas por adsorción no específica (la mayoría de las proteínas une SDS en la misma proporción, 1.4 g de SDS por gramo de proteína, cerca de 1 molécula de SDS por cada 2 residuos de aminoácido). El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0.4 % de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo, se emplea 1 % para lograr un margen de seguridad (García, 2000).

El R_f (movilidad electroforética relativa) es una medida convencional de la movilidad de la proteína relativa al frente de migración y se define como la distancia desde el inicio del gel separador hasta el centro de cada banda dividida entre la distancia a la que ha migrado el ion líder. Las R_f de las proteínas en estos geles varían en forma lineal con el logaritmo de sus masas moleculares. En la práctica, la masa molecular de una proteína se determina al someterla a electroforesis junto con varias proteínas “marcadoras” de masa molecular conocida, en un rango que implica al de la proteína de interés.

2.13.1.2 Formación del gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida habitualmente se obtienen por la polimerización de moléculas de acrilamida y N,N-metilén-bis-acrilamida, disueltas en un tampón adecuado. Requieren la acción de un polimerizador, que suele ser el persulfato amónico. Al disolverse en agua,

produce radicales libres, que a su vez inducen la formación de numerosos radicales libres en la acrilamida, permitiendo de esa manera su polimerización. La gelificación se consigue debido a la formación de enlaces cruzados por la presencia de la bisacrilamida. De esta manera se obtiene una malla de cadenas de acrilamida. Al proceso de polimerización también le se añade tetrametilén diamina (TEMED), que es un estabilizador de los radicales libres (Roca, Oliver, & Rodríguez, 2003).

Esta reacción es fuertemente inhibida por altos niveles de oxígeno (Moi, Chan, Becker, & Chalmers, 1999), por lo que la solución debe ser desgasificada para lograr una formación reproducible de gel. Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bisacrilamida, etc. En la práctica las condiciones óptimas de una buena separación, se determinan experimentalmente, con el análisis de la influencia de los diferentes factores en la electroforesis en cuestión. La naturaleza de la muestra sirve de guía para alcanzar las condiciones en la que se deben obtener los mejores resultados (Hooper, 1999).

El tamaño de poro de los gels de poliacrilamida viene determinado por la concentración de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida) en el gel y en el número de entrecruzamientos entre moléculas. Normalmente se utilizan concentraciones de poliacrilamida entre el 3 y el 15% y la concentración de bisacrilamida se encuentra alrededor del 5% del total de acrilamida presente (Roca et al., 2003). En la figura 12.A. se observa la reacción de polimerización de la formación del gel de poliacrilamida y en la figura 12.B. se muestra un ejemplo de un gel de poliacrilamida con una separación de moléculas.

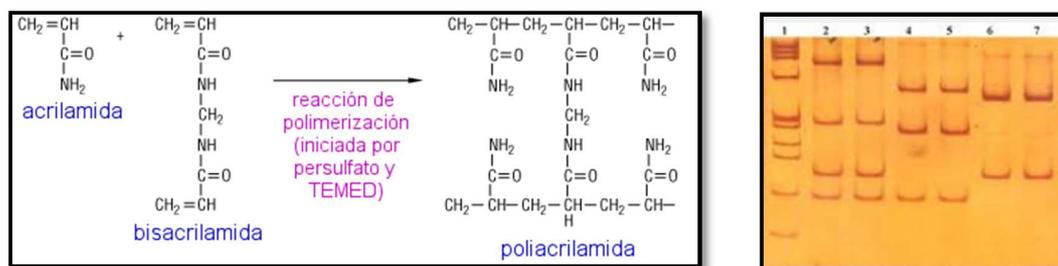


Figura 12. A. Formación de gel de poliacrilamida y B. Gel de poliacrilamida.

2.14 Orégano (*Origanum vulgare* L.)

2.14.1 Historia

Su nombre botánico *Origanum vulgare*, deriva del griego y significa, "esplendor de la montaña". Es una planta originaria de Europa Central, Meridional y Asia Central. Los españoles introdujeron el orégano en México (Kintzios, 2004).

2.14.2 Descripción

Planta herbácea que erecta puede alcanzar de 30 a 80 cm de altura, con tallos erectos, filosos y aromáticos; hojas ovales, pecioladas, dentadas o enteras. Flores rosadas o blancas de hasta 7 mm, reunidas en inflorescencias redondeadas terminales con estambres sobresalientes (Fonnegra, & Jiménez, 2007).

2.14.3 Parte útil

Las hojas y sumidades floridas desecadas, tienen un olor aromático, agradable y sabor algo amargo que contienen aceite esencial. La esencia es un líquido de color amarillo a pardo, cuyo principal componente es el carvacrol; también se puede hallar timol, α -pineno, terpenos, etc. El aceite esencial se utiliza como antimicrobiano y antiséptico, y también posee actividad antioxidante. Los compuestos mencionados también ayudan a proteger la planta contra herbívoros. Sin embargo, la composición y la cantidad de aceite esencial varía fuertemente entre las poblaciones de orégano (*Origanum vulgare* L.). A pesar de grandes esfuerzos para criar variedades de *Origanum vulgare* L. con un mayor proporción de timol y carvacrol para uso farmacéutico y el interés en los terpenos como defensas de las plantas, se sabe poco acerca de los factores moleculares determinantes de la biosíntesis y la composición del aceite esencial.

La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimentos y conservación del mismo sobre todo en la elaboración de carnes y embutidos (Beddows, Jagait, & Kelly, 2000), sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores; motivos que lo

han convertido en un producto de exportación. Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca del 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales o sus compuestos activos (Dubey, Kumar, & Tripathi, 2004).

2.14.4 Quimiotaxonomía del género *Origanum*

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales (Pascual, Slowing, Carretero, Sánchez, & Villar, 2001). Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano (Justesen, & Knuthsen, 2001). En *Origanum vulgare* se han encontrado los ácidos: coumérico, ferúlico, caféico, *p*-hidroxibenzóico y vainillínico.

2.14.5 Usos del Orégano (*Origanum vulgare* L.)

Los usos medicinales que se le han dado al orégano son para combatir: los dolores menstruales, la regulación de la menstruación, combatir gases, cólicos abdominales (Monigatti, Bussmann, & Weckerle, 2013) y ayuda a combatir la diarrea (Kujawska, & Hilgert, 2014).

Para disminuir la rancidez de aceites y grasas, se ha usado antioxidantes sintéticos como ter-butil-4-hidroxianisol (BHA) y ter-butil-4-hidroxitolueno (BHT). Sin embargo, en varios países está restringido su uso, porque estos antioxidantes parecen causar un efecto indeseable en enzimas del hígado y pulmón humanos (Inatani *et al.*, 1983). Por esto se ha centrado la atención en plantas comestibles como fuentes de antioxidantes naturales seguros y más efectivos, entre ellas especias, como orégano, salvia, romero y tomillo, y también canela y cebolla. También se ha reportado el efecto antioxidante de cinco compuestos fenólicos aislados de extractos metanólicos del orégano (*Origanum vulgare* L.), siendo uno de ellos el ácido rosmarínico (Lindberg & Bertelsen, 1995).

2.14.6 Estudios de Orégano (*Origanum vulgare L.*)

Se ha estudiado la efectividad del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) para inhibir el crecimiento de levaduras que descomponen los alimentos. Los datos que obtuvieron confirmaron que el aceite esencial del orégano tiene un alto potencial antimicrobiano y sus compuestos químicos son toxicológicamente seguros para el consumo humano (Souza, Stamford, & Trajano, 2007).

El aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) inhibió significativamente la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y otras bacterias patógenas en alimentos por lo que posee potencial en la disminución de enfermedades transmitidas por los alimentos (Carneiro, da Conceição Gomes, Vieira, Siqueira, Basílio, & Leite de Souza, 2009). La actividad antimicrobiana del aceite esencial ha sido atribuida a su compuesto fenólico mayoritario, el carvacrol (CAR). El carvacrol posee características hidrofóbicas e interactúa con diferentes orgánulos bacterianos, particularmente con la membrana citoplasmática y la pared celular, lo que provoca la pérdida de diferentes constituyentes celulares, el colapso de las estructuras de membrana y en última instancia, la muerte celular.

Otros investigadores han reportado que el orégano (*Origanum vulgare L.*) tiene funciones antioxidantes en alimentos, también es utilizado como un antiespasmódico que ayuda al tracto respiratorio y finalmente que en los alimentos tiene funciones antibacterianas y antifúngicas (Alonso, 2004).

a) Actividad antifúngica

El aceite esencial de orégano, empleando 0,25 mg/mL es responsable de la inhibición completa de *Candida albicans in vitro*, tanto en el crecimiento del micelio como en la germinación. Los estudios en ratones han demostrado que el aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare L.*) es 100 veces más eficaz que el ácido caprílico para eliminar *Candida albicans* (Roberts, O'Brien, & Subak-Sharpe, 2001).

Estudios realizados en 2010 por Almeida y colaboradores titulado: “Efficacy of Origanum essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi”, muestran más evidencia de la actividad antifúngica del orégano. En este estudio emplearon aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) y de mejorana (*Origanum majorana L.*). Las dosis empleadas del orégano (*Origanum vulgare L.*) fueron 80 µL/mL y para la mejorana (*Origanum majorana L.*) 160 µL/mL, siendo esta la concentración mínima inhibitoria (MIC). El aceite esencial proporcionó un efecto fúngico contra *Candida albicans* ATCC 7645. Después de 4 horas de exposición al aceite esencial con una concentración de 80 µL/mL se observó una inhibición del 100% del crecimiento radial del micelio. Las fugas de citoplasma, la pérdida de pigmentación y la estructura de células rotas indicaron la degeneración de la pared de los hongos. Estos resultados sugieren que el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) podría ser considerado como un compuesto antifúngico potencial para controlar el crecimiento de hongos patógenos y la aparición de infecciones fúngicas (Almeida, de Oliveira, Nunes, de Oliveira, Leite, & Barbosa, 2010).

b) Actividad antiparasitaria

El uso de una emulsión de 600 mg orégano, permite la completa desaparición de *Entamoeba hartmanni* (amebas) *Endolimax nana* (parásito), y *Blastocystis hominis* (parásito), en estudios realizados *in vivo* en el año 2000 (Force, Sparks, & Ronzio, 2000).

III. JUSTIFICACIÓN

El uso industrial que tienen las enzimas es muy amplio e importante, a continuación se enumeran sus aplicaciones: industria de elaboración de la pulpa del papel, industria de elaboración de detergentes, industria textil, industria de fabricación de cueros, industria farmacéutica, industria de alimentación animal y la industria alimentaria (Gacesa, & Hubble, 1987). En la industria alimentaria se utilizan las enzimas para la elaboración de: productos lácteos, vinos, cervezas, condimentos para carnes, elaboración de pan, así como la producción de jarabe de glucosa y fructosa, repostería y finalmente la elaboración de refrescos y jugos.

Mencionadas las aplicaciones de las enzimas, podemos corroborar su importancia. La relevancia de la extracción y purificación de la enzima hidropéroxido liasa (HPL), radica en que la HPL es necesaria para la formación de compuestos volátiles provenientes de derivados de ácidos grasos (Negre-Zakharov, Long, Dudareva, in Osbourn, & Lanzotti, 2009). Los compuestos formados de 6 carbonos proporcionan a flores, frutas, plantas y verduras de un aroma característico, el cual es llamado “olor fresco” u “olor verde”. Compuestos como el hexanal proveen una descripción de olores afrutados y verde intenso; y el (*E*)-3-hexenal imparte olores cítricos, a naranja, olores verdes y olor a acre (Gigot *et al.*, 2010). Estos aldehídos son adicionados a productos como jugos y refrescos para conferir olores frescos.

Conociendo la trascendencia del origen del aroma en flores, frutas y plantas; y de la tendencia actual de consumir productos mínimamente procesados, los aldehídos, productos de la enzima hidropéroxido liasa a partir de productos naturales están adquiriendo relevancia. Se conoce la manipulación genética en hongos, bacterias y levaduras para la producción del HPL; sin embargo, los consumidores prefieren los productos más naturales. En este trabajo se pretende extraer la enzima HPL a partir de una fuente natural aun no utilizada para la extracción de esta enzima, como lo es el orégano. Se sabe que el orégano se utiliza como especia para la elaboración de alimentos o como medicamento para el alivio de algunos malestares, además de las aplicaciones del aceite del orégano como antioxidante natural ayudando a combatir enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

IV. HIPÓTESIS

El método de extracción propuesto, mejorará la concentración de la proteína así como su actividad enzimática, obteniéndose valores iguales o superiores a los reportados en la literatura.

El uso de cromatografía de intercambio iónico permitirá una purificación de la enzima hidropéroxido liasa igual o mayor a los reportados en la literatura.

V. OBJETIVO GENERAL

- Extraer la enzima hidropéroxido liasa del orégano (*Origanum vulgare L.*) y purificarla en una primera etapa utilizando cromatografía de intercambio iónico.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proponer una metodología de extracción para la enzima HPL del orégano (*Origanum vulgare L.*) que permita obtener una enzima más pura, a través de la revisión de diferentes artículos científicos.
- Purificar la enzima extraída del orégano en una primera etapa mediante la cromatografía de intercambio iónico.
- Caracterizar la enzima mediante la determinación de la actividad enzimática, la concentración de proteína y la detección por electroforesis, en las diferentes etapas de obtención de la misma.

VII. METAS

- 1.- Efectuar la revisión bibliográfica durante la realización y redacción del protocolo y la tesis hasta su culminación.
- 2.- Obtener un extracto crudo a partir de las hojas de orégano, con la enzima HPL y con el menor porcentaje de impurezas.
- 3.- Obtener la enzima HPL purificada, en una primera etapa mediante cromatografía de intercambio iónico.

VIII. PROCESO METODOLÓGICO

La metodología presentada se basó en la revisión de tres artículos científicos, los temas básicos fueron; extracción de enzimas, determinación de la concentración de proteínas, determinación de la actividad enzimática, electroforesis y purificación de la enzima hidroperóxido liasa extraída de fuentes vegetales, los trabajos revisados fueron; Purification and characterization of hydroperoxide lyase from amaranth tricolor (*Amaranthus mangostanus L.*) leaves (Long *et al.*, 2010), Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes (Rabetafika *et al.*, 2008) y Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase (Suurmeijer *et al.*, 2000).

8.1 Reactivos y Materiales

Enzima Lipoxigenasa (SIGMA-ALDRICH), Ácido linoleico (SIGMA-ALDRICH), Ácido linolénico (SIGMA-ALDRICH), Tritón X-100 reduced (SIGMA-ALDRICH), Tris-Base (Tris (hydroxymethyl) aminomethane) Electrophoresis purity reagent 99.8% (BIO-RAD) Hexano (SIGMA-ALDRICH), Acetona (Fermont), Resina TOYOPEARL DEAE-650 M Contenido: Modified methacrylate copolymer in 20% aqueous ethanol TOSOH (SUPELCO Analytical), SDS Sodium dodecyl sulfate (BIO-RAD), Glicina (BIO-RAD), Azul de bromofenol (BIO-RAD), β -mercaptoetanol (BIO-RAD), Glicerol anhidro 99.9% (J.T.Baker), Éter etílico (J.T.Baker), L-cisteína (Analytika).

8.2 Preparación de sustratos para la enzima HPL

La obtención del ácido 13(*S*)-hidroperóxi octadeca-9(*Z*),11(*E*)-dienoico (13-HPOD) se realizó a partir del ácido linoleico y el ácido 13(*S*)-hidroperóxi octadeca-9(*Z*),11(*E*),15(*Z*)-trienoico (13-HPOT) a partir del ácido linolénico. Se pesaron en una balanza analítica 15 mg de la enzima lipoxigenasa (LOX), y 200 mg de ácido linoleico o linolénico. Después de pesarse, se añadieron en un Matraz Erlenmeyer de 1 L junto con 200 mL de tampón de glicina 0.2 M (pH=9). La mezcla se mantuvo en agitación durante una hora a una

temperatura de 25°C y en presencia de oxígeno 20 mL O₂/min a una presión de 0.1 Bar para llevar a cabo la oxidación de los ácidos grasos.

La enzima lipoxigenasa se inactivó con la adición de H₂SO₄ hasta alcanzar un pH=3. Los hidroperóxidos formados se extrajeron con un volumen equivalente 1:1 (v/v) de éter etílico con la ayuda de un embudo de separación, este paso se realizó 2 veces. La fase orgánica recuperada se secó con MgSO₄ anhidro. La separación de los hidroperóxidos del éter etílico se realizó utilizando un rotavapor. Los hidroperóxidos se recuperaron con etanol y se almacenaron a -20°C. La concentración de los hidroperóxidos se realizó midiendo la absorbancia a 234 nm utilizando un espectrofotómetro (model UV765 UV-Visible), mediante la ecuación de Lamber-Beer ($\epsilon=25,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $b=1\text{cm}$) se calculó la concentración de hidroperóxidos (Gargouri *et al.*, 1996).

8.3 Extracción de la enzima HPL

Se compró orégano (*Origanum vulgare L.*) fresco, se lavó con agua corriente y se eliminaron hojas de otras plantas y pastos. Se realizó un secado ligero al orégano con papel absorbente, después se desprendieron las hojas de los tallos y solo las hojas sanas se recolectaron en un vaso de precipitados de 1 litro. Se pesaron 100 gramos de hojas y se molieron en una licuadora con 300 ml de buffer de fosfato de sodio (0.1 M, pH 7), que contenía 10 mM de cisteína y 0.3% (w/v) de Tritón X-100R. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de manta de cielo. El extracto crudo se agitó manualmente durante 1 hora y 45 minutos a 4°C, después el extracto crudo se centrifugó (Fisher centrifug centrifuge Model 225) a 5100 rpm durante 90 min y se recolectó el sobrenadante.

Por otro lado se obtuvo un segundo extracto crudo, para obtenerlo se siguieron los pasos anteriores solo que en este caso no se agregó tritón X-100R al buffer de extracción. Este experimento se realizó con la finalidad de comparar la actividad de la enzima HPL en presencia y ausencia de éste detergente. A los extractos crudos se le realizaron mediciones de concentración de proteína y de actividad enzimática. Debido al problema detectado en previos estudios de extracción de la enzima HPL en diferentes plantas, ocasionado por la

gran cantidad de clorofilas que impedía una buena detección de la enzima en electroforesis se implementó una metodología para la separación de clorofilas del extracto crudo.

8.4 Determinación de concentración de proteína por el método de Bradford

Para la determinación de proteínas primero se realizó una curva de calibración con albúmina bovina (BSA) a una concentración de 0.5 mg/mL, a partir de esta se prepararon una serie de diluciones con diferentes concentraciones (0.005-0.025 mg/mL). De cada dilución se tomaron 100 μ L que se mezclaron con 1.0 mL del reactivo de Bradford y después de 5 minutos a la oscuridad se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (espectrofotómetro SPECTRONIC® 20 GENESYS™). Con los datos obtenidos se realizó una curva de calibración graficando concentración de proteína contra absorbancia (tabla 8).

Tabla 8. Curva estándar para la concentración de proteína a 595 nm.

Muestra	Estándar (0.5 mg/mL) μ L	Agua destilada μ L	Reactivo de Bradford μ L	Concentración de proteína (mg BSA/mL)	Absorbancia
Blanco	0	100	1000	0.00	0.000
1	10	90	1000	0.005	0.125
2	20	80	1000	0.010	0.238
3	30	70	1000	0.015	0.343
4	40	60	1000	0.020	0.502

Posteriormente se determinó la concentración de proteína de las muestras, para esto se agregaron 100 μ L de cada muestra y 1.0 mL del reactivo de Bradford en celdas de plástico, se mezclaron y se dejaron reposar por 5 minutos a la oscuridad. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Con los datos de absorbancia obtenidos se realizaron las interpolaciones correspondientes para conocer la concentración de proteína de las muestras.

8.5 Actividad enzimática

La actividad enzimática se obtuvo con la lectura de pérdida de absorbancia a una longitud de onda de 234 nm con respecto al tiempo (minutos), se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible modelo UV765 (HINOTEK). La actividad enzimática pudo ser leída, debido a la escisión de los 13-hidroperóxidos (13-HPOD o 13-HPOT) que son los sustratos de la

enzima HPL. La reacción se llevó a cabo con 3.0 mL de mezcla que contenía: 10 μ L de 13-HPOT (10 mM y 24 mM), 5 μ L de la solución que contenía la enzima HPL y 2985 μ L de buffer fosfato de sodio 0.01 M (pH=6). Se utilizó un blanco el cual no contenía los hidroperóxidos. Se define una unidad enzimática como, la cantidad de enzima que se necesitó para catalizar la ruptura de 1 μ mol de 13-hidroperóxidos (13-HPOD o 13-HPOT) por minuto.

Fórmula para calcular la actividad total de la enzima

$$\text{Actividad} = \frac{\frac{m}{\epsilon \cdot b} \cdot \text{volumen de reacción}}{\text{volumen de extracto que contenía la enzima}}$$

m= pendiente (absorbancia vs tiempo (min))

volumen de reacción = 3.0 mL

ϵ = coeficiente de extinción molar, $\epsilon=25000 \frac{M^{-1}}{cm^{-1}}$

volumen de extracto que contenía la enzima = 0.005 mL

8.6 Precipitación con sulfato de amonio

Se midió el volumen del extracto crudo para conocer la cantidad de sulfato de amonio necesaria para alcanzar una saturación del 50% (ver Anexo 2). Al extracto crudo se le fue agregando la sal lentamente en pequeñas proporciones durante un periodo de una hora durante la cual se mantuvo en agitación. Después la mezcla se mantuvo en agitación durante otros 105 minutos a 4°C. Pasado este tiempo la mezcla se colocó en un embudo de separación dejándose reposar durante 12 horas a 4°C, después se separó la fase inferior que contenía la enzima HPL y se eliminó la fase superior porque contenía lípidos. La fase inferior se centrifugó a 5100 rpm durante 15 min a 4°C, eliminándose nuevamente la fase superior que contenía lípidos. La fase inferior se dializó en un buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 8.5 diluido 3 veces) durante 60 horas, se utilizó una membrana de diálisis de celulosa (33 mm anchura plana, MW09511). El dializado que contenía la enzima se almacenó a 4°C para su uso posterior.

8.7 Purificación

8.7.1 Preparación de la resina

Para la preparación de la resina TOYOPEARL DEAE-650M, se siguieron los siguientes pasos:

Primero se calculó el volumen de resina utilizado de acuerdo a la siguiente ecuación:

Fórmula para calcular el volumen de resina

$$V = \Pi * r^2 * l$$

r = radio de la columna = 0.75 cm

l = longitud de la columna = 12.4 cm

V = 21.9 mL + 20% de exceso = 26.4 mL de resina TOYOPEARL DEAE-650M

La ecuación involucra las características de la columna (tabla 9) para poder calcular el volumen necesario de resina más un 20% de exceso de la misma.

Tabla 9. Características de la columna MT20 (BIORAD).

	MT20
Volumen de la columna (mL)	21.9
Dimensiones de la columna (mm)	15x124
Máxima operación de presión (psi)	500

Segundo, el frasco se agitó vigorosamente para su homogenización, posteriormente se midieron 35.04 mL de suspensión de resina TOYOPEARL DEAE-650M, tomando en cuenta que 4 volúmenes de la suspensión son iguales a 3 volúmenes de resina.

Tercero, la suspensión se vació en un vaso de precipitados y se le adicionaron 4 volúmenes de agua destilada (Fig. 13). Después se agitó vigorosamente con una varilla de vidrio durante 3 minutos y se dejó reposar durante 40 minutos. El tiempo de reposo determina el tamaño de partícula que se quiere obtener (para la obtención de una partícula de tamaño fino el tiempo de reposo debe ser de 30-45 minutos, TOYOPEARL Column Packing Manual).



Figura 13. Preparación de la resina.

Cuarto, una vez precipitada la resina se eliminó por decantación el sobrenadante el cual contenía partículas innecesarias. Los pasos dos y tres se realizaron dos veces más. Finalmente se realizó un cuarto lavado, para el cual se sustituyó el agua destilada por la solución tampón que se empleó para la primera etapa de purificación. Una vez preparada la resina se procedió a empacar la columna (Anexo 3).

8.8 Primera etapa de purificación

Para la realización de la primera etapa de purificación se siguieron los siguientes pasos: La columna empacada se equilibró durante 30 minutos con un buffer B (20 mM de Tris-HCl, pH 8.5) que se hizo pasar a una velocidad de 1.25 mL/min. Posteriormente se hicieron pasar 180 ml del extracto dializado previamente filtrado en filtros de nylon de 0.45 μm (SARTORIUS) a una velocidad de 1.25 mL/min. La enzima se eluyó con un buffer C (20 mM Tris-HCl, pH 8.5 + 0, 0.25, 1.00 y 1.25 M de NaCl) a una velocidad de 1.50 ml/min. Todas las soluciones se prepararon con agua destilada, degasificada (Sonicador SB-3200DTN ULTRASONIC CLEANER), y desionizada, (Deionizador MILLIPORE Simplicity Millipore, France). Para purificar la enzima se utilizó un sistema de cromatografía de intercambio iónico (BIOLOGIC LP CHROMATOGRAPHY SYSTEM, BIO-RAD) (Fig. 14), el cual cuenta con un colector automático (Fraction Collector 2110, BIO-RAD) que permite recuperar las fracciones eluidas.

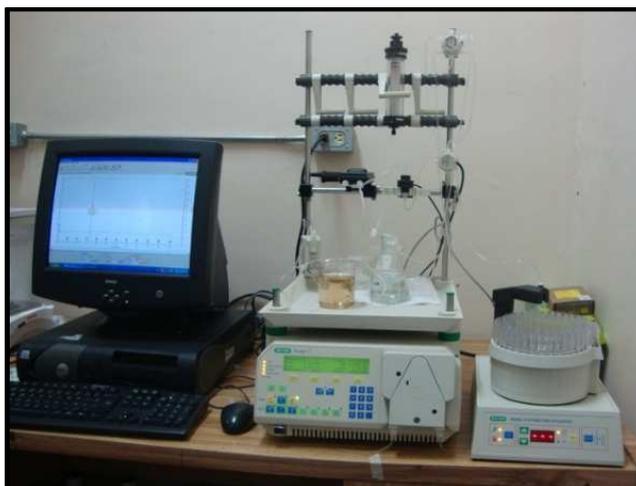


Figura 14. Sistema de cromatografía y colector de fracciones.

8.9 Electroforesis

Las fracciones eluidas fueron concentradas en tubos de centrifugación (3000 MWC, MILLIPORE) de 3 mL, se centrifugó (IEC HN-SII CENTRIFUGE INTERNATIONAL EQUIPMENT COMPANY USA) a 2000 rpm durante 4 horas aproximadamente. La concentración de la proteína se llevó a cabo a baja temperatura.

Por otro lado, 5 μ L del marcador (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, BIO RAD) (tabla 10) fueron mezclados con 475 μ L de tampón de almacenamiento del marcador (Anexo 4.1) y 25 μ L de β -mercaptoetanol.

Tabla 10. Proteínas contenidas en el estándar de pesos moleculares.

Proteínas	Peso molecular (Daltons)
Fosforilasa b	97400
Albúmina sérica	66200
Ovoalbúmina	45000
Anhidrasa carbónica	31000
Inhibidor de la tripsina	21800
Lisozima	14400

Se midieron 24 μL de la fracción eluida fueron mezclados con 6 μL de tampón de almacenamiento de muestra (Anexo 4.2). Las muestras y el marcador una vez preparados se calentaron a 95°C durante 5 minutos (Fig. 15) para desnaturalizarlos.



Figura 15. Desnaturalización de las muestras.

Se colocó el gel de electroforesis al 12% de poliacrilamida (BIO-RAD) dentro de la cámara de electroforesis, la cual se llenó con el tampón de corrida 1x (Anexo 4.3), se agregaron 20 μL de muestra y 10 μL de marcador. La electroforesis se realizó a 200 volts (V) y 0.05 Amperes durante 80 minutos (Fig. 16).

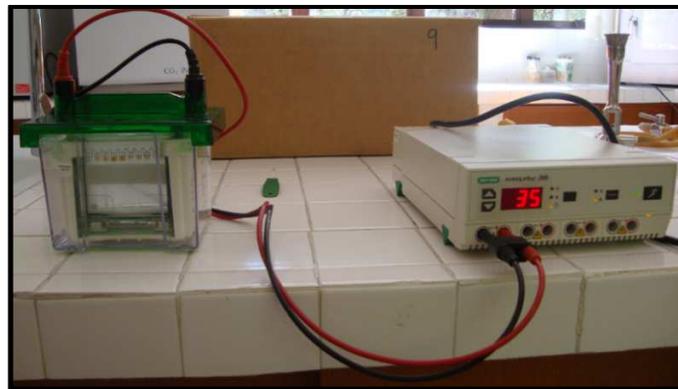


Figura 16. Equipo de electroforesis.

El gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie R-250 (Anexo 4.4) durante una hora y se destiñó con la solución decolorante (Anexo 4.5) durante un periodo de 16-24 horas, durante el periodo de tiempo se realizaron varios cambios de la solución decolorante.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Producción del sustrato para la enzima; el ácido 13(S)-hidroperóxi octadeca-9(Z),11(E)-dienoico (13-HPOD) y el ácido 13(S)-hidroperóxi octadeca-9(Z),11(E),15(Z)-trienoico (13-HPOT).

Cuando los hidroperóxidos fueron recuperados se realizó un barrido en el espectrofotómetro UV765 UV-Visible (HINOTEK) en un rango de longitud de onda de 200-400 nm para corroborar que los hidroperóxidos fueron sintetizados. En la figura 17 se puede observar un pico a una longitud de onda de 234 nm. En las referencias indican que los hidroperóxidos absorben a una longitud de onda de 234 nm (Gargouri, Drouet, Hervagault & Legoy, 1996). Se realizaron los cálculos correspondientes para conocer la concentración de los hidroperóxidos utilizando la ecuación de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot c \cdot b$), se empleó un coeficiente de extinción molar de $25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, los resultados de concentración de hidroperóxidos fueron: 25 y 48 mM para el 13-HPOD y 13-HPOT respectivamente.

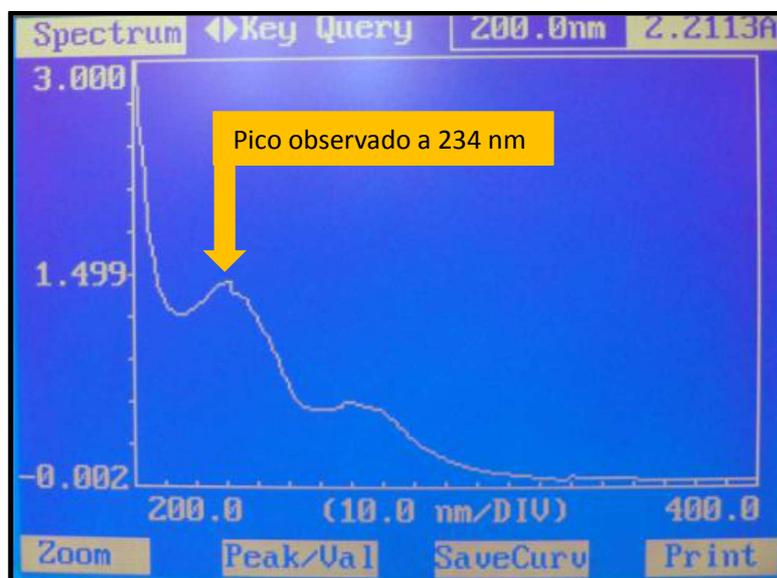


Figura 17. Barrido en el espectrofotómetro de 200-400 nm.

Se realizaron pruebas preliminares de actividad enzimática (datos no mostrados) en los extractos crudos del orégano utilizando ambos sustratos (13-HPOD, 13-HPOT) con la finalidad de utilizar el sustrato con el cual la enzima HPL obtuviera los valores más

elevados de actividad. Se encontró que la enzima HPL del orégano tiene una mayor actividad total con los hidroperóxidos provenientes del ácido linolénico (13-HPOT), por lo que en etapas posteriores se utilizó éste sustrato.

9.2 Extracción de la enzima HPL

El orégano (*Origanum vulgare L.*) empleado provino del municipio de Villa Tejúpam de la Unión, que cuenta con una extensión territorial de 71.45 km², colinda al oeste con Villa de Tamazulapam del Progreso a 40 minutos de la Heroica ciudad de Huajuapam de León.

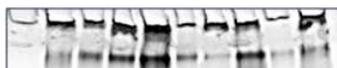


Figura 18. Orégano (*Origanum vulgare L.*)

Al orégano (*Origanum vulgare L.*) se le eliminó la materia extraña posteriormente se lavó y se secó (Fig. 18). Después se recuperaron las hojas, se pesaron 100 gramos y se licuaron en una licuadora marca Oster con 300 mL de buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0.

Mejora del método de extracción de la enzima hidroperóxido liasa

De acuerdo a las referencias utilizadas por Long *et al.*, (2010), Rabetafika *et al.*, (2008) y Suurmeijer *et al.*, (2000); en su proceso metodológico para la extracción de la enzima HPL utilizan como reactivos: Tritón X-100, EDTA, Cisteína, polivinilpirrolidona K-30 y buffer fosfato de sodio, HEPES o Tris-HCl. Este extracto lo utilizan directamente para la determinación de la concentración de proteína y determinación de la actividad enzimática. En pruebas preliminares de laboratorio de la Universidad Tecnológica de la Mixteca se siguió la metodología de los autores mencionados, obteniéndose como resultado que la



enzima no se podía detectar en electroforesis SDS-PAGE como se observa en la figura 19, debido a elevadas concentraciones de clorofila y aceites de las plantas que impedía que la muestra corriera en el gel.

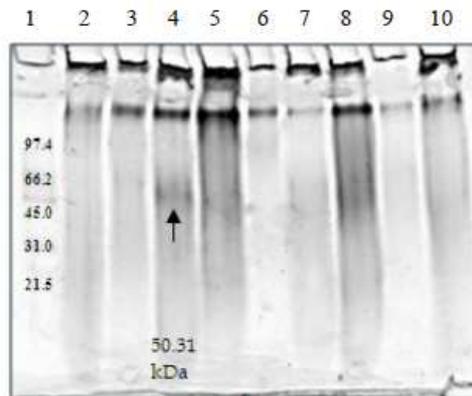


Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE de diferentes extractos de plantas. Carril: 1-marcador, 2-*Origanum vulgare L.*, 3-*Thymus vulgaris L.*, 4-*Palma ebraheadulcis*, 5-*Rorippa nasturtium-aquaticum (L.)*, 6-*Cymbopogon citratus (DC.)*, 7-*Crotalaria longirostrata(Leg)*, 8-*Heterothecainuloides Cass.*, 9-*Persea americana Mill.* 10-*Artemisia absinthium L.*

Debido a los antecedentes en este proyecto de tesis en primer lugar se tuvo que buscar la forma de eliminar estos compuestos, para lo cual se realizó una revisión bibliográfica de extracción de clorofilas (Nelson *et al.*, 2008; Goodwin & Mercer, 1983; Seymour, Taylor & Tucker, 1993) quedando el nuevo método de extracción de la siguiente manera:

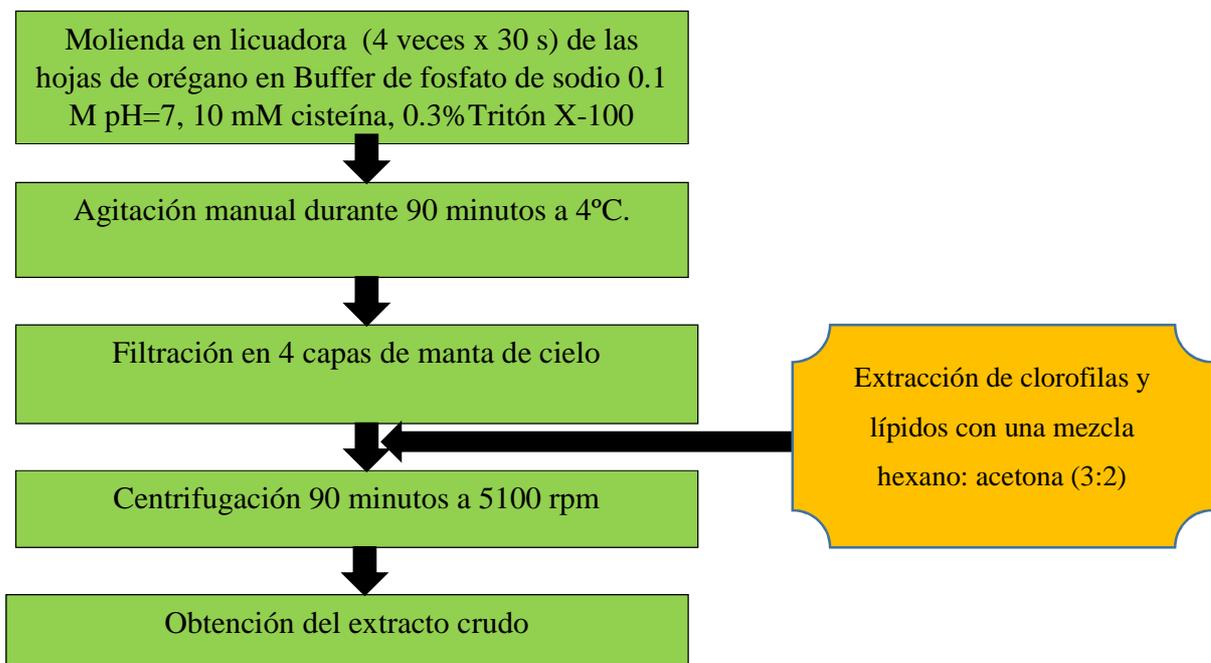


Figura 20. Diagrama para la obtención del extracto crudo.

Al realizar la extracción de clorofilas y lípidos con la mezcla de hexano acetona se obtuvo un volumen aproximado de 300 mL de extracto crudo de color café-verde intenso.

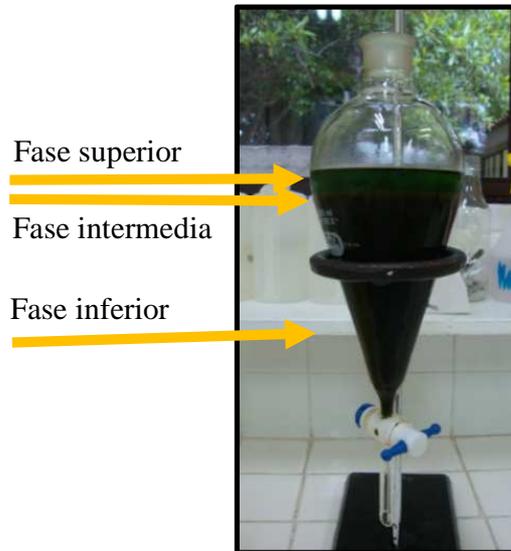


Figura 21. Extracción de clorofilas.

En la figura 21 se pueden apreciar tres fases, la parte superior contenía hexano y clorofilas, la parte del centro contenía hexano y acetona y la parte inferior correspondió al extracto crudo que contenía a la enzima hidropéroxido liasa. El extracto crudo tenía un olor de orégano y acetona, debido a que el extracto se disolvió en la acetona.

La mezcla de hexano-acetona se dejó reposar otras 24 horas en refrigeración para recuperar la mayor cantidad de la enzima. Una vez que se obtuvo el extracto crudo éste se centrifugó por 90 minutos a una velocidad de 5100 rpm. Como se puede observar en la figura 22, en el extracto crudo se obtuvo un precipitado de color verde intenso de consistencia pastosa, que posiblemente contenía restos celulares y clorofilas que no fueron extraídas con los disolventes. Al sobrenadante se le midió actividad enzimática y concentración de proteína.



Figura 22. Extracto crudo centrifugado durante 150 minutos.

En el trabajo de Evaluación de Los procesos de Extracción y Purificación de Los compuestos endulzantes de la hoja de *Stevia Rebaudiana* (Vanina & Toselli, 2008), mencionan que el extracto obtenido de las hojas de Stevia; es una solución oscura que contiene los principios endulzantes, con una serie de partículas como **clorofila**, lípidos y taninos, que le confieren un color y un aroma no deseado para su uso como edulcorante, por lo que fue necesaria la eliminación del color del extracto. En Algunos procesos previamente remueven la grasa de las hojas utilizando solventes como cloroformo o **hexano** y con estos disolventes se realiza la eliminación preliminar de aceites esenciales, clorofila y otras partículas apolares. (Tanaka *et al.*, 1982; Kinghorn *et al.*, 1982). Con base a esta información se empleó el hexano como disolvente para extraer clorofilas y lípidos del extracto crudo obtenido del orégano.

Nelson *et al.*, 2008; Goodwin *et al.*, 1983; Seymour *et al.*, 1993 mencionan que para la extracción de estos compuestos químicos en plantas y frutas emplearon una mezcla de disolventes orgánicos (hexano:acetona, 3:2). Por cada gramo de fruto u hojas se añadieron 2 mL de esta mezcla. Todo esto se realizó en tubos tapados para que se pudieran mezclar bien los disolventes, y se agitaron vigorosamente para que los pigmentos se extrajeran, finalmente se centrifugan durante 5 minutos a 4000 rpm. Para este estudio se tomó esta referencia modificando la cantidad de la mezcla agregada al extracto, la cual fue de 1:1.

El método de extracción utilizado es líquido-líquido o llamada extracción con disolventes; que consiste en la separación de los constituyentes de una mezcla líquida por contacto con otro líquido inmiscible (parcial o totalmente inmiscible). Si los componentes de la mezcla

original se distribuyen de forma diferenciada entre las dos fases líquidas, se produce un cierto grado de separación, que puede acentuarse por la combinación de etapas múltiples. Este método de extracción de clorofilas y lípidos del extracto bruto que contenía la HPL fue adecuado, pues si se utilizaban métodos con introducción de calor la enzima se podía inactivar la enzima.

Entre otros puntos puede mencionarse que, la acetona es un disolvente de bajo peso molecular, que posee cierta polaridad, afín a los compuestos polares y parte de la estructura no polar semejante a los compuestos no polares. De esta forma la acetona puede disolver gran cantidad de sustancias de polaridad intermedia. Al agregar acetona a una solución con proteínas, disminuye la constante dieléctrica del disolvente, desplaza también algunas de las moléculas de agua asociadas con la proteína y reduce la concentración de agua en la solución. Estos efectos tienden a disminuir la solubilidad de la proteína y provocan precipitación de proteínas (Garrido, & Teijón, 2006).

Por otro lado, en un estudio titulado “Conformación de la estructura secundaria de la hidroperóxido liasa del pimiento verde clonado en *Yarrowia lipolytica*, y su actividad en distintos medios selectivos” (Santiago-Gómez, Kermasha, Nicaud, Belin, & Husson, 2008), se realizaron estudios de la actividad empleando 1% de diferentes disolventes orgánicos como: iso-octano, hexano, diclorometano, octano, tolueno y cloroformo, encontrando que la actividad enzimática con iso-octano y hexano aumentó en 49-48%, con respecto a la muestra que no contenía estos solventes. En este estudio, la mayor parte del hexano se eliminó, los restos pudieron haber favorecido la actividad enzimática HPL.

Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína.

Para determinar la concentración de proteína en las diferentes muestras, se empleó el método de Bradford. Se obtuvo la curva de calibración empleando diferentes concentraciones de BSA. Se graficó la absorbancia contra la concentración, se realizó un ajuste lineal y se obtuvo la ecuación de la recta con la que se calculó la concentración de proteína (Fig. 23).

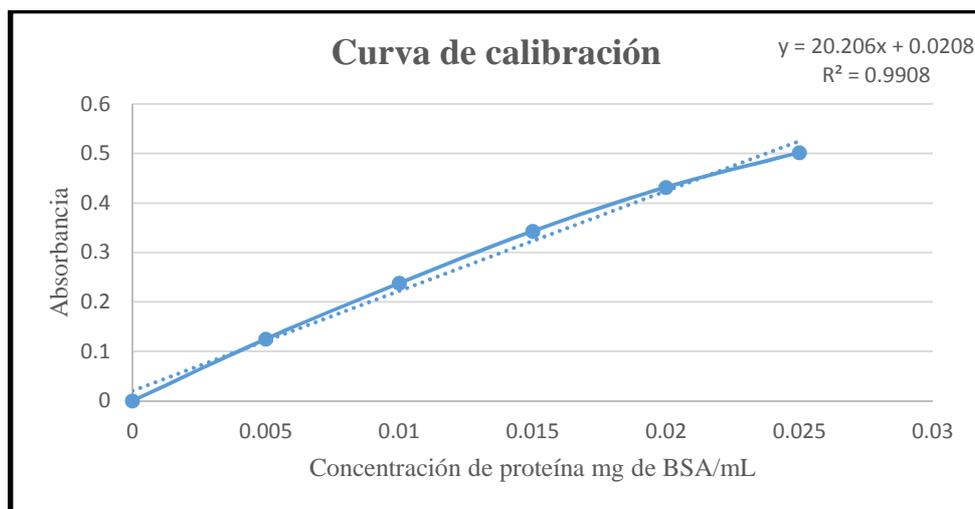


Figura 23. Curva de calibración de proteína.

Concentración de proteína y actividad total de la enzima HPL.

La concentración de proteínas encontrada en el extracto crudo con tritón X-100R fue de 54.99 mg y en el extracto crudo sin tritón fue de 58.57 mg. Los datos de concentración de proteína de diferentes extractos crudos son: guayaba 1111 mg (Tijet *et al.*, 2000), tomate 734.88 mg (Suurmeijer *et al.*, 2000), cotiledones de girasol 555 mg (Itoh *et al.*, 1999), hojas de amaranto tricolor 312 mg (Long *et al.*, 2010) y pimiento verde 213.22 mg (Husson *et al.*, 2002). Comparando la cantidad de proteína que contiene el extracto crudo de orégano con los obtenidos en las referencias es el de menor concentración.

Después de conocer la concentración de proteína contenida en el extracto crudo, se realizaron las lecturas de la actividad total de la enzima de los extractos con y sin tritón X-100R, utilizando dos concentraciones de sustrato 10 y 24 mM. En las tablas 11 y 12 se muestran los valores obtenidos de la actividad total.

Tabla 11. Concentración de proteína y actividad total en el extracto crudo con y sin tritón X-100R, utilizando 10 mM de sustrato.

Muestra	Actividad total (U)	Concentración de proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo con tritón	306.28 ± 12.86	54.99 ± 4.31	5.57 ± 0.44
Extracto crudo sin tritón	555.28 ± 44.42	58.57 ± 3.27	9.48 ± 0.85

Tabla 12. Concentración de proteína y actividad total en el extracto crudo con y sin tritón X-100R, utilizando 24 mM de sustrato.

Muestra	Actividad total (U)	Concentración de proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo con tritón	1899.67 ± 169.23	54.99 ± 4.31	34.54 ± 3.40
Extracto crudo sin tritón	1448.46 ± 140.80	58.57 ± 3.27	24.73 ± 2.43

En la mayoría de las referencias han utilizado una concentración de 10 mM de hidroperóxidos para calcular la actividad total de la enzima. Como se observa en la tabla 11, la actividad total del orégano utilizando 10 mM del sustrato fue de 306.28 U y 555.28 U con y sin tritón x-100 respectivamente. Comparando este resultado con los obtenidos en los extractos crudos de la guayaba con 10,302.39 U (Tijet *et al.*, 2000), pimiento verde con 1,232.41 (Husson *et al.*, 2002), tomate con 323.35 U (Suurmeijer *et al.*, 2000) hojas de amaranto tricolor con 285 U (Long *et al.*, 2010) y cotiledones de girasol con 269.16 U (Itoh *et al.*, 1999), se observa que la actividad HPL del orégano se encuentra dentro de las plantas con mayor actividad.

Actividad específica de la enzima HPL

En la tabla 13 se puede observar un resumen de la actividad específica de la HPL obtenida en otros extractos. En las hojas de orégano la actividad específica encontrada con tritón X-100R fue de 5.57 (U/mg), teniendo un valor más bajo al reportado en la guayaba con 9.28 (U/mg), (Tijet *et al.*, 2000). Pero se obtuvo una mayor actividad específica de 9.48 U/mg cuando el extracto no contenía tritón X-100R.

Tabla 13. Resumen de actividad específica de diferentes extractos crudos.

Extractos crudos	Actividad específica (U/mg) con 10 mM de 13-HPOT	Actividad específica (U/mg), con 24 mM de 13-HPOT
Hojas de orégano (con tritón)	5.57	34.54
Hojas de orégano (sin tritón)	9.48	24.73
Long <i>et al.</i> , (2010), hojas de amaranto tricolor	0.9	
Tijet <i>et al.</i> , (2000) guayaba	9.28	
Itoh <i>et al.</i> , (1999) cotiledones de girasol	0.48	

Por otro lado, se realizaron mediciones de actividad enzimática empleando una concentración de 24 mM de 13-HPOT. En este caso se obtuvo la mayor actividad específica HPL en el extracto crudo con tritón X-100R (34.54 U/mg) que en el extracto sin tritón X-100 (24.73 U/mg). En estudios anteriores reportan que la actividad enzimática de hidroperóxido liasa disminuye aproximadamente un 50% debido a la eliminación de tritón X-100R. Anteriormente, también se observó que la actividad de la hidroperóxido liasa y de la óxido aleno sintasa en extractos crudos aumentó aproximadamente dos veces por la adición de Tritón X-100 u otros detergentes tales como polivinilpirrolidona o de Emulgen no iónico 911 (Song, & Brash, 1991; Gardner, Weisleder, & Plattner, 1991; Matsui, Toyota, Kajiwara, Kakuno, & Hatanaka, 1991).

También en un estudio de cinética enzimática de la hidroperóxido liasa de la cebada modulados por sales y detergentes (Koeduka, Stumpe, Matsui, Kajiwara, & Feussner, 2003), obtuvieron que la adición de Tritón X-100 y Brij 99 mejoran la actividad, casi tres veces más de actividad que sin la adición de estos detergentes; le siguen los detergentes Tween 80 y Nonidet P-40 y como último lugar el Tween 20 mostró la capacidad más baja para mejorar la actividad HPL. Con la información obtenida en este estudio podemos corroborar que el tritón X-100 favorece la actividad enzimática HPL aumentándola en un 39% cuando se utiliza una concentración de hidroperóxidos de 24 mM.

9.3 Precipitación con sulfato de amonio

Al precipitar la proteína con sulfato de amonio se obtuvieron 2 fases (Fig. 24); la parte superior de color café intenso contenía restos celulares y lípidos, mientras que la fase inferior era de un color ligeramente café y transparente.



Figura 24. Fases del saturado.

Se realizó la medición de actividad enzimática en las 2 fases y se encontró actividad en la fase transparente. Esta fase se centrifugó (Fig. 25) nuevamente para eliminar residuos y los restos lipídicos que quedaron en la superficie.



Figura 25. Extracto saturado y centrifugado.

Debido a los grupos ácidos y básicos de los aminoácidos que componen una proteína su solubilidad depende de las concentraciones de las sales disueltas, la polaridad del solvente, el pH y la temperatura. En esta etapa se utilizó el método de: **precipitación salina de proteínas o *salting out*** (reducción de la solubilidad por sales), que es una técnica en donde se logra la precipitación de una fracción de proteínas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio. Al agregar grandes cantidades de sal a la solución que contiene las proteínas, se disminuye la interacción proteína-agua porque quita la capa de solvatación. Es

sobre todo resultado de la competencia por las moléculas de solvatación entre los iones salinos agregados y los otros solutos disueltos (proteínas). Por lo tanto predomina la interacción proteína-proteína y genera la precipitación de las mismas (Voet, & Voet, 2006).

Comúnmente se usa sulfato de amonio para este fin a causa de su gran solubilidad (760 g /1000 mL de agua), porque el ion sulfato divalente permite alcanzar altas fuerzas iónicas. La adición de esta sal permite el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, estabilizan sus estructuras nativas de manera que la precipitación no desnatura a las proteínas pero si las precipita. De esta manera puede lograrse una purificación y una concentración significativa de grandes cantidades de proteína deseada. El *salting out* con frecuencia es el paso inicial en los protocolos de purificación proteínica.

Como se había mencionado en el apartado anterior, la adición de un disolvente orgánico, como acetona a una solución de proteína disminuye la constante dieléctrica del disolvente, desplaza también algunas de las moléculas de agua asociadas con la proteína y reduce la concentración de agua en la solución. Estos efectos tienden a disminuir la solubilidad de la proteína y por ello se utiliza la adición de estos disolventes para precipitar proteínas de soluciones. El utilizar solventes orgánicos como la acetona, para precipitar proteínas suele llevarse a cabo cerca de 0°C, ya que a temperaturas más elevadas tienden a desnaturar a las proteínas. La reducción de la constante dieléctrica por los solventes orgánicos, también aumentan las diferencias entre proteínas respecto de su comportamiento de *salting out*, por lo que ambas técnicas pueden combinarse con eficacia como menciona Voet *et al.*, (2006). Y en efecto en los experimentos llevados a cabo en este estudio se implementó esta técnica complementaria.

En las tablas 14 y 15 se muestran los datos más relevantes de actividad y concentración de proteína del precipitado.

Tabla 14. Actividad y concentración de proteína del precipitado con y sin tritón X-100R, utilizando 10 mM de sustrato.

Muestra	Actividad total (U)	Concentración de proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Precipitado con tritón	156.20±12.49	4.66±0.49	33.53±4.35	6.02	51.00
Precipitado sin tritón	442.88±26.76	3.92±0.05	113.05±6.78	11.92	79.76

Tabla 15. Actividad y concentración de proteína del precipitado con y sin tritón X-100R, utilizando 24 mM de sustrato.

Muestra	Actividad total (U)	Concentración de proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Precipitado con tritón	382.11±17.23	4.66±0.49	82.01±9.6	2.37	20.11
Precipitado sin tritón	1180.70±90.67	3.92±0.05	301.3±21.0	12.18	81.51

Concentración de proteína

La concentración de proteína disminuyó ya que inicialmente en el extracto crudo que contenía tritón X-100R se tenían 54.99 mg de proteína (tabla 11) y después de precipitarse se obtuvieron 4.66 mg de proteína, teniendo un rendimiento del 8.47%. Por otro lado en el extracto que no contenía tritón X-100R, en un inicio se tenía 58.57 mg de proteína y después de precipitarse fue de 3.92 mg, obteniendo un rendimiento del 6.69 %.

Los valores reportados de concentración de proteína, para la guayaba fueron de 762 mg (Tijet *et al.*, 2000), el tomate fue de 315.58 mg (Suurmeijer *et al.*, 2000), las hojas de amaranto tricolor fue de 130 mg (Long *et al.*, 2010) y de cotiledones de girasol de 69.3 mg (Itoh *et al.*, 1999). Como se puede observar, la concentración de proteína extraída del orégano en la etapa de precipitación fue la más pequeña con 4.66 y 3.92 mg respectivamente.

Actividad total y específica

La actividad enzimática con 10 mM de sustrato fue de 156.20 y 442.88 U en los precipitados con y sin tritón X-100R respectivamente. Esto no concuerda con las observaciones de Song *et al.*, 1991 y Gardner *et al.*, 1991, donde mencionan que aumenta la actividad de la HPL en un 100% en presencia de tritón. En este estudio la actividad HPL aumentó 2.3 veces cuando no se agregó tritón.

Como era de esperarse, a medida que avanzan las pre-etapas de purificación la actividad específica aumenta, en el extracto crudo que contenía tritón X-100R se tenía una actividad específica 5.57 (U/mg) y en el precipitado 33.53 (U/mg) obteniendo 6.02 veces de purificación. Con el extracto crudo sin tritón X-100R se tenía una actividad específica de 9.48 (U/mg) y ahora de 113.05 (U/mg) obteniendo un valor de 11.92 veces de purificación.

Cuando la actividad enzimática de la HPL se determinó con una concentración de 24 mM de sustrato, los valores obtenidos fueron 82.01 y 301.3U en los precipitados con y sin Tritón X-100R respectivamente, con esta concentración de sustrato la actividad total del precipitado con tritón X-100R aumentó 2.7 veces con respecto al que no lo contenía.

Efecto del detergente en la actividad

El tritón X-100 es catalogado como un detergente no iónico y no desnaturizante, que tiene cabezas polares rígidas y voluminosas que no penetran en las proteínas solubles en agua, como consecuencia, no llega a romper interacciones nativas y estructura de las proteínas solubles en agua y no tienen propiedades de unión con ella. El principal efecto de detergentes no desnaturizantes es asociarse con las partes hidrófobas de las proteínas de membrana confiriendo de este modo miscibilidad a ellos. Posiblemente debido a la estructura nativa de la HPL del orégano no se dé adecuadamente una interacción de las partes hidrófobas con el detergente por lo que se ve desfavorecida la actividad HPL cuando éste se encuentra presente.

9.4 Purificación

El precipitado de la HPL una vez dializado se filtró para la eliminación de partículas suspendidas y de esta forma se evitó la obstrucción de la resina que se utilizó para la purificación.



Figura 26. Columna empacada.

Antes de iniciar la purificación fue necesario purgar todo el sistema cromatográfico de intercambio iónico para su buen funcionamiento (Fig. 26). En la metodología planteada se propuso trabajar con un flujo volumétrico mínimo de 2.5 mL de extracto por minuto sin embargo al introducir la muestra con este flujo la columna no operó correctamente por lo que fue necesario emplear un flujo menor. Se realizaron varias pruebas y el flujo volumétrico adecuado fue de 1.25 mL/min de la muestra y 1.50 mL/min para los buffers de calibrado y de elución. Los pasos empleados en el equipo de cromatografía BIOLOGIC LP CHROMATOGRAPHY SYSTEM se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Programa empleado en el equipo BIOLOGIC LP CHROMATOGRAPHY SYSTEM

Pasos	Velocidad (mL/min)	Volumen (mL)
1. Equilibrio de la resina: buffer 20 mM Tris-HCl pH = 8.5	1.25	60
2. Introducción de la muestra: extracto dializado	1.25	180
3a. Elución: buffer 20 mM Tris-HCl pH = 8.5	1.50	12
3b. Elución: buffer 20 mM Tris-HCl pH = 8.5 + 0.25 M NaCl	1.50	25.5
3c. Elución: buffer 20 mM Tris-HCl pH = 8.5 + 1.00 M NaCl	1.50	90
3d. Elución: buffer 20 mM Tris-HCl pH = 8.5 + 1.25 M NaCl	1.50	60
Tiempo total = 317 min		

*Para la muestra que no contenía tritón X-100R no se realizó la elución 3d, * *Toda la fracción se recolectó cada 5 minutos.

En la figura 27 se muestra el cromatograma ilustrado por el software LP Data View v1.03 obtenido durante la purificación de la HPL del orégano.

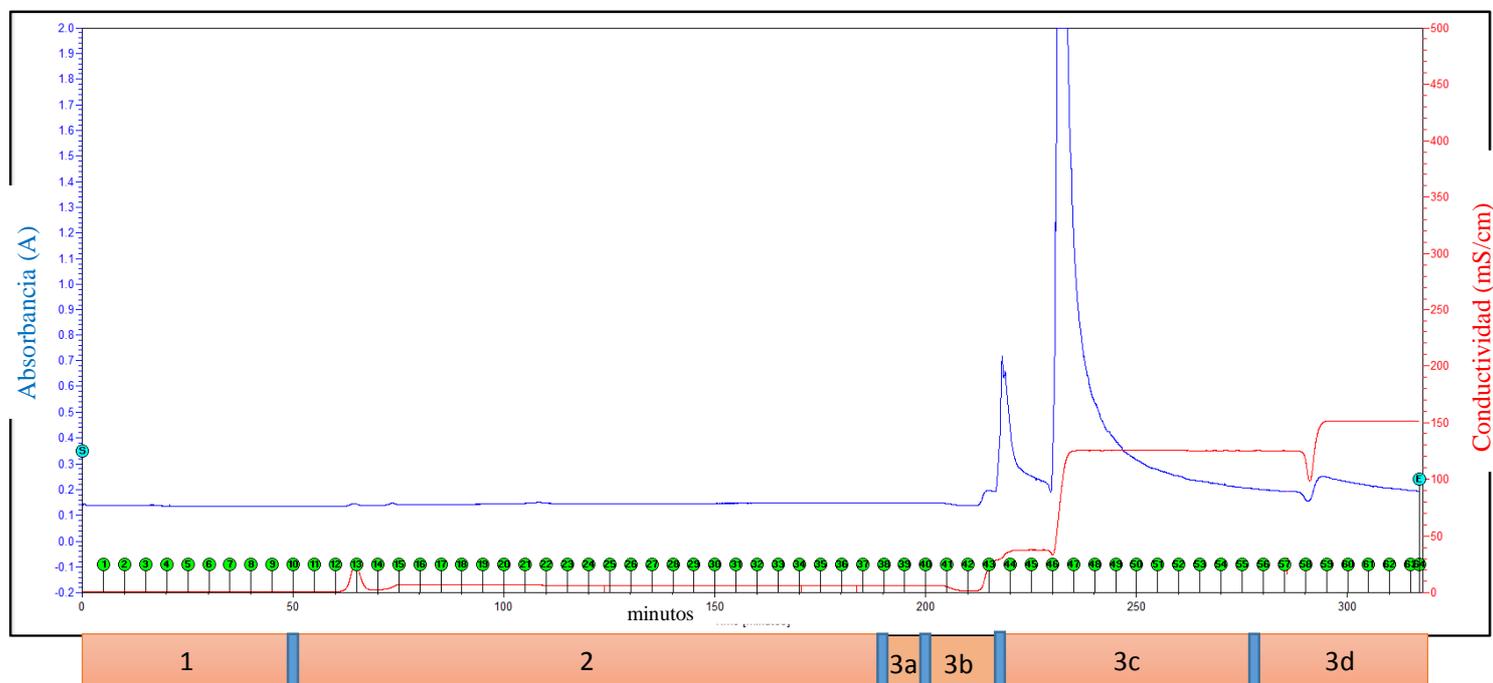


Figura 27. Cromatograma de purificación

En la primera etapa de purificación se empleó un intercambiador aniónico, debido a que la resina DEAE (fase estacionaria) posee carga positiva y la enzima HPL tiene una carga neta negativa. La cromatografía de intercambio iónico separa las moléculas en base a su carga iónica neta. La separación se lleva a cabo por la competencia entre proteínas con diferente carga superficial por grupos cargados opuestamente sobre un adsorbente (resina) de intercambio iónico. La cromatografía de intercambio iónico, es una de las técnicas más utilizadas de purificación de proteínas (Mayolo-Deloisa, Martínez & Rito-Palomares, 2012).

La fase estacionaria: La elección de una matriz de intercambio iónico adecuada es probablemente uno de los aspectos más importantes y debe estar basada en diversos factores, que incluyen:

1. La fuerza del intercambiador de iones: existen dos clasificaciones de intercambiadores de iones, fuertes y débiles; la resina de dietilaminoetil (DEAE) es un intercambiador débil, y es más flexible en términos de selectividad. Son comúnmente elegidos para la separación de proteínas que retienen su funcionalidad sobre un rango de pH de 6 a 9 y el valor de la carga de los iones, así los iones divalentes tienen más afinidad por la resina que los iones monovalentes (Roca, Oliver & Rodríguez, 2003; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012)

2. El flujo y/o volumen de la muestra: el volumen en el que está distribuida la carga es lo que determina la capacidad de entrar en la resina (Roca *et al.*, 2003; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012). El volumen utilizado para equilibrar la resina DEAE fue de 60 mL con una velocidad de entrada de 1.25 mL/min para dar suficiente tiempo de que la resina y el buffer entrarán en equilibrio. La velocidad de flujo volumétrico empleado para la purificación con DEAE fueron: en la guayaba de 3.00 mL/min (Tijet *et al.*, 2000), en las hojas de amaranto tricolor de 2.5 mL/min (Long *et al.*, 2010) y en el tomate de 0.75 mL/min (Suurmeijer *et al.*, 2000), y en el caso de las hojas de orégano se emplearon dos flujos volumétricos de 1.25 y 1.50 mL/min, el primero fue para equilibrar la resina y colocar la muestra y el segundo para la fase eluyente obteniendo así un flujo intermedio de velocidades utilizadas para este tipo de resinas.

3. Las concentraciones de los iones: a concentraciones altas un ion de baja afinidad es capaz de desplazar a un ion en baja concentración pero con alta afinidad a la resina. Para la primera etapa de purificación de la HPL del orégano se empleó 20 mM de Tris-HCl, pH=8.5 con 0, 0.25, 1.00 y 1.25 M de NaCl, empleando un gradiente de sal. Para el amaranto tricolor (Long *et al.*, 2010) el buffer empleado fue, buffer 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) que contenía 1.00 mM de DTT y 0.5% (v/v) tritón X-100 con 0, 0.25 y 1.00 de NaCl; en la guayaba (Tijet *et al.*, 2000) se empleó buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.5 que contenía 0.1% tritón X-100R, con un gradiente de elución de 0–100% 1.00 M de NaCl y finalmente en el tomate (Suurmeijer *et al.*, 2000) se empleó un buffer 20 mM Tris/HCl pH 8.5, que contenía 0.1% (w/v) tritón X-100 y 0.01 M β -mercaptoetanol con un gradiente de 0-300 mM de KCl. Finalmente como se puede observar el buffer empleado siempre es el mismo,

a la misma concentración y pH, solo cambia la sal empleada pero de manera general se usa NaCl, y lo que cambia es la presencia o ausencia de los detergentes.

Fase móvil: como regla general el pH del buffer de la fase móvil debe ser entre el punto isoeléctrico (pI) de la molécula cargada y el pKa del grupo cargado en el soporte sólido (Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012). El pKa de la resina dietilaminoetil (DEAE) es de 8.7 en cambio el pI de la enzima HPL del orégano no fue determinado, pero con referencias de pI de HPL encontradas (tabla 17), para las hojas de amaranto tricolor de 5.4 (Long *et al.*, 2010) y el de pimiento verde el pI es 8.3 (Shibata *et al.*, 1995). Finalmente el buffer empleado en la fase móvil fue 20 mM Tris-HCl, pH=8.5 cumpliendo las recomendaciones del pH de la fase móvil.

Tabla 17. pI de la HPL extraída de diferentes fuentes

Fuente	pI
Pimiento verde (Shibata <i>et al.</i> , 1995)	8.3
Hojas de amaranto tricolor (Long <i>et al.</i> , 2010)	5.4
Guayaba (Tijet <i>et al.</i> , 2000)	6.8
Alfalfa (Noordermeer <i>et al.</i> , 2001)	8.1
Semilla de guisante (Hornostaj <i>et al.</i> , 2000)	5.2-5.4

El control de los factores mencionados hace selectivas las separaciones de proteínas por intercambio iónico. La elución puede realizarse, cambiando la concentración de los iones y también cambiando el pH, porque la mayoría de biomoléculas son ácidos y bases débiles por lo que pequeños cambios de pH pueden provocar la pérdida de la carga que las mantiene retenidas a la columna. Así por ejemplo, los aminoácidos pueden separarse por cromatografía de intercambio iónico porque presentan grupos con pK diferentes (en el cual su carga depende del pH), lo que permite al realizar una elución utilizando un gradiente de pH de la fase móvil.

De manera general el mecanismo por el que se produce la separación cromatográfica se puede describir como sigue: en una columna de intercambio iónico activada (con un eluyente que mantiene los grupos de la columna cargados), se hace pasar una mezcla de compuestos con diferentes cargas; los diferentes compuestos quedan retenidos con mayor o menor fuerza dependiendo de las interacciones que se establezcan con la resina. Los

compuestos retenidos en una columna pueden eluirse, bien aumentando la fuerza iónica del medio o bien cambiando el pH de la dilución o utilizando ambos. La columna se regenera pasando contraiones que eliminen las interacciones de los iones unidos a la resina con ésta, dejándola preparada para la siguiente separación, se sabe que la resina DEAE se puede regenerar, solo dándole el mantenimiento adecuado después de cada purificación (Roca *et al.*, 2003).

En las tablas 18 y 19 se muestra un resumen de los valores A.U. y conductividad de los picos mostrados en el cromatograma, así como los tiempos de las fracciones eluidas.

Tabla 18. Resumen de los datos observados en el cromatograma. Purificación de la muestra con tritón X-100R.

Muestra	A.U.	Conductividad (mS/cm)	Tiempo de elución(min)
Primer pico	0.7068	31.26	218.50
Segundo pico	2.5000	61.71-115.94	231.57-233.25
Tercer pico	0.2196	149.67	294.32

Empleando cromatografía de intercambio iónico con el precipitado que contenía tritón X-100R (tabla 18), se obtuvieron tres fracciones con proteína, la primera eluyó con una concentración de 0.25 M de NaCl siendo la proteína cargada más débil de las tres, la segunda con una concentración de 1.00 M de NaCl, en esta fracción se eluyó la enzima HPL como también se observó en las hojas de amaranto tricolor (Long *et al.*, 2010) y finalmente con una concentración de 1.25 M de NaCl para la proteína con la carga negativa más alta.

La fracción eluida que contenía la enzima HPL con tritón X-100R mostró una absorbancia de 2.50 a una longitud de onda de 280 nm y una conductividad inicial de 61.71 mS/cm y conductividad final de 115.94 mS/cm durante un tiempo de 1 minuto con 41 segundos (M1), debido al aumento de sales disueltas en la columna por el cambio de buffer de Tris-HCl pH=8.5 con 1.00 M de NaCl los iones Cl⁻ desplazaron a la enzima HPL de la columna de DEAE y la enzima eluyó.

Se realizaron las mediciones de concentración de proteína empleando el método de Bradford para las tres proteínas eluidas, pero solo en la segunda fracción eluida (fracción de HPL) se registró absorbancia a 595 nm.

Tabla 19. Resumen de los datos observados en el cromatograma. Purificación de la muestra sin tritón X-100R.

Muestra	A.U.	Conductividad (mS/cm)	Tiempo de elución (min)
Primer pico	0.8134	28.36	200.97
Segundo pico	2.5000	56.90-87.50	230.97-233.97

Para el precipitado que no contenía tritón X-100R (tabla 19), no se empleó la concentración de 20 mM de Tris-HCl a pH=8.5 con 1.25 M de NaCl para la fase móvil, esto ocasionó que solo dos proteínas fueran eluidas; la primera eluyó con una concentración de 0.25 M de NaCl lo que indica su débil interacción con la columna DEAE y la otra eluyó con 1.00 M de NaCl donde se encontró a la enzima HPL, observando el mismo comportamiento que las muestras con tritón X-100R. La enzima HPL que no tenía tritón X-100R eluyó con una absorbancia de 2.50 a una longitud de onda de 280 nm, como se observó para la muestra que contenía tritón X-100R, con una conductividad inicial de 56.90 y una conductividad final de 87.50 mS/cm durante un tiempo de 3 minutos.

Empleando cromatografía de intercambio iónico, a la fracción eluida se le midió la concentración de proteína eluida y la actividad total empleando 10 mM de sustrato (tabla 20).

Tabla 20. Actividad y concentración de proteína de las fracciones eluidas con y sin tritón X-100R, utilizando 10 mM de sustrato.

Muestra	Actividad total (U)	Concentración de proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Fracción eluida (con tritón X-100R)	12.42 ±0.67	0.00475±0.0003	2614.7 ±209.117	469	4.05
Fracción eluida (sin tritón X-100R)	10.41 ±0.55	0.00715±0.0004	1455.9 ±110.64	153	1.87

La concentración de proteína en la fracción eluida con y sin tritón X-100R fue de 4.75×10^{-3} mg y 7.15×10^{-3} mg de proteína respectivamente. Teniendo un rendimiento menor del 0.1% con respecto a la concentración de proteína del extracto crudo para las dos muestras. La actividad total disminuyó, teniendo en la fracción eluida con tritón X-100R 12.42 U y sin tritón X-100R 10.41 U.

La enzima HPL del orégano extraída con tritón X-100R se purificó 469 veces y 153 veces la extraída sin tritón X-100R. Se obtuvieron valores muy altos con respecto a las veces de purificación obtenidas para hojas de amaranto tricolor (5.0 veces) (Long *et al.*, 2010), cotiledones de girasol (9.4 veces) (Itoh *et al.*, 1999), pimiento verde (22.3 veces) (Husson *et al.*, 2002). Sin embargo, las veces de purificación son cercanas al realizado para la HPL del tomate (300 veces) (Suurmeijer *et al.*, 2000).

En cuanto al rendimiento, para la HPL extraída de las hojas de orégano fue de 4.05 % (con tritón X-100R) y 1.87% (sin tritón X-100R), estos valores son bajos con respecto al obtenido para la HPL de las hojas de amaranto tricolor (49.1%).

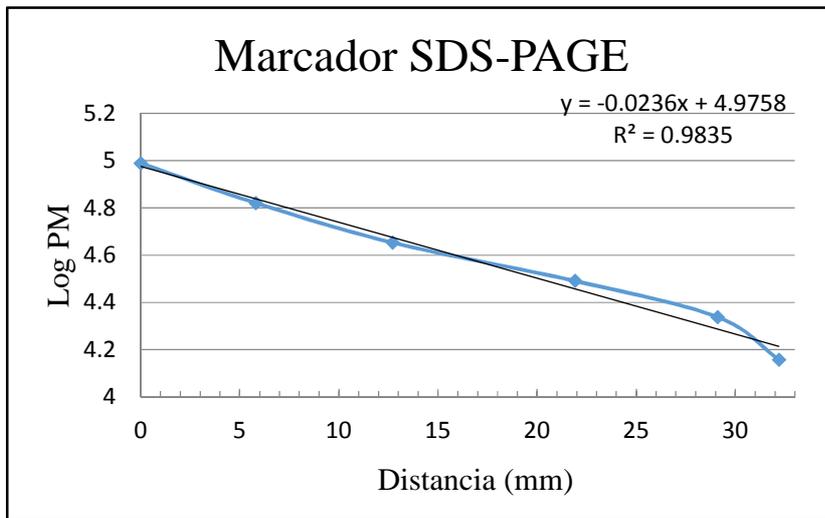
9.5 Electroforesis

Las fracciones eluidas fueron concentradas, los datos obtenidos se observan en la tabla 21.

Tabla 21. Concentración de proteína de las muestras eluidas.

Muestra	Concentración de proteína inicial (mg)	Después de concentrar la proteína (mg)
Fracción eluida con tritón X-100R.	0.00475	0.029
Fracción eluida sin tritón X-100R.	0.00715	0.030

Las distancias existentes entre cada una de las bandas correspondientes a las proteínas contenidas en el estándar se muestran en la figura 28, estas distancias fueron graficadas contra el logaritmo de los pesos moleculares, se ajustaron los puntos a una línea recta y mediante interpolación se obtuvo el peso molecular de la enzima HPL.



Proteínas del estándar	Distancia recorrida (mm)
Fosforilasa b	16.3
Albumina sérica	22.1
Ovoalbumina	29.0
Anhidrasa carbónica	38.2
Inhibidor de la tripsina	45.4
Lisozima	48.5

Figura 28. Curva generada al graficar el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas del estándar contra las distancias recorridas.

En la figura 29 se muestra el gel de electroforesis revelado después de introducir dos fracciones eluidas, la primera con 0.35 µg de proteína de la muestra que contenía tritón, la segunda con 0.25 µg de proteína de la muestra sin tritón, en las dos columnas se observan tres bandas, sin embargo la columna que contenía muestra sin tritón (línea 3) revela bandas más tenues, los pesos moleculares calculados son 100.7, 56.5 y 14.4 KDa.

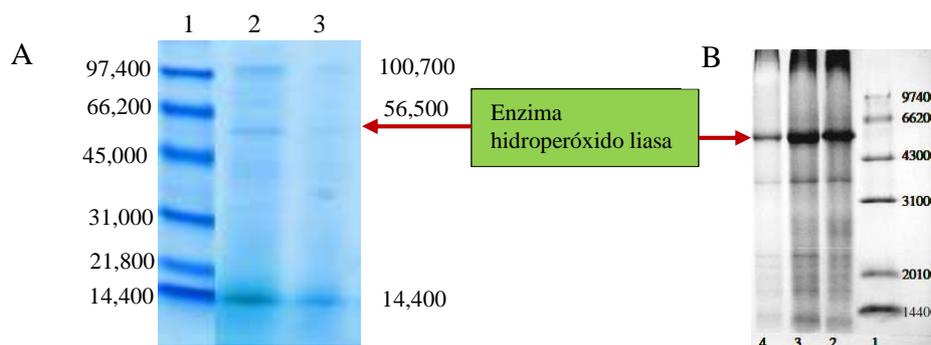


Figura 29.A. Gel de electroforesis SDS-PAGE (hojas de orégano). Línea 1, pesos moleculares estándar; línea 2, fracción eluida con tritón X-100R DEAE-Toyopearl; línea 3, fracción eluida sin tritón X-100R DEAE-Toyopearl. B. Gel de electroforesis SDS-PAGE (hojas de amaranto, Long *et al.*, 2010), línea 1, pesos moleculares; línea 2, fracción de tritón X-100; línea 3, fracción 0–35% (NH₄)₂SO₄, línea 4, DEAE-Toyopearl (9.8µg).

La banda detectada en el gel de electroforesis con un peso molecular de 56.5 KDa es importante en este estudio ya que demuestra la presencia de la enzima HPL en la fracción purificada de extractos de hojas de orégano (Fig. 29.A), con un peso molecular parecido al calculado para las HPLs extraídas de las hojas de amaranto tricolor de 55 KDa (Fig. 29.B) (Long *et al.*, 2010) del pimiento verde (55 KDa) (Husson *et al.*, 2002), de la HPL recombinante del pimiento verde (55 KDa) (Psylinakis *et al.*, 2001), cotiledones de girasol (53 KDa) (Itoh *et al.*, 1999).

Como se puede observar en el gel de electroforesis hay tres bandas que muestran la presencia de tres proteínas, una ya identificada como la enzima HPL. Para conocer cuáles son las otras dos enzimas presentes en la fracción eluida con un peso molecular de 100.7 KDa y 14.4 KDa, se realizó una revisión de las enzimas presentes en el orégano (*Origanum vulgare L.*), y se encontró un trabajo en el cual querían determinar la presencia de las siguientes enzimas: polifenol oxidasa (PPO), peroxidasa, catalasa y lisozima en el orégano (Arroyo & Hernández, 2006).

La polifenol oxidasa (E.C. 1.10.3.1) es una enzima que se encuentra en los tejidos vegetales, se encuentra unida a la membrana, principalmente membranas tilacoidales del cloroplasto que catalizan una reacción que transforma o-difenoles en o-quinonas, favoreciendo la formación de polímeros color negro-marrón. En el estudio del orégano mencionado anteriormente solo se determinó la presencia de actividad total de la polifenol oxidasa en el orégano (Arroyo *et al.*, 2006), pero no se realizó una identificación del peso molecular de la polifenol oxidasa utilizando electroforesis SDS-PAGE, por lo cual no se pudo realizar una comparación del peso molecular de ésta enzima contra los pesos moleculares de 100.7 y 14.4 KDa encontrados en el gel de electroforesis SDS-PAGE para las hojas de orégano.

Por otro lado, se buscó el peso molecular de la PPO extraída de otras fuentes vegetales y se encontró que en los extractos de semillas de *Duranta plumieri Jcaq* (gota de rocío de oro) se tenía una elevada actividad polifenol oxidasa y se determinó el peso molecular de la enzima, el cual fue de 14.0 KDa (Roy, Sharma, & Nath, 2001), la enzima PPO podría ser la detectada en este estudio con un peso molecular muy parecido con 14.4 KDa.

9.6 Actividad de la enzima HPL con diferentes concentraciones de sustrato 13-HPOT

La actividad de la enzima HPL después de la primera etapa de purificación utilizando cromatografía de intercambio iónico fue evaluada con diferentes concentraciones del sustrato 13-HPOT, se utilizó la fracción eluida concentrada misma que se empleó para realizar los geles de electroforesis SDS-PAGE. En este estudio se evaluó la actividad enzimática (U) con respecto a un incremento de la concentración de sustrato (Fig. 30) para conocer la concentración óptima del sustrato.

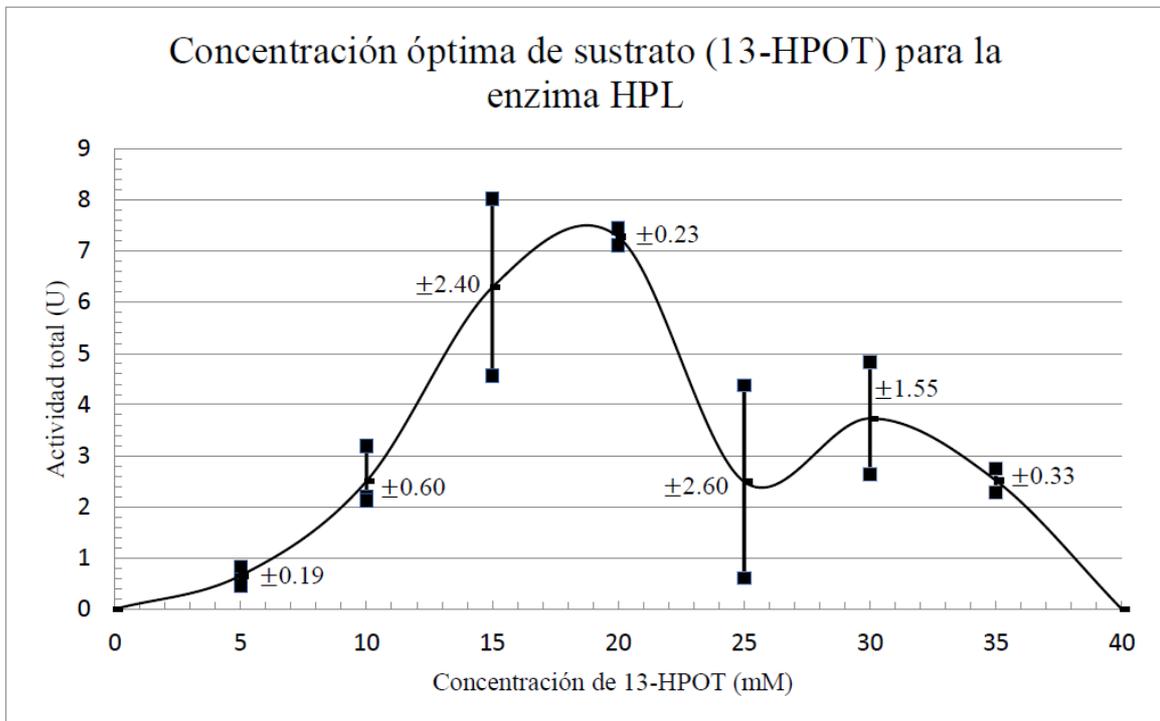


Figura 30. Gráfica para calcular la concentración óptima de sustrato para la enzima HPL del orégano (*Origanum vulgare L.*).

Como se puede observar en la figura 30, la actividad más alta (7.45 U) se obtuvo al utilizar una concentración de 19 mM de hidroperóxidos (13-HPOT). A una concentración de sustrato más baja o más elevada la actividad de la enzima disminuye, como se observa al utilizar una concentración de 40 mM de sustrato la enzima HPL está ya no presentó actividad. En el trabajo de purificación del tomate (Suurmeijer *et al.*, 2000) se encontró que

a concentraciones de más de 0.30 mM de hidroperóxidos la actividad de la enzima HPL se inhibía y esto fue debido a sus productos generados durante la reacción, como el 2(*E*)-hexenal. Existe un comportamiento atípico de la curva debido a la presencia de un pequeño valle a una concentración de 25.5 mM, posiblemente debido a factores no controlables como la temperatura ambiente a la hora de estar realizando las mediciones.

X. CONCLUSIONES

1. La mezcla de hexano-acetona ayudo a eliminar las clorofilas y los lípidos contenidos en el extracto crudo, esto hizo posible una mejor detección de la enzima HPL por electroforesis.
2. Los valores obtenidos de actividad total de la enzima HPL del orégano fueron más elevados (306.28 y 555.28 U de las muestras con tritón y sin tritón respectivamente) comparándolos con los reportados para las hojas de amaranto tricolor (285 U) (Long *et al.*, 2010).
3. Los valores de concentración de la enzima HPL fueron más bajos (54.99 y 58.57 mg de la muestra con tritón y sin tritón respectivamente) comparándolos con los reportados para las hojas de amaranto tricolor (312 mg) (Long *et al.*, 2010).
4. Este estudio mostró que la enzima HPL contenida en la muestra que contenía tritón X-100R se purificó 469 veces en la primera etapa de purificación utilizando cromatografía de intercambio iónico, el valor es más elevado en comparación con el reportado para el tomate (300 veces) (Suurmeijer *et al.*, 2000).
5. En cuanto al rendimiento, se obtuvieron valores bajos con respecto a otros estudios de purificación de la enzima HPL (4.05 y 1.87% en la muestra con tritón y sin tritón respectivamente) posiblemente se obtuvieron esos rendimientos bajos por no precipitar una mayor cantidad de proteína y esto afecto en la etapa de purificación con cromatografía de intercambio iónico.
6. La concentración óptima del sustrato 13-HPOT para la enzima HPL del orégano fue de 19 mM.

XI. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este trabajo se proponen los siguientes puntos:

- Realizar las otras dos etapas de purificación (cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía en hidroxapatita) para la enzima HPL extraída de las hojas de orégano (*Origanum vulgare L.*) para obtener una enzima totalmente purificada.
- Determinar los valores K_m , $V_{máx}$, pI y el pH óptimo de la enzima HPL totalmente purificada para complementar su caracterización.
- Utilizar la concentración de 19 mM de sustrato (13-HPOT) para la lectura de la actividad enzimática, tanto en el extracto crudo como para la enzima purificada.
- Aumentar la concentración de sulfato de amonio de 50% a un 75% para precipitar una mayor cantidad de proteína.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. (2004). *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*. Rosario, Argentina: Corpus.
- Almeida, B.S.N., de Oliveira, L.E., Nunes, G.D., de Oliveira, P.F., Leite., S.E. & Barbosa, S.F. (2010). Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46, 3, 499-509.
- Arroyo, M.I.J., & Hernandez, U.H.Y. (2006). Determinación y extracción de las enzimas: Polifenol Oxidasa, peroxidasa, catalasa y lisozima en el orégano mexicano (*Lippia ssp.*). *IV Congreso Internacional de ingeniería Bioquímica*. México.
- Bate, N.J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riely, J.M.C., Thompson, J.E. & Rothstein, S.J. (1998). Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiol.* 177, 1393-1400.
- Beddows, C.G., Jagait, C. & Kelly, M.J. (2000). Preservation of alpha-tocopherol in sunflower oil by herbs and spices. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51(5), 327-339.
- Casado, V.J. (2004). Aproximación enzimática, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical de tomate. (*Lycopersicon esculentum M.*) Implicación de polifenol oxidasa (PPO) y enzimas antioxidantes. Tesis Doctoral, Universidad de Alicante.
- Castillo, R. F., Roldan, R.M.D., Blasco, P.R., Huertas, R.M.J., Caballero, D.F.J., Moreno-Vivían, C. & Martínez, L-R.M. (2005). *Biotechnología Ambiental*, Madrid, España: Tébar, S.L.
- Carneiro, B. J., da Conceição M. L., Gomes N.N.J., Vieira, A.C., Siqueira J.J.P., Basílio J. I.D. & Leite de Souza, E., (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Elsevier*. 42, 1139–1143.
- Catherine N.S.P. Suurmeijer, C.N.S.P., Pérez-Gilabert, M., van Unen, D-J., van der Hijden H.T.W.M., Veldink, G.A. & Vliegenter, J.F.G. (2000). Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxidelyase. *Phytochemistry*, 53, 177-185.
- Croft, K.P.C., Jüttner, F., & Slusarenko, A.J. (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* L., leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *Plant Physiol*, 101, 13–24.
- Drawert, F., Heimann, W., Emberger, R., & Tressl, R. (1996). Biogenesis of aroma compounds in plant and fruit. II. Enzymic formation of 2-hexen-1-al, hexanal, and their precursors. *Ann. Chem*, 694, 200–208.
- Dubey, N.K., Kumar, R. & Tripathi, P. (2004). Global promotion of herbal medicines: India's opportunity. *CurrSci*, 86, 37-41.

Fausnaugh, J.L., Regnier, F.E. (1986). Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Chromatogr*, 359, 131–146.

Fonnegra, G.R. & Jiménez, R.S.L. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. 2ª edición, Colombia: Universidad de Antioquia.

Force, M., Sparks, W.S. & Ronzio, R.A. (2000). Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. *Phytotherapy Research*, 14, 213-214.

Gacesa, P., & Hubble, J. (1987). *Enzyme technology*. 6ª edition. Milton Keynes, England: Open University Press.

Gardner, H.W., Weisleder, D. & Plattner, R.D. (1991). Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide metabolizing activity in tissues of soybean, *Glycine-max*. *Plant Physiol*, 97, 1059-1072

Galliard, T., Phillips, D.R., & Reynolds, J. (1976). The formation of (Z)-3-nonenal, trans-2-nonenal and hexanal from linoleic acid hydroperoxide isomers by a hydroperoxide cleavage enzyme system in cucumber (*Cucumis sativus*) fruits. *Biochim. Biophys*, 441, 181-192.

Galliard, T., Mattew, J. A., Wright, A. J. & Fishwick, M. J. (1977). The enzymic breakdown of lipids to volatile and nonvolatile carbonyl fragments in disrupted tomato fruits. *J.Sci. Food Agrie*. 28, 863-868.

García H.M. (2000) Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema Phast System. Tesis de Maestría. Facultad de Biología UH. La Habana, Cuba.

Garfin, D.E. (1990). One dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. Academic Press.

Gargouri, M., Drouet, P., Hervagault, J.F., Legoy, M.D. (1996). Investigation of behaviour of an enzyme in a biphasic system: soybean lipoxygenase-1. *Biotechnol. Bioeng*. 51, 573–580.

Garrido, P.A., & Teijón, R, J.M. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. 2ª edición, España: Tébar.

Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M., Wathelet, J., Jardin, P. Du, & Thonart, P. (2010). The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 14(3), 451–460.

Gonzales, R., Pérez-González, J.A., Ventura, L., Sánchez, P., Sanz, P., Fernández E., Vallés S., Piñaga, F., & Ramón, D. (1993). Manipulación genética de la síntesis de enzimas fúngicas de uso en industrias de alimentos. *Microbiología*, 9, 83-89.

Goodwin T.W. & Mercer E. I.(1983). *Introduction to Plant Biochemistry*. 2ª edición, Oxford, Reino Unido: Pergamon Press.

Grechkin, A.N, & Hamberg M. (2004). *Biochim Biophys Acta* 1636:47–58

Harris, C. D. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo*. 2ª edición, Barcelona, España: Reverté S.A,

Hatanaka, A., Kajiwara, J., Sekiya, J., & Inouye, S. (1982). Solubilization and properties of the enzyme-cleaving 13-L-hydroperoxy linoleic acid in tea leaves. *Phytochemistry*, 21, 13-17.

Hatanaka. A. (1993). The biogeneration of green odour by Green leaves. *Phytochemistry*, 34, 1201–1218.

Hooper, H.H. (1999) inventor; Soane Biosciences assignee, Uscross linked polymeric media for electrophoresis. US patent 5 885 432.

Hornostaj A.R &, Robinson, D.S. (1999). Purification of hydroperoxide lyase from cucumbers. *Food Chemistry*, 66, 173-180.

Hornostaj, A. R. & Robinson, D. S. (2000). Purification of hydroperoxide lyase from pea seeds. *Food Chemistry*, 71, 241-247.

Howe, G.A., Lee, G.I., Itoh, A.,Li, L. & De Rocher, A.E. (2000). Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hidroperoxide lyase. *Plant Physiol*, 123, 711-724.

Hughes, R.K., De Domenico, S., & Santino, A., (2009). Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellularlocalisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications. *ChemBioChem*, 10, 1122–1133.

Inatani, R., Nakatani, N., & Fuwa, H. (1983). Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their derivatives. *J. Agric. Biol. Chem.* 47: 521-528.

Justesen., & Knuthsen. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*. 73, 245-250.

Karger, L.B. (1996). *Methods In Enzymology, Volume 270 High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules, Part A Fundamentals*. California, USA: Academic Press.

Kim, I.S., & Grosch, W. (1981). Partial purification and properties of a hydroperoxidelyase from fruits of pear. *J. Agric. Food Chem*, 29, 1220-1225.

Kintzios S.E. (2004). *Orégano the genera Origanum and Lippia*. Londres: Taylor & Francis.

- Kinghorn, A. D., Nanayakkara, N. P. D., Soejarto, D. D., Medon, P. J. & Kamath, S. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. I. Purification of *Stevia rebaudiana* sweet constituents by droplet counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* 237: 478-483.
- Koeduka, T, Stumpe M, Matsuia, K, Kajiwara, T, & Feussner.I. (2003). Kinetics of Barley FA Hydroperoxide Lyase are Modulated by Salts and Detergents. *Lipids*, 38(11), 1167-1172.
- Kujawska, M. & Hilgert N.I. (2014). Phytotherapy of Polish migrants in Misiones, Argentina: Legacy and acquired plant species. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(3), 810-30
- Lindberg, M. & Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidant. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 271-277.
- Long, Z., Kong, X., Zhang, C., Jiang, B. & Hua, Yufei. (2010). Purification and characterization of hydroperoxide lyase from amaranth tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves. *Eur Food Res Technol*, 231, 865–871.
- Matoba, T, Hidaka, H., Kitamura, K., Kaizuma, N. & Kito, M. (1985). Contribution of hydroperoxide lyase activity to nhexanal formation in soybean. *J. Agric. Food Chem*, 33, 856-858.
- Matthew, J. A. & Galliard, T. (1978). Enzymic formation of carbonyls from linoleic acid in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, 17, 1043-1044.
- Matsui, K., Toyota, H., Kajiwara, T., Kakuno, T. & Hatanaka, A. (1991). Fatty Acid Hydroperoxide Cleaving Enzyme, Hydroperoxide Lyase, from Tea Leaves. *Phytochemistry* 30, 2109-2113.
- Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L.M., & Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas Cromatográficas y su Aplicación a Estudios de Cambios Conformacionales, Estabilidad y Replegamiento de Proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 415-429.
- Melander, W., & Horváth, C. (1977). Salt effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of lyotropic series. *Arch. Biochem. Biophys.* 183, 200–215.
- Moi, M.K., Chan, R.T., Becker, R.G. & Chalmers, K, C. (1999) inventors; CC IMEX assignee. Horizontal gel electrophoresis casting cassette. US patent 5 938 906.
- Monigatti, M., Bussmann, R.W., & Weckerle, S.C. (2013). Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Perú. *Elsevier*, 145, 450–464.
- Negre-Zakharov, F., Long, M.C. & Dudareva, N. in Osbourn, A.N. & Lanzotti, V. (2009). *Plant-Derived Natural Products Synthesis Function, and Application*. New York: Springer.

- Nelson, D.L., & Cox M.M. (2008). *Lehninger, Principios Básicos de Bioquímica*, 4ª edición. Barcelona. España: Ediciones Omega, S.A.
- Noordermeer MA, Veldink GA, & Vliegthart JFG (2001). *FEBS lett* 489:229–232
- Omura,T. & Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal Biol. Chem*, 239, 2370-2378.
- Pascual., Slowing., Carretero., Sánchez., & Villar. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *Ethnopharmacology*. 76, 201-214.
- Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I. C., Wagner, G.C. & Kraut, J. (1985). The 2.5-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450, *Journal Biol. Chem*, 260, 16122-16130.
- Psylinakis, E., Davoras E.M., Ioannidis, N., Trikeriotis, M., Petrouleas, V. & Ghanotakis, D.F. (2001). Isolation and spectroscopic characterization of a recombinant bell pepper hydroperoxide lyase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1533, 119-127.
- Rabetafika, H.N., Gigot, C., Fauconnier,M-L., Ongena, M., Destain, J., du Jardin, P., Wathelet, J.P. & Thonart, P. (2008). Sugar beet leaves as new source of hydroperoxidelyase in a bioprocess producing green-note aldehydes. *Biotechnol Lett*, 30, 1115–1119.
- Richard. H., & Multon. J.L. (1995) *Les Arômes Alimentaires*. Francia: Tech. & Doc.
- Roberts, A., O'Brien, M.E. & Subak-Sharpe, G. (2001) *Nutraceuticals: The Complete Encyclopedia of Supplements, Herbs, Vitamins and Healing foods*. Berkeley Publishing Group, New York, 608.
- Roca P., Oliver, J., & Rodríguez, N.M. (2003). *Bioquímica, técnicas y métodos*, Madrid: Hélice.
- Roe, S. (1989). Purification based on hydrophobicity. In: Harris, E.L.V., Angal, S. (Eds.), *Protein Purification Methods: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford
- Roy, I., Sharma. S. & Nath, G.M. (2001). Separation of an Isoenzyme of Polyphenol Oxidase from *Duranta plumieri* by Expanded bed Chromatography. *Protein Expr Purif*. 24 (2), 181-187.
- Santiago-Gómez, M.P., Kermasha, S., Nicaud, J-M., Belin, J-M. & Husson, F. (2008). Secondary structure conformation of hydroperoxide lyase from green bell pepper, cloned in *Yarrowia lipolytica*, and its activity in selected media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52–53, 128–132.

Schreier, P. & Lorenz, G. (1982). Separation, partial purification and characterization of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from apple and tomato fruits. *Naturforsch.* 37c, 165-173.

Seymour G. B., Taylor J.E. & Tucker G.A. (1993). *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall.

Sekiya, J., Kajiwar, T. & Hatanaka, A. (1979). Volatile C-6 aldehyde formation via hydroperoxides from C-18 unsaturated fatty acids in etiolated alfalfa and cucumber seedlings. *Aghc. Biol. Chem.* 43, 969-980.

Sekiya, J., Tanigawa, S., Kajiwar, T. & Hatanaka, A. (1984). Fatty acid hydroperoxide lyase in tobacco cells cultured in vitro. *Phytochemistry*, 23, 2439-2443.

Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwar, T. & Hatanaka, A. (1995). Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits, *Plant Cell Physiol.* 36, 147-156.

Silvia, G.M.C., García, B.M.J., Del Castillo, T.L., Ania, P.J.M & Gómez, M.D. (2006) *Técnico Especialista en Laboratorio*, 2ª edición, España: MAD, S.L.

Song, W.C. & Brash, A.R. (1991) Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome-P-450, *Science*, 253, 781-784

Souza, E.L., Stamford, T.L.M., & Trajano, V.N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Elsevier*, 18, 409-413.

Tanaka, O. (1982): Steviol glykosides: New natural sweeteners. *Trends Anal Chem*, 1, 246-248

Tijet, N., Waspi, U., Gaskin, D.J.H. Hunziker, P., Muller, B.L., Vulfson, E.N., Slusarenko, A., Brash, A.R. & Whitehead, I.M. (2000). Purification, molecular cloning and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*), *Lipids*, 35, 709-720.

Tressl, R. & Drawert, F. (1973). Biogenesis of banana volatiles. *J. Agric. FoodChem*, 21, 560-565.

Vanina, M, E.M., & Toselli, L.A.(2008), Evaluación de Los procesos de Extracción y Purificación de Los compuestos endulzantes de la hoja de *Stevia Rebaudiana*, Facultad Regional Villa María, Universidad Tecnológica Nacional, Córdoba, Argentina.

Voet, D., & Voet J.G. (2006). *Bioquímica*. 3ª edición, Argentina: Medica Panamericana.

Vick, B.A. & Zimmerman, D.C. (1976). Lipoxygenase and hydroperoxidelyase in germinating watermelon seedlings. *Plant Physiol*, 57, 780-788.

Vick, B.A. & Zimmerman, D.C. (1987). Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol*, 85, 1073-1078.

Wardale, D.A., Lambert, E.A., & Galliard, T. (1978). Localitation of fatty acid hydroperoxide cleavage activity in membranes of cucumber fruit. *Phytochemistry*, 17, 205-212.

Weiner, L.M. (1986). Magnetic resonance study of the structure and functions of cytochrome P450. *Crit, Rev, Biochem*, 20, 139-200.

Wurzenberger, M., & Grosch, W. (1984). The formation of 1-oeten-3-ol from the 10 hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliotabisporea*). *Biophys*. 794, 25-30.

Zamora, R., Hidalgo, F.J., & Alaiz, M. (1991). Alteraciones bioquímicas de los lípidos en los alimentos vegetales. II. Metabolismo de los hidroperóxidos lipídicos: grasas y aceites. *International Journal of Fats and Oils*, 42(3), 232-233.

Zeringhe, H.J. (1992). Effects of C6–C10 alkenals and alkanals on eliciting a defence response in the developing cotton boll. *Phytochemistry*, 31, 2305–2308.

ANEXO 1

Para la realización de la metodología propuesta, se realizó un cuadro comparativo de diferentes artículos científicos.

Tabla 1- Pasos para la obtención del extracto crudo de diferentes fuentes vegetales.

AUTORES		LICUEFACCIÓN		CENTRIFUGACIÓN
Tijet <i>et al.</i> , 2000	Guayaba 500 g de muestra en buffer de fosfato de sodio (50 mM, pH= 7.0), 0.1% tritón X 100R y 5 mM ascorbato de sodio (evitar oxidación)	2 min en a 4°C	Agregó1% (v/v) de Tritón X-100R y se agitó por 30 minutos	16000 g por 15 min a 4 °C. Se le agregó 0.02% Pectinex Ultra SP-L para eliminar pectina
Long <i>et al.</i> , 2010	Hojas de amaranto tricolor 150 gramos en 450 ml de buffer que contenía 0.1 M Tris-HCl a pH 8,5 0,5% (w/v) de polivinilpirrolidona K-30	6 veces por 1 minuto	El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de tela	40000 g durante 30 min a 4 °C.
Suurmeijer <i>et al.</i> ,2000	Tomate 1 kilogramo en 2 litros de buffer HEPES (0.1 M pH 7.5).	-----	El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de tela Al filtrado se le agrego una solución 2% (v/v) de 1 M CaCl ₂ Se agitó durante 1 hora a 4° C.	30,00 g durante 20 min a 4 °C.
Rabetafika <i>et al.</i> , 2008	Hojas de remolacha azucarera 100 gramos en 200 mL de buffer fosfato de sodio (100 mM, pH 7), 10 mM de cisteína, 3 mM de EDTA y 0,5% (w / v) de Tritón X-100.	-----	El extracto se agitó durante 1.5 horas a 4 °C	8000 g durante 2 minutos
Matsui <i>et al.</i> , 2000	Pepino Buffer de fosfato de sodio (0.1 M, pH 6.5), 0.2% Tween 20.			1000 g por 10 min a 4°C
Xiong <i>et al.</i> , 2012	Hojas de amaranto 150 gramos en 450 ml de buffer Tris-HCl (0.1 M, pH 8.5), 0.5% (w / v) de polivinilpirrolidona K-30 y 1 mM de cisteína.	6 veces por 1 minuto	El homogenizado se filtró a través de cuatro capas de tela.	40000 g por 30 min a 4 °C.

Akacha <i>et al.</i> , 2009	Hojas de menta 15 gramos en 50 mL de buffer de fosfato de sodio (0.1 M, pH 6.5).	-----	El homogenizado se filtró a través de cuatro capas de tela Al filtrado se le agregó una solución 2% (v/v) de 1 M CaCl ₂ Se agitó durante 2 horas a 4° C.	30000 g por 20 min a 4° C.
-----------------------------	--	-------	--	----------------------------

Tabla 1- Pasos para la obtención del extracto crudo de diferentes fuentes vegetales, después de licuar y centrifugar.

AUTORES			
Tijet <i>et al.</i> , 2000			
Long <i>et al.</i> , 2010	El precipitado obtenido se re-suspendió en 75 ml de buffer de Tris-HCl (20 mM, pH 8.5) que contenía 1 mM DTT y 0,5% (v / v) de tritón X-100 y se agitó suavemente durante 1 h en hielo.	La suspensión se centrifugó a 40,000 g durante 30 min a 4 ° C.	
Suurmeijer <i>et al.</i> , 2000	El precipitado obtenido se re-suspendió en un buffer (buffer 0.02 M Tris/ HCl, pH 8.5, que contenía 0.1% (w/v) tritón X- 100 y 0.01 M β-mercaptoetanol	La suspensión fue clarificada por centrifugación a 15000 g durante 30 min	
Rabetafika <i>et al.</i> , 2008	La enzima HPL estaba contenida en el sobrenadante.		
Matsui <i>et al.</i> , 2000			
Xiong <i>et al.</i> , 2012	El precipitado obtenido se re-suspendió con tampón de Tris-HCl (0.02 M, pH 8,5)		
Akacha <i>et al.</i> , 2009	El precipitado se re-suspendido con buffer de fosfato de potasio (0.02 M, pH 6.5) que contenía 0.1% (w/v) de tritón X-100 y 0.01 M de β-mercaptoetanol	La suspensión fue clarificada por centrifugación a 15000 g durante 30 min	El sobrenadante fue utilizado como extracto crudo

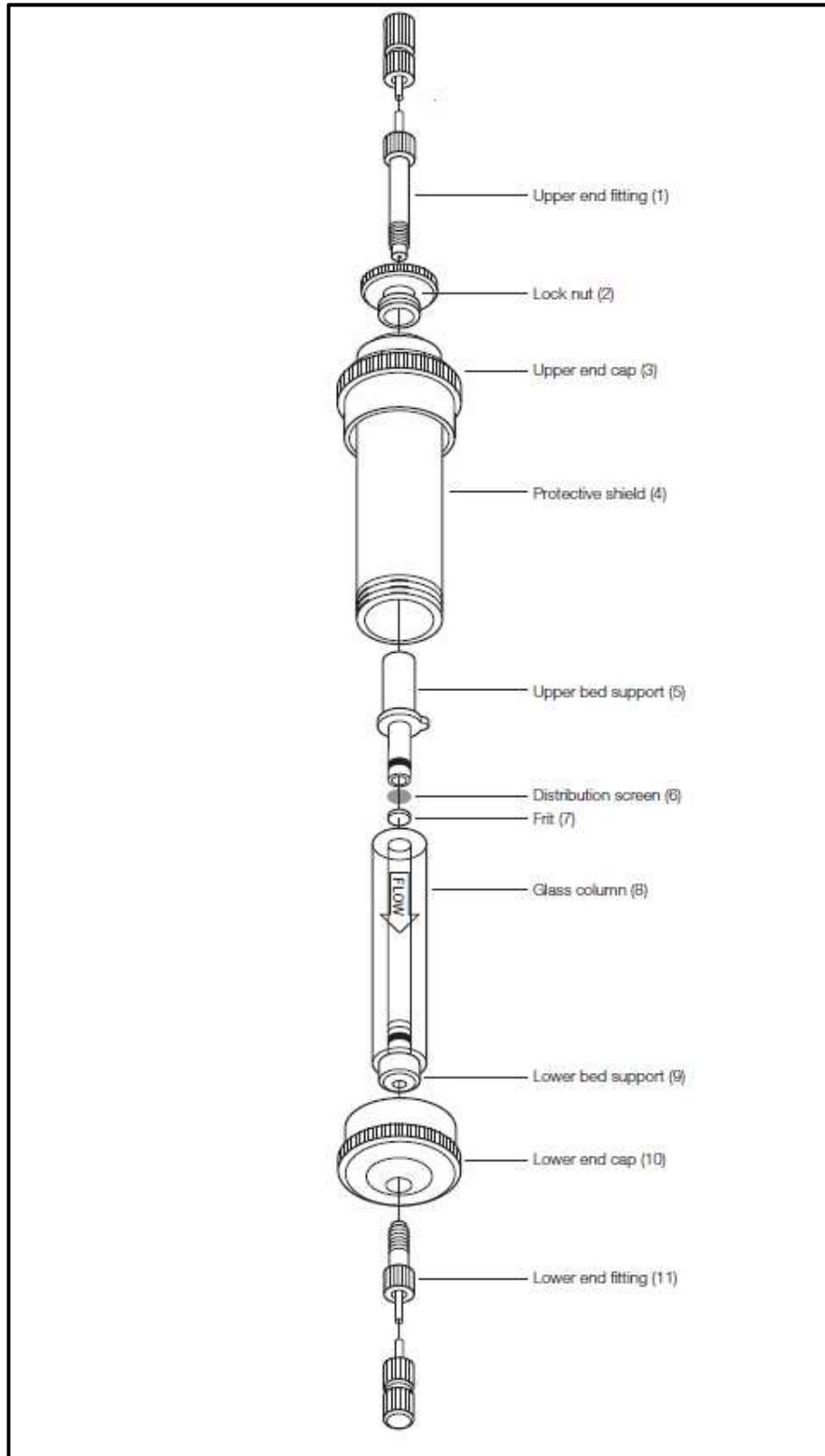
ANEXO 2

Tabla 2- Cantidades de sulfato de amonio requerido para precipitar una proteína.

Porcentaje de saturación a 0°C									
Concentración inicial de sulfato de amonio	20	25	30	35	40	45	50	55	60
	Sulfato de amonio en gramos (g), requerido para adicionar a 1 litro de solución.								
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241
25		0	27	56	84	115	146	179	211
30			0	28	56	86	117	148	181
35				0	28	57	87	118	151
40					0	29	58	89	120
45						0	29	59	90
50							0	30	60
55								0	30
60									0

Fuente: UNAD 2010

ANEXO 3
DIAGRAMA DE LA COLUMNA BIO-SCALE MT20



ANEXO 4

Preparación de las diferentes soluciones para electroforesis

4.1 Tampón de almacenamiento del marcador.

Reactivos	Volumen
Agua destilada	4.8 mL
0.5 M Tris-HCl pH = 6.8	1.2 mL
Glicerol	1.0 mL
10 % (w/v) SDS	2.0 mL
0.1 % (w/v) Azul de bromofenol	0.5 mL
Volumen total	9.5 mL

4.2 Tampón de almacenamiento de muestra.

Reactivos	volumen
0.5 M Tris-HCl pH = 6.8	1.0 mL
Glicerol	0.8 mL
10 % SDS	1.6 mL
0.1% Azul de bromofenol	0.4 mL
β -mercaptoetanol*	0.4 mL
Agua destilada	3.0 mL
Volumen total	7.2 mL

* Este reactivo se agregó antes de realizar el gel.

4.3 Buffer de electroforesis

Reactivos	Cantidad
Tris-Base	15 gramos
Glicina	72 gramos
SDS	5 gramos
Se ajustó a un pH de 8.5 con HCl concentrado a 500 mL, la solución quedó a una concentración de 10x	

4.4 Solución teñidora

Reactivos	Cantidad
Azul de Coomassie R-250	1 gramo
Ácido acético	100 mL
Metanol	400 mL
Aforar a 1000 mL con agua destilada	

4.5 Solución decolorante

Reactivos	Cantidad
Ácido acético	100mL
Metanol	400 mL
Aforar a 1000 mL con agua destilada	

ANEXO 5

Cálculos para la obtención de la tabla de purificación

Lectura	Fórmula
Actividad específica	Actividad específica del tratamiento i = $\frac{\text{Actividad total del tratamiento i}}{\text{Concentración de proteína del tratamiento i}}$
Veces de purificación	Veces de purificación del tratamiento i = $\frac{\text{Actividad específica del tratamiento i}}{\text{Actividad específica inicial (extracto crudo)}}$
Rendimiento	Rendimiento del tratamiento i = $\frac{\text{Actividad total del tratamiento i}}{\text{Actividad total inicial (extracto crudo)}}$

Fórmulas para obtener la desviación estándar

$$\text{Desviación estándar muestral } S_y = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{N}}$$

Desviación estándar de productos

$$\frac{S_y}{P} = \sqrt{\left(\frac{S_{y1}}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{S_{y2}}{x_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{S_{yn}}{x_n}\right)^2} = K$$

$$S_y = P * K$$

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LAS INSTALACIONES DE LOS
LABORATORIOS DE: CIENCIA DE LOS ALIMENTOS, HIDROLOGÍA Y QUÍMICA
DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA.