

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS Y PESQUERAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD DE PROTEASA Y LIPASA DEL LÁTEX DE *JACA (Artocarpus heterophyllus L.)*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS EN EL ÁREA DE CIENCIAS
AGRÍCOLAS

PRESENTA:

MÓNICA ELIZABETH MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Xalisco, Nayarit, Noviembre de 2013



Universidad Autónoma
de Nayarit

Xalisco, Nayarit, 20 de Noviembre de 2013.

DR. J. DIEGO GARCÍA PAREDES
COORDINADOR DEL POSGRADO (CBAP)
PRESENTE

Los suscritos integrantes del Comité Tutorial para asesorar la Tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD DE PROTEASA Y LIPASA DEL LÁTEX DE JACA (*Artocarpus heterophyllus* L.)**, que presenta la **C. Mónica Elizabeth Martínez González** para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Agrícolas, damos nuestra aprobación para que continúe con los trámites correspondientes para la obtención de su grado.

Sin otro asunto que tratar, recibe un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera
Directora

Dra. Ma. Teresa Sumaya Martínez
Asesor

Dr. Elias Flandes Ibarra
Asesor

M. en C. Juana Ederia Vidales Paz
Asesor



Unidad de Tecnología de Alimentos
Calle de la Olla s/n, Col. Nueva
C.P. 63150, Tepic, Nayarit

Tel. 21-4540100 ext. 300

UANO

Unidad de Tecnología
de Alimentos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS Y PESQUERA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/378/13

Xalisco, Nayarit; 25 de noviembre de 2013

Ing. Alfredo González Jáuregui
Director de Administración Escolar
Presente.

Con base al oficio de fecha 20 de noviembre de 2013, enviado por los CC. **Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera, Dra. Ma. Teresa Sumaya Martínez, Dr. Elias Piedra Ibarra y M. en C. Juana Edelia Vidales Paz**, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza a la **C. Mónica Elizabeth Martínez González**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por lo Nuestro a lo Universitario"



Dr. J. Diégo García Paredes
Coordinador del Posgrado

C.c.p.-Expediente.

JDGP/ref.

DEDICATORIAS

Leonardo

*Al sol que veo más brillante cada día,
por quien vale la pena desvelarse,
caerse y levantarse...
Para la chispa que echa a andar la
máquina y la mantendrá andando
hasta el final...*

Elvía y Roberto

*Para las personas que hicieron todo
en la vida para que yo pudiera lograr
mis sueños, por motivarme y darme
la mano en todo momento...
A ustedes por siempre mi corazón y
mi agradecimiento*

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por darme vida, amor y salud.
- A Leonardo, por enseñarme a que todos los días hay algo por qué sonreír, a pesar de todo y por llenarme de besos y abrazos en mis peores momentos.
- A mi familia, por apoyarme en todo y en todo momento.
- A la Dra. Leticia Mónica Sánchez, por el honor de invitarme a ser su estudiante, por el tiempo dedicado, asesoría y guía, y a su familia por darme asilo y apoyo durante mi estadía en la Cd. de México.
- Al Dr. Diego Garcia Paredes, por su apoyo durante mi estancia en el posgrado.
- A la Dra. Ma. Teresa Sumaya, por su tiempo invertido, asesoría y ejemplo de vida como mujer exitosa en todos los ámbitos.
- A mi "asesor simbólico" y gran amigo, M. en C. Apatzingán Palomino por regalarme mucho de su tiempo, sabiduría, paciencia y por facilitar los huertos para las colectas de látex.
- Al Dr. Rosendo Balois por la ayuda en la liofilización de las muestras y por sus asesorías y consejos.
- Un especial agradecimiento al Dr. Elias Piedra, a la M. en C. Josefina Vázquez, al profe Rafa y a sus respectivos estudiantes, especialmente a Anabel por su ayuda y por recibirme con gusto y dedicación en su laboratorio.
- Al Dr. Edgar Jimenez, Dr. Bernardino Velazquez, Dra. Vero Mondragón, Dra. Ma. Luisa Machuca, Dra. Irma Martha Medina por regalarme mucho de su tiempo y conocimiento.
- A mis compañeros de generación, un excelente y divertido grupo.
- A mis colegas y compañeros de Tecnología de Alimentos Esteban Bello, Ernesto González, Patricia Barrón, Orlando Jiménez, Ernesto Rincones, Gabriel Armenta, Raquel Medina y Armando Quintero por el apoyo moral y hacer llevaderos los ratos pesados.
- A mis chic@s practicantes Naomi, Samantha y Diego, quienes me ayudaron bastante con su mano de obra.

AGRADECIMIENTOS A FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias y Pesqueras (CBAP) de la Universidad Autónoma de Nayarit, y a la Unidad de Tecnología de Alimentos por todo el apoyo otorgado.

A CONACyT agradezco la ayuda económica prestada por el apoyo con una beca, con el número de CVU 423013.

Al Cuerpo Académico de Biotecnología de Alimentos y Productos Funcionales adscrito a la Secretaría de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Nayarit por financiar este trabajo con recursos propios.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos, de la FES-Iztacala de la UNAM, por la estancia de investigación bajo la dirección del Dr. Elías Piedra Ibarra y la M en C. Josefina Vázquez Medrano.

Esta investigación fue realizada en la
Unidad de Tecnología de Alimentos de
la Universidad Autónoma de Nayarit

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE TABLAS | x |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xi |
| ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES..... | xiii |
| I – INTRODUCCIÓN | 1 |
| II - REVISIÓN DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. La planta de jaca | 3 |
| 2.1.1. El árbol de jaca | 3 |
| 2.1.2. El fruto..... | 4 |
| 2.1.3. Producción de jaca en México | 5 |
| 2.2. El látex | 7 |
| 2.2.1. Distribución en la planta y función | 7 |
| 2.2.2. Características fisicoquímicas básicas del látex de jaca..... | 8 |
| 2.3. Las enzimas | 8 |
| 2.3.1. Propiedades físicas y químicas de las enzimas..... | 9 |
| 2.4. Enzimas proteolíticas | 9 |
| 2.4.1. Clasificación de las proteasas..... | 10 |
| 2.4.2. Mecanismo de acción de las proteasas | 11 |
| 2.5. Enzimas lipolíticas..... | 12 |
| 2.5.1. Clasificación de las lipasas | 13 |
| 2.5.2. Mecanismo de acción de las lipasas..... | 13 |
| 2.6. Aplicaciones de las enzimas proteolíticas y lipolíticas | 16 |
| III – JUSTIFICACIÓN | 18 |
| IV – HIPÓTESIS | 19 |
| V. OBJETIVOS | 20 |
| 5.1. Objetivo general | 20 |
| 5.1.1. Objetivos específicos | 20 |

| | |
|--|-----------|
| VI – MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| 6.1. Material vegetal..... | 22 |
| 6.2. Recolecta del látex..... | 22 |
| 6.3. Obtención del extracto crudo (fase acuosa)..... | 23 |
| 6.4. Liofilizado del extracto crudo..... | 23 |
| 6.5. Cuantificación de la proteína soluble..... | 23 |
| 6.6. Métodos electroforéticos..... | 24 |
| 6.6.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)..... | 24 |
| 6.6.2. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (ND-PAGE)..... | 24 |
| 6.6.3. Determinación del peso molecular de las proteínas..... | 24 |
| 6.7. Actividad proteolítica en placa..... | 25 |
| 6.8. Identificación de proteínas por actividad caseinolítica (zimogramas)..... | 25 |
| 6.9. Identificación de proteínas por actividad lipolítica (zimogramas)..... | 26 |
| 6.10. Cromatografía de filtración en gel..... | 26 |
| 6.11. Cromatografías de intercambio iónico..... | 27 |
| 6.12. Electroforesis en dos dimensiones..... | 27 |
| VII. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 29 |
| 7.1 Estandarización del método de recolección del látex y obtención del extracto crudo..... | 29 |
| 7.1.1. Cuantificación de la proteína soluble en los extractos crudos..... | 30 |
| 7.1.2. Patrones electroforéticos de las proteínas presentes en el látex del árbol y fruto de la jaca..... | 31 |
| 7.1.3. Ensayo de la actividad proteolítica en placa..... | 33 |
| 7.1.4. Ensayos de la actividad lipolítica en placa..... | 33 |
| 7.1.5. Zimogramas de actividad proteolítica..... | 34 |
| 7.1.6. Zimogramas de actividad lipolítica..... | 36 |
| 7.2. Separación las proteínas por cromatografía de filtración en gel..... | 37 |
| 7.2.1. Actividad proteolítica en placa de las fracciones obtenidas de la cromatografía filtración en gel..... | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2.2. Actividad lipolítica en placa de las fracciones obtenidas de la cromatografía filtración en gel | 39 |
| 7.2.3. Cuantificación de la proteína en las fracciones de interés | 39 |
| 7.2.4. Electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes en las fracciones con actividad proteolítica y lipolítica | 40 |
| 7.2.5. Zimogramas de actividad proteolítica en condiciones nativas | 41 |
| 7.2.6. Zimogramas de actividad lipolítica en condiciones nativas | 41 |
| 7.2.7. Zimogramas de actividad proteolítica y lipolítica después de SDS-PAGE | 43 |
| 7.3. Cromatografía de intercambio aniónico | 43 |
| 7.3.1. Actividad proteolítica y lipolítica en placa fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico..... | 45 |
| 7.3.2. Determinación de los pesos moleculares de las proteínas en las fracciones con actividad proteolítica y lipolítica por SDS-PAGE | 46 |
| 7.3.3. Zimogramas de actividad proteolítica en condiciones nativas | 47 |
| 7.3.4. Zimogramas de actividad lipolítica en condiciones nativas..... | 49 |
| 7.4. Electroforesis en doble dimensión (2-DE)..... | 50 |
| VIII – CONCLUSIONES..... | 52 |
| RECOMENDACIONES..... | 53 |
| LITERATURA CITADA | 54 |
| ANEXO A | 59 |
| ANEXO B | 63 |
| ANEXO C | 64 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 – Principales estados productores de jaca (SIAP, 2012) | 6 |
| Tabla 2 – Producción de jaca por municipio, en el Estado de Nayarit (SIAP, 2012)..... | 6 |
| Tabla 3 . Identificación y nomenclatura de las muestras de látex. | 29 |
| Tabla 4 - Concentración de proteína de las fracciones de la cromatografía de filtración en gel. | 40 |
| Tabla 5- Concentración de proteína de las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico. | 45 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Morfología general de la planta de jaca | 4 |
| Figura 2. El fruto de jaca | 5 |
| Figura 3. Representación esquemática de la región de unión del sitio catalítico de una proteasa. | 12 |
| Figura 4. Mecanismo de hidrólisis de las lipasas. (Tomado de Hernáiz, 2012) 15 | |
| Figura 5. Estrategia experimental general. | 21 |
| Figura 6. Colecta del látex. | 22 |
| Figura 7. Las tres fases en que separa el látex de jaca..... | 30 |
| Figura 8. Concentración de proteína en los extractos crudos del látex de jaca, obtenidos con diferentes metodologías..... | 31 |
| Figura 9. Electroforesis en gel SDS-PAGE (16%) y tabla de pesos moleculares.. | 32 |
| Figura 10. Verificación de la calidad de las proteínas posterior al proceso de liofilización. SDS-PAGE (16%)..... | 33 |
| Figura 11– Pruebas de actividad proteolítica en placa. Geles de grenetina (8%).. | 34 |
| Figura 12 – Pruebas de actividad lipolítica en placa. Geles de agar-tribufirina (0.5%)..... | 34 |
| Figura 13. Electroforesis en gel y zimograma de actividad proteolítica..... | 35 |
| Figura 14. Electroforesis en gel y zimograma de actividad lipolítica. | 36 |
| Figura 15. Espectro de absorbancia del perfil de elusión de proteínas por cromatografía de filtración en gel. | 38 |
| Figura 16. Electroforesis en gel SDS-PAGE (12%) de las fracciones con actividad de la cromatografía de filtración en gel. | 41 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Electroforesis en gel y zimograma de actividad proteolítica de las fracciones de la cromatografía de filtración en gel..... | 42 |
| Figura 18. Electroforesis en gel y zimograma de actividad lipolítica de las fracciones de la cromatografía de filtración en gel..... | 42 |
| Figura 19 – Espectro de absorbancia del perfil de elusión de proteínas por cromatografía de intercambio iónico..... | 44 |
| Figura 20 – Electroforesis en gel SDS-PAGE (12%) de las fracciones con actividad de la cromatografía de intercambio aniónico..... | 46 |
| Figura 21 – Electroforesis en gel y zimograma de actividad proteolítica de las fracciones 60 a la 68 de la cromatografía de intercambio aniónico..... | 48 |
| Figura 22 – Electroforesis en gel y zimograma de actividad proteolítica de las fracciones 69 a la 77 de la cromatografía de intercambio aniónico..... | 49 |
| Figura 23 – Proteoma de las fracciones con actividad proteolítica y lipolítica obtenidas de la cromatografía de filtración en gel..... | 51 |
| Figura 24 – Proteoma de las fracciones con actividad proteolítica y lipolítica obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico..... | 51 |

ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES.

| | |
|-------------------|---|
| % | Por ciento |
| °C | Grados Celsius |
| 2-DE | Electroforesis en dos dimensiones |
| CaCl ₂ | Cloruro de calcio |
| cm | Centímetros |
| COOH | Grupo carboxilo |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| EC | Enzyme Comission |
| EDTA | Ácido etilendiamintetracético (sal tetrasódica) |
| Fig. | Figura |
| g | Gravedades |
| gr | Gramos |
| h | Horas |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| IEF | Isoelectroenfoque |
| IPG | immobilized pH gradients |
| kDa | Kilodaltones |
| Kg | Kilogramos |
| kVh | kiloVolts-hora |
| log | Logaritmo |
| M | Molar |
| mg | miligramos |
| min | Minutos |
| ml | Mililitros |

| | |
|------------------|--|
| mM | Milimolar |
| mV | Milivoltios |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaN ₃ | Azida de sodio |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| ND-PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas |
| NH ₂ | Grupo amino |
| nm | Nanómetros |
| PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida |
| pH | Potencial Hidrógeno |
| <i>pI</i> | Punto isoelectrico |
| PM | Peso molecular |
| Rf | Movilidad electroforética relativa |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes |
| β-ME | β-mercaptoetanol |
| TEMED | <i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylenediamine |
| Tris | Tris(hidroxiometil)aminometano |
| ug | Microgramos |
| uL | Microlitros |
| um | Micras |
| V | Voltios |

I – INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que facilitan la conversión de sustratos en productos facilitando las condiciones que disminuyen la energía de activación de la reacción (Karigar y Rao, 2011). Una de sus características más sobresalientes es su elevada especificidad, es decir, que cada tipo de enzima se une a un único tipo de sustancia (el sustrato) sobre la que actúa (Lehninger, 2009). Las enzimas tienen muchas aplicaciones en diversos tipos de industrias, como son la de detergentes, tratamiento de afluentes industriales, panadería, quesería, vinícola, textil, y peletería, entre otros (Natalucci *et al.*, 2000); así como también ayudan a optimizar un gran número de procesos, ya que utilizan una baja cantidad de sustrato y reducen la formación de productos secundarios (Natalucci *et al.*, 2000). Las enzimas más importantes comercialmente son las enzimas hidrolíticas, que incluyen a las proteasas y las lipasas, las cuales se utilizan para el ablandamiento de carnes, para fragmentar las proteínas presentes en la cerveza, en la producción de hidrolizados, degradar aguas industriales que contengan proteínas, entre otros. Actualmente, se dispone de estas enzimas relativamente puras, extraídas industrialmente de bacterias y hongos principalmente, y sólo algunas son extraídas de plantas o frutos, como la papaya y la piña.

En la actualidad se buscan alternativas en plantas para la extracción de enzimas, que puedan ser utilizadas en diversos procesos. El látex es una fuente abundante en enzimas, proviene de las células laticíferas de un gran número de plantas de las familias: Apocynaceae, Caricaceae, Euphorbiaceae y Moraceae (Teixeira *et al.*, 2008; Tomar *et al.*, 2008). El látex es una emulsión acuosa que contiene muchos compuestos, por ejemplo, lípidos, gomas, resinas, azúcares y enzimas (Fonseca *et al.*, 2010). Dentro de las enzimas que contiene el látex, se ha encontrado que es rico en proteasas, lipasas y quitinasas en cantidades tan elevadas que se ha dado lugar a su aprovechamiento biotecnológico. La presencia de enzimas proteolíticas en el látex cumple funciones fundamentales en los procesos biológicos de la planta, ya que en algunas ocasiones actúa como mecanismo de defensa contra patógenos, parásitos y

herbívoros por ataque al invasor una vez que la célula de la planta hace lisis y en otras ocasiones actúa como cicatrizante (Vierstra, 1996).

La jaca (*Artocarpus heterophyllus*) pertenece a la familia Moraceae, se cultiva ampliamente en regiones con clima tropical y produce látex en todas sus partes, el cual es una fuente de enzimas. Por ello, el objetivo de este proyecto fue identificar y caracterizar las proteínas con actividad de proteasa y lipasa del látex del fruto de jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.).

En el presente estudio, se identificó la presencia de actividad proteolítica y lipolítica en el látex de *Artocarpus heterophyllus* L. (jaca) por medio de zimogramas de sustrato. Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (ND-PAGE) revelaron que las proteínas con pesos moleculares (PM) de 30, 80, 123 y 172 kDa tienen actividad proteolítica. Asimismo, la actividad lipolítica se identificó en las proteínas con PM de 75, 123 y 163 kDa. Sin embargo, no se observó actividad proteolítica ni lipolítica en los geles SDS-PAGE renaturalizados, lo cual sugiere que puede tratarse de enzimas multiméricas o un complejo multienzimático. Esto apoyado en los resultados obtenidos en la 2-DE que mostraron proteínas con PM de 70 y 75 kDa y *pI* de 8.5 y 8.9, respectivamente. Que una vez separadas no mostraron actividad después de haber sido renaturalizadas en los geles de poliacrilamida.

II - REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. La planta de jaca

El árbol de jaca, *Artocarpus heterophyllus* Lam., es importante en regiones tropicales y subtropicales. La jaca se ha cultivado en India desde tiempos remotos y ahora se ha propagado a lo largo de los trópicos (Haq, 2006).

El género *Artocarpus* es uno de los miembros de la familia Moraceae, familia que incluye cierto número de especies económicamente importantes. La jaca es considerada como una especie que merece atención e investigación por su amplio potencial a aumentar los ingresos locales (Haq, 2006). El género contiene alrededor de 60 especies que producen un fruto múltiple (un sincarpio), estando los aquenios rodeados de pulpa carnosa (Haq, 2006).

2.1.1. El árbol de jaca

El árbol es siempre verde, alcanzando 10 a 20 m de altura (Fig. 1-B), en ocasiones llegando hasta los 30 m, con raíces largas y una corona densa. La corona es cónica cuando los árboles son jóvenes o crecen bajo la sombra; el tronco alcanza un diámetro de 3.5 a 6.7 m a los cinco años (Haq, 2006). Su madera es dura y las hojas son de color verde oscuro de forma ovalada (Fig. 1-A y 1-B). Todas las partes del árbol contienen látex blanco y pegajoso (Fig. 1-C). Es un árbol con larga vida, generalmente de 60 a 70 años (SCUC, 2006).



Figura 1. Morfología general de la planta de jaca.

A) El tronco, la corona y las ramas del árbol. **B)** La altura que alcanza el árbol de jaca va de 10 a 20 m y los frutos cuelgan a diferentes alturas. **C)** El látex se encuentra en el árbol, las ramas y el fruto.

2.1.2. El fruto

La jaca produce un sincarpio grande amarillento con longitud de 30 a 100 cm y de 25 a 50 cm de diámetro, de forma cilíndrica a forma de pera que cuelga de un tallo grueso. La superficie del fruto es verrugosa con numerosas secciones piramidales sobresalientes (Fig. 2-A). En el interior, la fruta se mantiene unida por un núcleo central fibroso, como se muestra en la Fig. 2-B. El fruto mide de 30-40cm de longitud y llega a pesar hasta 50 kg (Haq, 2006; Prakash *et al.*, 2009).

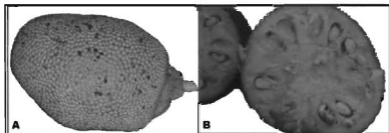


Figura 2. El fruto de jaca.

A) La pared del fruto es gruesa, verrugosa y con numerosas secciones piramidales sobresalientes. **B)** La jaca es un fruto sincárpico, donde el pericarpio carnoso rodea a las semillas, siendo cada uno un fruto individual.

2.1.3. Producción de jaca en México

En México, al fruto de jaca se le da un uso comercial enfocado a la alimentación, del fruto completo o de la parte netamente comestible. La industrialización de productos derivados del fruto es mínima y está enfocada a la obtención de subproductos del fruto. La producción nacional del fruto se concentra en los estados de Nayarit, Colima, Jalisco, Veracruz, Michoacán y Sinaloa generando una producción de 10,103.25 toneladas en el año 2012, siendo el estado de Nayarit el principal productor con 9,052.45 toneladas (SIAP, 2012) en el que a su vez el municipio de San Blas es el que produce más, seguido por los municipios de Bahía de Banderas y Compostela (SIAP, 2012).

| Entidad | Producción (Ton) |
|-----------|------------------|
| NAYARIT | 9,052.45 |
| COLIMA | 358.00 |
| VERACRUZ | 330.00 |
| SINALOA | 208.00 |
| JALISCO | 135.70 |
| MICHOACAN | 19.10 |
| | 10,103.25 |

Tabla 1 – Principales estados productores de jaca (SIAP, 2012)

| Municipio | Producción (Ton) |
|--------------------|------------------|
| SAN BLAS | 6,855.50 |
| COMPOSTELA | 1,659.20 |
| BAHIA DE BANDERAS | 157.50 |
| SANTIAGO IXCUINTLA | 153.00 |
| TEPIC | 96.00 |
| XALISCO | 60.00 |
| TECUALA | 49.00 |
| TUXPAN | 16.00 |
| ROSAMORADA | 6.25 |
| | 9,052.45 |

Tabla 2 – Producción de jaca por municipio, en el Estado de Nayarit (SIAP, 2012)

2.2. El látex

El látex es un fluido lechoso compuesto por un suero líquido que contiene, en suspensión o en solución, una mezcla compleja de componentes (Morcelle *et al.*, 2004). En el complejo emulsión/suspensión se encuentran proteínas, alcaloides, almidones, azúcares, grasas, taninos, resinas y gomas (Domsalla y Melzig, 2008). Miles de especies de plantas hacen uso de estructuras especializadas llamadas laticíferos para asegurar al menos parcialmente, su defensa. Los laticíferos presentan una intensa actividad metabólica. *In situ* contienen los organelos usuales de las células vegetales, incluyendo núcleo, plástidos, vacuolas, ribosomas, aparato de Golgi y retículo endoplasmático (Jacob *et al.*, 1989).

El látex también es rico en compuestos tales como sales, minerales, lípidos, carbohidratos y en particular sistemas complejos de membranas que pueden ser extraídos junto con las proteínas. (Duan *et al.*, 2006).

Los laticíferos se encuentran bajo presión positiva, lo que implica que, en respuesta a cortaduras o mordidas de predadores de plantas sobre éstos, resulta en una rápida expulsión de látex hacia el exterior (Huang *et al.*, 2003).

2.2.1. Distribución en la planta y función

El látex se encuentra ampliamente distribuido en las plantas, se ha reportado que de 12,000 a 35,000 especies lo contienen (Dussourd y Denno, 1991; Harborne, 1993), ubicadas dentro de 40 familias, aunque existe un número significativamente mayor de especies laticíferas en climas tropicales que en climas templados (Lewinsohn, 1991) El látex es una de las características más sobresalientes de las familias Asclepiadaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae y Moraceae (Rajesh *et al.*, 2005).

El látex de diversas plantas se ha estudiado desde hace varias décadas (Balakrishna y Seshadri, 1947; López *et al.*, 1989, Giordani *et al.*, 1991). Existen evidencias experimentales de que uno de los roles que se le han adjudicado al látex es como mecanismo de defensa contra el ataque de insectos (Sethi *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2010) y proteger contra infecciones por patógenos (Liggieri *et al.*, 2004) de dos maneras distintas: mecánicamente (por su coagulación sobre la herida) y

químicamente por la presencia de sustancias tóxicas (Kyndt *et al.*, 2007). Además, las sustancias tóxicas han mostrado tener un impacto negativo tanto en la tasa de alimentación de los insectos, como en el estado de salud de los predadores (Malcolm y Zalucki, 1996).

Por otro lado, también se ha descrito ampliamente la presencia de enzimas en el látex de diferentes especies, se han detectado lipasas y principalmente proteasas (Bertoluzzo *et al.*, 2008; Caro *et al.*, 2000; Cavalli *et al.*, 2003; El Moussaoui *et al.*, 2001) como la papaína y la ficina, dos de las proteasas de mayor aplicación industrial (Caffini *et al.*, 1988) y que provienen del látex de frutos de *Carica papaya* (Caricaceae) y de *Ficus carica* o *F. glabrata* (Moraceae), respectivamente.

2.2.2. Características fisicoquímicas básicas del látex de jaca

La jaca es una planta que produce látex en todos sus órganos. Pocos han sido los análisis realizados al látex de jaca, entre ellos se ha determinado la presencia de 4-hidroxiundecil docosanoato y cicloartenona como ésteres de ácidos grasos (Pant y Chaturvedi, 1989), el látex del árbol y del fruto tienen la misma composición. Además de proteínas y minerales los dos contienen un alto porcentaje de materia cerosa (Balakrishna y Seshadri, 1947).

2.3. Las enzimas

Las enzimas tienen un gran número de ventajas sobre los catalizadores químicos convencionales: su especificidad y selectividad, no solo para algunas reacciones en particular, sino también en su discriminación entre partes similares de una molécula (regioespecificidad) o isómeros ópticos (estereoespecificidad). Pueden catalizar sólo las reacciones de rangos de sustratos muy estrechos, lo que consiste en un número pequeño de clases de compuestos relacionados estrechamente o un solo compuesto. Además, el producto es generado en un estado sin contaminar, lo que reduce el costo de purificación y la carga ambiental. A menudo se requieren pocos pasos para obtener el producto final deseado. Las enzimas trabajan bajo condiciones de procesamiento generalmente moderadas de temperatura y pH. Esto disminuye los

requerimientos de energía y reduce reacciones secundarias indeseables (Shanmugan y Sathishkumar, 2009).

2.3.1. Propiedades físicas y químicas de las enzimas

Como las enzimas son proteínas combinadas con otros grupos químicos, poseen las mismas propiedades y características de las proteínas: se desnaturalizan con el calor, precipitan con el etanol o concentraciones elevadas de sales inorgánicas como el sulfato de amonio y no dializan a través de membranas semipermeables (Obregón, 2008).

2.4. Enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas, EC 3.4) hidrolizan los enlaces peptídicos de otras proteínas con diferentes grados de intensidad y de selectividad, modificando su estructura y la actividad catalítica de las enzimas (Dubey *et al.*, 2007).

Las enzimas proteolíticas tienen la habilidad de llevar a cabo modificaciones selectivas de proteínas por escisión limitada, tales como la activación de formas zimogénicas de enzimas, coagulación de la sangre, lisis de coágulos de fibrinas (fibrinólisis) y procesamiento y transporte de proteínas a través de las membranas (Rao *et al.*, 1998). También son utilizadas en procesos biológicos cruciales tales como regulación del metabolismo, sistema complementario, rutas de apoptosis, etc. (Rani *et al.*, 2012). Además, se utilizan en varias formas de terapias médicas y tienen gran importancia como reactivos en procesos de laboratorio, clínicos e industriales (Rao *et al.*, 1998).

Las proteasas también son reguladores clave. Determinan irreversiblemente el destino de otras proteínas y regulan diferentes procesos en respuesta a señales de desarrollo y ambientales. Esto implica que las proteasas tienen un sustrato específico y que su actividad está estrechamente regulada en tiempo y en espacio (van der Hooft, 2008).

2.4.1. Clasificación de las proteasas

Dependiendo del sitio de acción, las proteasas o peptidasas se clasifican en dos grandes grupos: las endopeptidasas – que rompen uniones peptídicas en las regiones internas de la proteína – y las exopeptidasas – que rompen el enlace peptídico próximo al término amino o carboxilo del sustrato (Rani *et al.*, 2012).

Las endopeptidasas son divididas en cuatro sub-grupos de acuerdo a los residuos catalíticos en su sitio activo: serinproteasas, aspartoproteasas, cisteinproteasas y metaloproteasas. (Rani, 2012).

- Las serinproteasas se caracterizan por la presencia de un grupo serínico en su sitio activo. Todas las serinproteasas contienen tres residuos en su sitio activo: una serina, una histidina y un aspartato, que comprenden la tríada catalítica característica. Generalmente son activas a pH neutro y alcalino, siendo el óptimo entre 7 y 11. Tienen amplia especificidad de sustrato incluyendo actividad esterolítica y amidasa.
- Las proteasas aspárticas, comúnmente conocidas como proteasas ácidas, son las endopeptidasas que dependen de dos residuos conservados de ácido aspártico para su actividad catalítica. La mayoría de las proteasas aspárticas muestran su actividad máxima a pH bajo (pH de 3 a 4) y tienen puntos isoeléctricos en el rango de pH 3 a 4.5.
- Las cisteinproteasas se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes. La actividad de todas las cisteinproteasas depende de una díada catalítica compuesta por cisteína e histidina. Tienen pH óptimo neutro, sin embargo algunas de ellas, por ejemplo las proteasas lisosomales, tienen su máxima actividad a pH ácido. Las cisteinproteasas catalizan la hidrólisis de derivados del ácido carboxílico a través de una ruta de doble desplazamiento que involucra la formación general de ácido-base y la hidrólisis de un intermediario acil-tiol.
- Las metaloproteasas son las más diversas de las proteasas. Se caracterizan por su requerimiento de un ión metálico divalente para su actividad. Las proteasas neutras muestran especificidad por aminoácidos hidrofóbicos,

mientras que las alcalinas poseen una amplia especificidad (Mahajan y Badgujar, 2010).

Por otro lado, las exopeptidasas actúan sólo cerca de los extremos de la cadena polipeptídica. Basándose su sitio de acción en el extremo amino (NH_2) o carboxilo (COOH), se clasifican en aminopeptidasas y carboxipeptidasas, respectivamente (Rani *et al.*, 2012).

- De acuerdo a su sitio de acción en un amino terminal libre, existen las aminopeptidasas, dipeptidil peptidasas o tripeptidil peptidasas que liberan residuos de un solo aminoácido, un dipéptido o un tripéptido, respectivamente. Se sabe que remueven la metionina N-terminal que puede ser encontrada en proteínas heterológamente expresadas, pero no en muchas proteínas maduras que se dan naturalmente (Mahajan y Badgujar, 2010).
- Las carboxipeptidasas, liberan un solo aminoácido o un dipéptido. Estas se dividen a su vez en tres principales grupos: serin, metalo y cistein carboxipeptidasas basándose en el grupo funcional presente en su sitio activo (Dos Santos, 2011).

La presencia de las terminales libres amino y carboxilo tendrán un impacto negativo en la actividad de la enzima (Rao *et al.*, 1998).

2.4.2. Mecanismo de acción de las proteasas

Todas las proteasas se unen al sustrato en una hendidura donde ocurre la hidrólisis del enlace peptídico (Fig. 3). Los residuos de aminoácidos del sustrato (P) se unen a subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser hidrolizado, hacia el N-terminal como P_1 , P_2 , P_3 , etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P_1' , P_2' , P_3' , etc. Los subsitios de la proteasa que embonan con los residuos del sustrato se numeran como S_1 , S_2 , S_3 y S_1' , S_2' , S_3' , respectivamente (Barrett *et al.*, 2004).

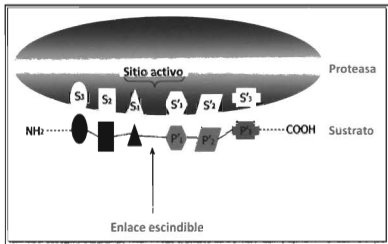


Figura 3. Representación esquemática de la región de unión del sitio catalítico de una proteasa. Esta proteasa hipotética posee seis subsitios (S1-S3 y S1'-S3') en su sitio catalítico, como consecuencia, es capaz de reconocer y unirse a seis aminoácidos (P1-P3 y P1'-P3') al sustrato. Después de la proteólisis, se generan por lo menos dos péptidos más pequeños como productos de la reacción (Schecter y Berger, 1967).

2.5. Enzimas lipolíticas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas ubicuas que catalizan la hidrólisis de grasas y aceites con la subsecuente liberación de ácidos grasos, diacilglicerolos, monoacilglicerolos y glicerol, rompiendo y modificando los enlaces éster de los lípidos y sus derivados (Villeneuve *et al.*, 2000). También catalizan reacciones de síntesis, tales como esterificación, aminólisis, transesterificación (acidólisis, alcoholólisis e interesterificación), oximólisis y tiotransesterificación (Villeneuve *et al.*, 2000). Su pH óptimo es generalmente de 7 a 8 (Lehninger, 2009).

La presencia de actividad lipolítica en el látex de varias familias de plantas, incluyendo Asclepiadaceae, Moraceae, Apocynaceae, Euphorbaceae, Caricacea y Bromeliacea se ha reportado desde 1935 (Paques y Macedo, 2006). La función de estas enzimas no ha sido completamente elucidada; sin embargo, se sabe que están

involucradas en el metabolismo de terpenos y en la defensa de la planta contra agentes externos (Rivera *et al.*, 2012).

2.5.1. Clasificación de las lipasas

Las lipasas son clasificadas de la siguiente forma:

1. Regioselectivas – subdivididas en:
 - a) Lipasas no específicas – hidrolizan ésteres de ácidos grasos primarios o secundarios, liberando ácidos grasos en la posición 1(3) o 2;
 - b) Lipasas 1,3-específicas – hidrolizan sólo ésteres de ácidos grasos primarios en las posiciones 1 o 3. Aunque existen algunos estudios en la literatura sobre una lipasa de *Candida antarctica* que hidroliza en la posición 2.
1. Tiposelectivas con relación al tamaño de cadena carbónica y/o el número de insaturaciones del grupo acilo.
2. Enantioselectivas (Paques y Macedo, 2006).

2.5.2. Mecanismo de acción de las lipasas

El mecanismo de hidrólisis incluye al aminoácido nucleofílico serina, un residuo ácido (usualmente aspartato, o en ocasiones glutamato) y una histidina (tríada catalítica). (Chahinian *et al.*, 2006).

En el mecanismo catalítico de las lipasas (desarrollado en la Fig. 4) están implicados los aminoácidos que conforman la tríada catalítica, con las siguientes etapas:

1. El sustrato ($R_1\text{-COOR}_2$) accede al centro activo de la enzima (complejo enzima-sustrato), situándose de forma que el carbono carbonílico es atacado por la serina catalítica, a través de su grupo hidroxilo activado. Esta activación se produce por la colocación especial de los tres aminoácidos catalíticos, que provoca una disminución del valor de pK del grupo hidroxilo de la serina: el protón del grupo -OH de la serina es captado por el nitrógeno N_ϵ del anillo imidazólico de la His del centro activo, cuya carga positiva es estabilizada por el aspartato (o glutamato) que formó parte de la tríada. Se forma así, el primer

intermedio tetraédrico (I). La carga negativa, en principio situada en el oxígeno O_{γ} de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originándose un oxianión, el cual es estabilizado a través de la formación de uno o varios puentes de hidrógeno con los aminoácidos que constituyen el "hueco oxianiónico".

2. El intermedio tetraédrico se rompe al transferirse al oxígeno del alcohol saliente, el protón previamente cedido a la His, liberándose el alcohol y formándose el complejo acil-enzima.
3. Se produce un segundo ataque nucleofílico por parte del segundo sustrato R_2-OH (H_2O en sistemas biológicos), previa activación similar a la descrita en el apartado 1, sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima, formándose un nuevo intermedio tetraédrico (II).
4. El intermedio tetraédrico II colapsa tras la cesión al oxígeno de la serina del H captado por la His a partir del nucleófilo atacante, liberándose el producto (un ácido graso como producto natural) y regenerándose la serina catalítica (Hernández, 2012).

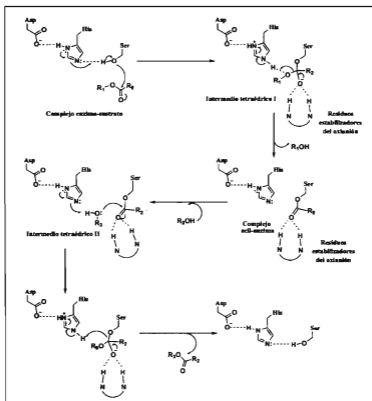


Figura 4. Mecanismo de hidrólisis de las lipasas. (Tomado de Hernáiz, 2012)

2.6. Aplicaciones de las enzimas proteolíticas y lipolíticas

Se estima que en el mundo las industrias que aplican enzimas para sus productos invierten anualmente cerca de un billón de dólares en su comercialización, de las cuales el 75% son enzimas hidrolíticas; de este porcentaje, las proteasas representan el 60% de total de las ventas mundiales (Rao *et al.*, 1998).

Las proteasas se utilizan en el procesamiento de los alimentos, en el ablandamiento de las carnes, en la elaboración de quesos y panes, en las industrias textiles y del cuero, entre otros (Natalucci *et al.*, 2000).

Además, algunas proteasas también han sido utilizadas como sistemas modelos para el estudio de la relación estructura-función. (Yadav *et al.*, 2006). Con la biología molecular en auge, las enzimas proteolíticas se han convertido en un campo fértil en investigación básica y aplicada (Dubey *et al.*, 2007).

Las enzimas proteolíticas que provienen de fuentes vegetales han recibido una atención especial en la industria farmacéutica, alimentaria, médica y biotecnológica, debido a que son activas en un amplio rango de pH y temperatura; es por ello que la búsqueda de nuevas proteasas vegetales con aplicabilidad industrial es continua (Yadav *et al.*, 2006); de este grupo, las mejor conocidas por tener valor comercial son la papaína (de *Carica papaya*), la ficina (de *Ficus spp.*) y la bromelina (de *Ananas comosus*) (Liggieri *et al.*, 2004).

Por otro lado, las lipasas son catalizadores naturales ampliamente empleados para estructurar lípidos, grasas y aceites en las industrias de los agroquímicos, cosmética, farmacéutica, alimentaria y componentes aromáticos (Jaeger y Egger, 2002; Palocci *et al.*, 2005). Así como también han cobrado gran atención por su potencial aplicación en biotecnología (Rivera *et al.*, 2012).

En la industria alimentaria existe un interés creciente en el estudio y aplicación de lipasas como catalizadores alternativos a los utilizados, en especial en la industria oleaginosa, para poder reutilizar los aceites de fritura luego de un tratamiento enzimático. También se utilizan para afectar las características de sabor en algunos alimentos, sobre todo en la industria de los quesos, creando sabores característicos (Mathewson, 1998); asimismo, en la industria de la leche y los quesos para la

elaboración de productos bajos en grasas y colesterol, en panadería para mejoramiento de sabores y en la industria de las bebidas.

La caracterización de las lipasas no sólo en reacciones hidrólisis de triglicéridos, sino también en reacciones de síntesis constituye un paso necesario para expandir el campo de aplicación a otros campos (Foresti *et al.*, 2005). Sin embargo, la aplicación de las lipasas vegetales a escala industrial es complicada debido a la dificultad de extraerlas y de obtener suficiente cantidad de lipasa del material vegetal (Villeneuve, 2003). Para superar este problema, clonarias y expresarlas en un huésped adecuado es una alternativa que puede ser explorada (Rivera *et al.*, 2012).

En la actualidad se buscan alternativas en plantas para la extracción de enzimas, que sean factibles de ser utilizadas en diversos procesos. El látex es una fuente de enzimas que actualmente se está explorando ampliamente; proviene de de las células laticíferas de un gran número de plantas de las familias: Apocynaceae, Caricaceae, Euphorbiaceae y Moraceae (Teixeira *et al.*, 2008; Tomar *et al.*, 2008).

III – JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el uso de enzimas en los procesos industriales ha aumentado debido a las ventajas que presentan al ser utilizadas sustituyendo a reactivos químicos y sustancias sintéticas, reduciendo el número de reacciones en el proceso y la formación de productos secundarios, además de ser empleadas en pequeñas cantidades para la transformación de grandes cantidades de sustrato en productos. El 75% de las enzimas utilizadas en la industria corresponden a la clase de las hidrolasas, grupo en el que se incluyen, entre otras, las proteasas y las lipasas.

Las enzimas proteolíticas que provienen de fuentes vegetales son activas en un amplio rango de pH y temperatura, permitiendo ahorro de tiempo y costo de producción, mejorando el aprovechamiento de las materias primas y subproductos, así como la generación de desechos menos perjudiciales para el medio ambiente.

Las lipasas vegetales también trabajan en amplios rangos de temperatura y pH, además que también realizan reacciones de síntesis. La búsqueda de nuevas fuentes de lipasas vegetales se ha identificado en los últimos años debido al elevado costo de lipasas animales y microbianas, lo que restringe su uso a escala industrial.

El tiempo utilizado para obtener una enzima pura utilizando métodos tradicionales es prolongado; sin embargo, el progreso de la biotecnología enzimática nos permite obtener enzimas en tiempos cortos e identificar sus actividades. El látex de las plantas es una fuente rica de enzimas con actividades diversas, por lo que es una excelente alternativa para identificar y caracterizar sus componentes enzimáticos, lo cual convierte al látex de jaca en una potencial fuente de proteasas y lipasas cuyas propiedades bioquímicas no han sido caracterizadas y que pueden ser adecuadas para su aplicación en procesos industriales.

IV – HIPÓTESIS

El látex de jaca contiene proteínas con actividad de proteasa o lipasa con características bioquímicas potenciales de ser utilizadas en el procesamiento de alimentos.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar proteínas con actividad de proteasa y lipasa en el látex del fruto de jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.).

5.1.1. Objetivos específicos

- Estandarizar el método de extracción por solubilidad de proteasas y lipasas del látex de jaca.
- Identificar por zimogramas la actividad de proteasas y lipasas.
- Separar las proteínas por cromatografías de filtración en gel e intercambio iónico.
- Caracterizar por 2-DE las proteasas y lipasas identificadas en el látex de la jaca.

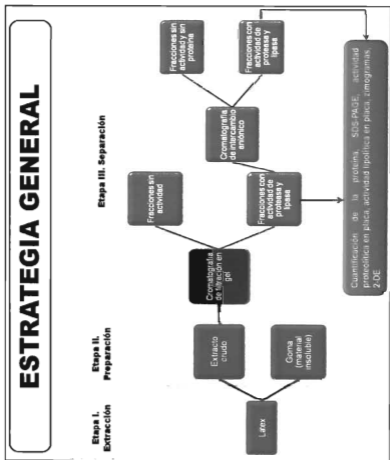


Figura 5. Estrategia experimental general.

6.1. Material vegetal

Los frutos fueron obtenidos de una huerta del poblado Benito Juárez, municipio de Tepic, Nayarit en el periodo de enero a julio de 2012. Fueron cortados del árbol en un estado de madurez fisiológica, evidenciado por el tamaño y color del fruto. Se eligieron frutos que no presentaran daño físico o patológico.

6.2. Recolecta del látex

El látex se obtuvo a partir del pedúnculo de los frutos recién cortados del árbol. Una vez identificado el fruto de interés, se cortó del árbol y se colocó invertido en un tripié, de tal manera que el látex fuera recuperado en tubos de centrifuga estériles (Nalgene, 3110-0050), como se muestra en la Fig. 6. Los tubos fueron colocados inmediatamente sobre hielo para su traslado al laboratorio para evitar la degradación de las enzimas.



Figura 6. Colecta del látex.

El fruto recién cortado se invierte y se apoya en un tripié para recibir el látex en tubos estériles.

6.3. Obtención del extracto crudo (fase acuosa)

Una vez en el laboratorio, el látex se pesó y se le agregaron dos veces el peso del látex en volumen de buffer de fosfatos 0.2 M que contiene ácido cítrico 0.1M, EDTA 5 mM y cisteína 5 mM, pH 6.4 (Liggieri *et al.*, 2009) a una temperatura de 4°C. La suspensión fue primero sometida a centrifugación a 8,000 x g (HERMLE, Z 326 K, rotor 221.18) por 30 minutos a 4°C. Se descartaron los materiales insolubles y al sobrenadante se le agregó el equivalente a 1 volumen más del mismo buffer y se centrifugó a 10,000 x g por 30 minutos a 4°C. La nueva fase acuosa se almacenó a -20°C para las pruebas posteriores.

6.4. Liofilizado del extracto crudo

Para evitar su posterior degradación enzimática, los extractos crudos fueron secados por liofilización (LABCONCO, Free Zone 2.5) a una temperatura de -54°C por 24 horas, hasta observar la formación de un polvo fino. Este polvo se conservó a temperatura ambiente.

6.5. Cuantificación de la proteína soluble

La cuantificación de proteínas en el extracto acuoso se llevó a cabo por el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich No.Cat. B6916). Para realizar la curva de calibración se utilizó albúmina de suero bovino como estándar (Calbiochem, CAS 9048-46-8) en un rango de concentraciones de 0.1 a 1.4 mg/ml diluido en el mismo buffer en que se encuentra la muestra (sección 6.3.) y se utilizó éste mismo buffer como blanco. Se tomaron muestras del extracto crudo sin diluir, y diluciones 1:5 y 1:10, por triplicado para su cuantificación. Se tomaron 5 uL de muestra y se colocaron, cada una, en un pocillo de una microplaca de 96 pozos. Posteriormente, se le agregaron 250 uL del reactivo de Bradford. Se dejó reaccionar la muestra por 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector espectrofotométrico de microplacas (Power Wave XS, Biotek). Se graficaron los datos de absorbancia neta contra la concentración conocida de proteína y para determinar la concentración de proteínas de las muestras se compararon los valores de la absorbancia de las muestras contra la curva estándar. De las dos repeticiones

que se hicieron para cada muestra, se calculó el promedio de ambas y esto se reportó como concentración de proteína de la muestra.

6.6. Métodos electroforéticos

6.6.1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

El extracto crudo se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida a diferentes concentraciones en condiciones desnaturizantes en un equipo Miniprotean Tetra System (Bio-Rad) (Laemmli, 1970). Las muestras se sometieron a baño de ebullición por 5 minutos en presencia del buffer de muestra (20 μ L). La corriente se mantuvo constante a 100 mV por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie Brillante R-250 (Sigma-Aldrich, 27816). Se realizó una curva estándar con los Rf del marcador de peso molecular Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (Bio-Rad, 161-0318) y posteriormente se calculó el Rf (sección 2.7.1) de las proteínas para estimar los pesos moleculares (ver Anexo A) (Sambrook *et al.*, 1989).

6.6.2. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (ND-PAGE)

Para observar a las enzimas en sus condiciones nativas y detectar su actividad, se corrieron geles a concentraciones de 8 y 12% en condiciones no desnaturizantes, esto es, en ausencia de SDS y de β -ME. Las muestras no se sometieron a baño en temperatura de ebullición (ver Anexo A) (Sambrook *et al.*, 1989).

6.6.3. Determinación del peso molecular de las proteínas

Los pesos moleculares de las proteínas en las muestras de látex se calcularon con base en la movilidad relativa de proteínas de peso molecular conocido (marcador de peso molecular). En función de su movilidad (Rf) en geles de poliacrilamida, primero se midió la distancia recorrida por cada una de las proteínas estándar en milímetros, y se graficaron los valores del logaritmo en base 10 (log) de los pesos moleculares de estas proteínas contra el valor de Rf de cada una. El Rf se calcula dividiendo la distancia recorrida por la banda proteica entre la longitud de corrida total del gel. Una vez construida la curva estándar, se obtiene una ecuación lineal.

Conociendo la distancia de migración de las proteínas en las muestras, se determinaron los pesos moleculares utilizando la ecuación lineal obtenida y finalmente aplicando la inversa del logaritmo en base 10 (10^x).

6.7. Actividad proteolítica en placa

Del extracto crudo, se agregó el equivalente a 20 mg/ml de proteína total a placas de Petri con geles de grenetina preparados a una concentración de 8% y se incubaron por un periodo de 15 horas a temperatura ambiente (Huber-Baur *et al.*, 2008).

De esta misma forma se probaron las fracciones obtenidas de la cromatografía de filtración en gel y las cromatografías de intercambio iónico.

6.8. Identificación de proteínas por actividad caseinolítica (zimogramas)

En esta técnica se hicieron modificaciones a la metodología empleada por Westergaard *et al.* (1980) y Liggieri *et al.* (2009).

Se prepararon geles de sustrato, que consisten en geles de agarosa (1%) disuelta en glicina-NaOH 0.1 M, pH 9.75, dispuestos sobre vidrios de tamaño similar a los moldes de los geles de poliacrilamida. Una vez polimerizada la agarosa, el gel fue sumergido durante 20 minutos en una solución de caseína 1% (preparada en buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0) con cisteína 20 mM y enjuagado con agua destilada. Se retiró el exceso de agua destilada y cada gel se puso en contacto con otro gel ND-PAGE al 8%, en los que se cargaron las fracciones con los valores más altos de absorbancia, evitando la formación de burbujas entre ellos.

El conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda e incubado en una estufa a 50°C por 10 minutos y posteriormente a temperatura ambiente por 15 horas. Después, el gel de agarosa fue teñido con Azul de Coomassie Brillante R-250 (Sigma-Aldrich, No.Cat. 27816) y desteñido en solución fijadora. La actividad proteolítica se observó como bandas claras en el gel de agarosa teñido (Liggieri *et al.*, 2009; Westergard *et al.*, 1980).

6.9. Identificación de proteínas por actividad lipolítica (zimogramas)

En esta técnica se hicieron modificaciones a la metodología empleada por Turner y colaboradores (2001).

Se prepararon geles de sustrato que consisten en geles de agar (1.5%), púrpura de bromocresol (0.5%), tributirina (0.5%) y tween 20 (0.1%). Los geles se prepararon de la siguiente manera: primero se agregaron la tributirina y el tween 20 en el 50% de agua destilada a 60°C y se sometió a agitación por sonicación para tratar de obtener una emulsión homogénea. Cuando se formó espuma y las gotitas de tributirina eran muy pequeñas, la emulsión se pasó a una placa caliente para llevarla a ebullición (con agitación constante) y se agregó el agar. Cuando el medio se tornó transparente se agregó el resto de agua y el púrpura de bromocresol. Finalmente, se agregaron gotas de NaOH 0.1 N hasta observar un color azul oscuro (pH 7.5 - 8.0). El medio se vació a vidrios de tamaño similar a los moldes de los geles de poliacrilamida. Cada gel se puso en contacto con otro gel ND-PAGE al 8%, en los que se cargaron las fracciones con los valores más altos de absorbancia, evitando la formación de burbujas entre ellos.

El conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda e incubado por 20 horas a temperatura ambiente. La actividad lipolítica se observó como bandas claras o ausencia de color azul en el gel de sustrato. Se utilizó el mismo procedimiento para los extractos crudos y para todas las fracciones obtenidas de la cromatografía de filtración en gel y las cromatografías de intercambio iónico.

6.10. Cromatografía de filtración en gel

Primero, se preparó una suspensión con el liofilizado del extracto crudo con una concentración final de 10 mg/ml de proteína. La suspensión se pasó por un filtro Millex de 0.22 μ m estéril. De esta suspensión se cargaron 0.5 ml a una columna Econo-Column (Bio-Rad) empacada con Sefinose Fast Flow SF006-6F (Bio Basic Inc.). Se utilizó como fase móvil buffer de Tris-HCl 25 mM, pH 8.8. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min y se recolectaron 80 fracciones de 0.5 ml que fueron almacenadas a -20°C. De cada fracción se tomaron 200 μ l y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 (Sintapetawee y Thammasinrak, 2011) y 220 nm. Se

probó la actividad proteolítica en placa (sección 6.9) de cada una de las fracciones. Así mismo, se realizaron zimogramas de las actividades caseinolítica (sección 6.10) y lipolítica (sección 6.11) de las fracciones con presencia de proteína.

6.11. Cromatografías de intercambio iónico

Una vez identificadas las fracciones de la cromatografía de filtración en gel que presentaron actividad proteolítica y lipolítica, se hizo un pool. De este pool, se tomó el equivalente a 0.4 mg y se cargó a una columna empacada con DEAE Sepharose (SIGMA, DCL-6B-100) y equilibrada con Tris-HCl 25 mM pH 8.8 como fase móvil. La velocidad de flujo (2 ml/min) se controló con una bomba peristáltica (Fisher Scientific, 13-876-2). Para eluir las proteínas se utilizó un gradiente escalonado de 0 a 0.5 M de NaCl (Siritapetawee *et al.*, 2012).

A todas las fracciones se les midió la absorbancia a 280 y 220 nm y las actividades proteolítica y lipolítica (sección 6.9 y 6.11) en placa. A las fracciones activas se les cuantificó la proteína soluble (sección 6.5), SDS-PAGE (sección 6.6), ND-PAGE (sección 6.7) y zimogramas (secciones 6.10 y 6.11).

6.12. Electroforesis en dos dimensiones

Estos ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Primero, se identificaron las fracciones con actividad de las cromatografías:

- Cromatografía de filtración en gel: Fracciones 11 a 20
- Cromatografía de intercambio aniónico: Fracciones 60 a 78

De estos dos conjuntos de fracciones activas, se hizo el respectivo pool, en los cuales se cuantificó la proteína soluble. Para concentrar las proteínas, se tomaron 2 ml de cada pool por separado. A cada tubo se agregaron 4 volúmenes de acetona a -20°C y se agitó en vórtex por 1 minuto. Cada tubo fue incubado por 1 hora a -20°C. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 15,000 x g por 15 minutos a 4°C; se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet.

El pellet fue resuspendido en 125 μ L de buffer de rehidratación (urea 8 M, CHAPS 2% (m:v), buffer IPG 2% (m:v), azul de bromofenol 1% y DTT 2.8 mg/ml) utilizando agitación en vórtex. Los 125 μ L del resuspendido de cada muestra, se distribuyeron en un carril de la bandeja de rehidratación. Cada extracto se corrió en electroforesis bidimensional, utilizando tiras de geles comerciales para IEF (tiras IPG Immobiline DryStrips, GE Healthcare, 17-6001-11) de 7 cm de longitud con rango de pH 3 a 10 y se colocaron con el gel boca abajo sobre la muestra. Las tiras IPG se cubrieron con Immobiline DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare, 17-1335-01) y se dejaron hidratando toda la noche.

Posteriormente, se realizó la electroforesis en primera dimensión en un equipo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare): las tiras IPG rehidratadas se colocaron en la bandeja colectora haciendo coincidir los electrodos sobre las almohadillas. Las condiciones de la corrida fueron:

Paso 1) 300 V (0:30, h:min), 0.2 kWh

Paso 2) 1,000 V (1:30, h:min), 0.3 kWh

Paso 3) 5,000 V (2:30), 4.0 kWh

Paso 4) 1,200 V (0:30, h:min), 1.0 kWh.

Una vez terminada la corrida, cada una de las tiras IPG se puso en contacto con el buffer de equilibrio (urea 6M, Tris-HCl 75 mM pH 8.8, Glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%) adicionado con 10 mg/ml de DTT por 10 minutos; con el objetivo de resolubilizar las proteínas y reducir los puentes disulfuro después del enfoque isoeléctrico. Inmediatamente, las tiras IPG se pusieron en contacto con el mismo buffer de equilibrio adicionado con 25 mg/ml de iodoacetamida, esto con el fin de evitar la oxidación de los grupos tiol durante la electroforesis (Pérez-Pérez, 2011). Se prepararon geles SDS-PAGE a una concentración del 10% en un sistema continuo. Cada una de las tiras se colocó en la parte superior de un gel y se selló con agarosa 1%. Las condiciones de la corrida fueron 150 mV por 80 minutos.

Al finalizar la corrida, los geles se tiñeron en solución con azul de Coomassie Brillante R-250 (Sigma-Aldrich, 27816) por toda la noche y después decolorados en solución fijadora por 2 horas.

VII. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Estandarización del método de recolección del látex y obtención del extracto crudo

En la primera etapa del proyecto se probaron diferentes métodos de recolección de látex, ya que por su consistencia espesa y pegajosa, es una sustancia de difícil manipulación. Se tomaron muestras de diferentes partes de los frutos, así como del árbol.

Las muestras de látex se identificaron y se nombraron de acuerdo a la parte de la que se obtuvieron, como se observa en la siguiente tabla:

| FECHA DE OBTENCIÓN | MUESTRA | OBTENIDO DE: | |
|---------------------|---------|--------------------------|---|
| 16 – Febrero – 2012 | A22 | Árbol de jaca | Ensayos preliminares de estandarización |
| 16 – Febrero – 2012 | F22 | Núcleo central del fruto | |
| 29 – Febrero – 2012 | C22 | Núcleo central del fruto | |
| 29 – Febrero – 2012 | P22 | Pedúnculo del fruto | |
| 26 – Marzo – 2012 | G22 | Pedúnculo del fruto | |
| 26 – Marzo – 2012 | H22 | Pedúnculo del fruto | |
| 28 – Marzo – 2012 | I22 | Pedúnculo del fruto | |
| 28 – Marzo – 2012 | J22 | Pedúnculo del fruto | |
| 12 – Julio – 2012 | CH | Pedúnculo del fruto | Etapa de separación |
| 12 – Julio – 2012 | GD | Pedúnculo del fruto | |

Tabla 3 . Identificación y nomenclatura de las muestras de látex.

Después de la centrifugación se obtuvieron tres fases: 1) la fase superior o cerosa (es una capa blanca, muy espesa, pegajosa y de difícil manipulación); 2) la fase acuosa (de color ligeramente café, semitransparente) y 3) la fase de sólidos insolubles o pastilla (Fig. 7). Las fases 1 y 3, se descartaron y se conservó sólo la fase acuosa.



Figura 7. Las tres fases en que separa el látex de jaca. En la figura se puede observar la fase superior o fase cerosa (de color blanco); la fase acuosa (de color café claro) y los sólidos insolubles al fondo del tubo.

El buffer que se utilizó para la extracción está adicionado con EDTA 5 mM, lo que impide la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo (Anderson, 1968) y con cisteína 5 mM para mantener el medio reductor y para evitar la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas (Liggieri *et al.*, 2009). Así mismo, el pH del tampón está lo suficientemente alejado del pH óptimo reportado de las proteasas aisladas del látex de jaca, que es 8.0 (Prasad y Virupaksha, 1990; Siritapetawee *et al.*, 2012), lo que minimiza la autodigestión durante los procesos de extracción y purificación.

7.1.1. Cuantificación de la proteína soluble en los extractos crudos

A los extractos crudos se les determinó la concentración de proteína total por el método de Bradford (1976).

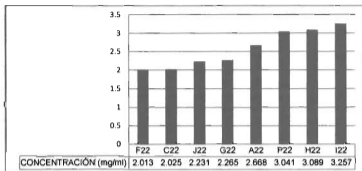


Figura 8. Concentración de proteína en los extractos crudos del látex de jaca, obtenidos con diferentes metodologías. Para referencias del origen de la muestra, ver Tabla 3.

Cabe mencionar que las muestras H22, I22 y J22 fueron tomadas del mismo fruto en el día 0 (día del corte del fruto, muestra H22), a los 2 días después del corte (I22) y a los 4 días posteriores al corte (J22). Obteniendo menor cantidad de látex conforme el fruto va madurando, por lo que se obtiene menor contenido de proteína.

7.1.2. Patrones electroforéticos de las proteínas presentes en el látex del árbol y fruto de la jaca

Los corrimientos electroforéticos en condiciones desnaturizantes mostraron un patrón proteico de al menos 13 bandas con pesos moleculares de los 7 a los 105 kDa en geles, como se puede observar en la Fig. 9.

Los resultados mostraron un patrón electroforético similar en los extractos crudos de látex de diferente fuente de obtención. Asimismo, los estudios realizados por Balakrishna y Seshadri, (1947) en su investigación con látex de jaca, habían reportado que el látex del árbol y del fruto tienen la misma composición, y que además de proteínas y minerales los dos contienen un alto porcentaje de materia cerosa.

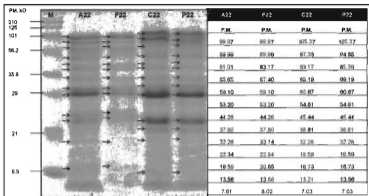


Figura 9. Electroforesis en gel SDS-PAGE (16%) y tabla de pesos moleculares. M) Marcador de peso molecular Prestained (Bio-RAD); A22) látex de árbol; F22) núcleo central del fruto, C22) núcleo central del fruto, P22) pedúnculo del fruto. En cada carril se cargó el equivalente a 20 ug de proteína. En la tabla se muestran los pesos moleculares obtenidos calculando el Rf de las proteínas.

De esta manera se determinó que el mejor método de extracción de látex es tomarlo directamente del pedúnculo de un fruto en estado de madurez fisiológica recién cosechado, lo que facilita su manipulación y reduce el riesgo de contaminación.

Los extractos crudos fueron liofilizados, la figura 10 muestra que el extracto crudo conserva su patrón electroforético después del proceso de liofilización, es decir, no se observa degradación en las proteínas.

El proceso de liofilización presenta ventajas en este tipo de estudios, ya que retarda el proceso de autodegradación en las muestras, permite preparar suspensiones con concentraciones específicas y las muestras pueden ser conservadas a temperatura ambiente, ocupando un espacio reducido y por largos periodos de tiempo. A pesar de esto, se han encontrado pocos reportes de su aplicación en investigaciones similares (Freitas *et al.*, 2007).

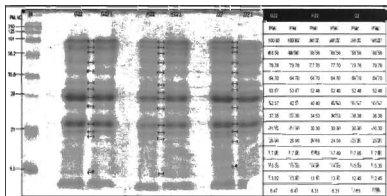


Figura 10. Verificación de la calidad de las proteínas posterior al proceso de liofilización. SDS-PAGE (16%) M) Marcador de peso molecular Prestained (Bio-RAD); G22) sin liofilizar; G22 L) liofilizado; H22) sin liofilizar; H22) liofilizado; I22) sin liofilizar; I22) liofilizado. En cada carril se cargó el equivalente a 20 ug de proteína. En la tabla se muestran los pesos moleculares obtenidos calculando el Rf de las proteínas.

7.1.3. Ensayo de la actividad proteolítica en placa

Los extractos crudos presentaron actividad proteolítica en geles de gretetina al 8% (Fig. 11). La actividad se presenta como halos de hidrólisis en el gel. También se comprobó que está actividad no se ve afectada por el proceso de liofilización.

7.1.4. Ensayos de la actividad lipolítica en placa

Los extractos crudos probados en geles de agar-tributirina 0.5% en placa, presentaron actividad lipolítica (Fig. 12)

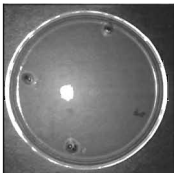


Figura 11– Pruebas de actividad proteolítica en placa. Geles de grenetina (8%). Se muestran los halos de hidrólisis del extracto crudo como el gel licuado o convertido a líquido (actividad proteolítica).

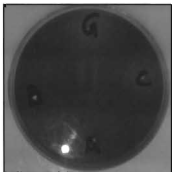


Figura 12 – Pruebas de actividad lipolítica en placa. Geles de agar-tributina (0.5%). Se muestran los halos de hidrólisis del extracto crudo, como el cambio de coloración de azul a amarillo (actividad lipolítica).

7.1.5. Zimogramas de actividad proteolítica

Las muestras del extracto crudo fueron corridos en condiciones nativas (ND-PAGE) al 8% de poliacrilamida, donde se observaron bandas de pesos moleculares de 215, 172, 164, 145, 139, 133, 123, 117, 91 y 75 kDa; e incubadas en gel de sustrato para la actividad de proteolítica, en zimograma, observando actividad en las bandas en el rango de 133 a 172 kDa (Fig. 13).

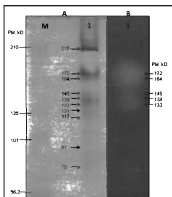


Figura 13. Electroforesis en gel y zimograma de actividad proteolítica. A) Gel de poliacrilamida al 8% en condiciones nativas. M) marcador de peso molecular. 1) Extracto crudo de látex de fruto de jaca. B) Gel de agarosa-caseína 1% en contacto con el gel A por 15 horas. Muestra cargada: 20 µg de proteína.

Como muestran los resultados, la actividad de proteasa está dada por proteínas de alto peso molecular en condiciones nativas. Cuando se probaron con geles corridos en condiciones desnaturizantes, los zimogramas no revelaron actividad. De tal manera que fueron ensayados los zimogramas probando diferentes composiciones y pH en los buffers de renaturalización (Anexo B). Así también se variaron los tiempos y temperaturas de incubación, sin embargo, no se obtuvieron resultados de hidrólisis en los zimogramas.

7.1.6. Zimogramas de actividad lipolítica

Se prepararon geles ND-PAGE a una concentración del 8%, donde se observaron bandas de pesos moleculares de 215, 172, 164, 145, 139, 133, 123, 117, 91 y 75 kDa. La actividad de lipasa fue observada en los extractos crudos de proteína a partir de los geles en condiciones nativas en zimogramas utilizando como sustrato tributirina al 0.5%, a pH 7.5 e incubación a temperatura ambiente por 20 horas, detectando la actividad por los halos de hidrólisis en las bandas con peso molecular de 75 kDa, 133 kDa, 139 kDa y 172 kDa como se observar en la Fig. 14.

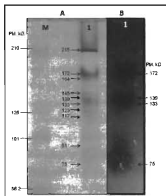


Figura 14. Electroforesis en gel y zimograma de actividad lipolítica. A) Gel de poliacrilamida al 8% en condiciones nativas. M) marcador de peso molecular. 1) Extracto crudo de látex de fruto de jaca. B) Gel de agar-tributirina (0.5%) en contacto con el gel A por 20 horas. Muestra cargada: 20 μ g de proteína.

Estudios realizados por Lazreg-Aref y colaboradores (2012) reportaron una lipasa del látex de *Ficus carica* L. (Moraceae) con peso molecular de 29 kDa. La actividad lipolítica más alta se encontró en el extracto crudo del látex extraído de frutos en proceso de maduración.

Dhouib y colaboradores (2011) identificaron una lipasa putativa de 45 kDa, pH óptimo de 8.0 a 9.0 y sugieren que ésta es la lipasa responsable de la importante actividad lipolítica detectada en el látex de papaya. Siendo estas lipasas reportadas de bajo peso molecular, mientras que las identificadas en esta investigación son de alto peso molecular, estos resultados serán los primeros en reportar esta actividad lipolítica en el látex de jaca.

Por otro lado, en los geles que se corrieron en condiciones desnaturalizantes y que fueron sometidos a renaturalización y probados en zimogramas utilizando como sustrato agar-tributirina 0.5%, no se observaron halos de hidrólisis. Misma condición que fue observada cuando se probaron los zimogramas para la actividad proteolítica.

7.2. Separación las proteínas por cromatografía de filtración en gel

Se obtuvieron 80 fracciones de 0.5 ml. A cada fracción se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 220 nm (datos no mostrados) y 280 nm (Anexo C), donde se observa que las fracciones 1 a la 12 presentan valores de absorbancia bajos; las fracciones 13 a la 16 corresponden a una ligera elevación en el cromatograma, formando un pico chico. Posteriormente, de las fracciones 17 a la 24 se aprecia un pico de valores altos de absorbancia, claramente definido, el cual tiene un valor máximo en la fracción 22. Éste pico es seguido por otro formado por las fracciones 25 a la 28 en el que el valor más alto es el de la fracción 26. Finalmente, los valores de absorbancia comienzan a descender a partir de la fracción 29 hasta valores muy cercanos a cero (Fig. 15).

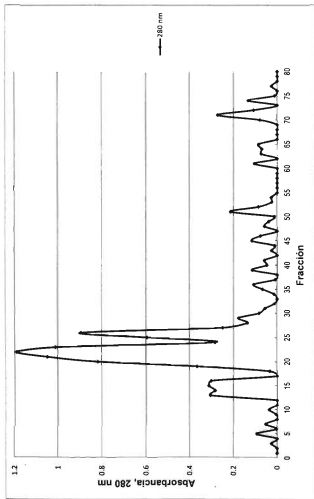


Figura 15. Espectro de absorbancia del perfil de elusión de proteínas por cromatografía de filtración en gel. Buffer de elusión: Tris-HCl 25 mM, pH 8.8 en una columna empaquetada con Sefinose Fast Flow SF006-6F. Muestra cargada: extracto crudo liofilizado resuspendido en el buffer de elución a una concentración de 10 mg/ml. Velocidad de flujo: 1 ml/min. Tamaño de las fracciones: 0.5 ml.

7.2.1. Actividad proteolítica en placa de las fracciones obtenidas de la cromatografía filtración en gel

Los ensayos de actividad proteolítica en placa de las fracciones obtenidas de la cromatografía en gel (80 fracciones), mostraron actividad las fracciones de la 11 a la 20. Cabe mencionar que las fracciones 21 a la 31, a pesar de ser las fracciones con los valores más altos de absorbancia a 280 nm, se descartaron debido a que: 1) no presentaron actividad proteolítica; 2) no presentaron actividad lipolítica; 3) la cantidad de proteína en ellas es muy baja y 4) no se visualizan bandas de proteína al correrlas en geles de poliacrilamida.

Esta condición puede explicarse por la composición de los anillos aromáticos de las moléculas presentes o compuestos fenólicos que absorben a 280 nm al igual que las proteínas. En reportes hechos por Mahajan y Badgujar (2008) realizados en látex de 21 especies de plantas, reportan metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, terpenoides, glucósidos cianogénicos, compuestos fenólicos, taninos y saponinas.

7.2.2. Actividad lipolítica en placa de las fracciones obtenidas de la cromatografía filtración en gel

De las 80 fracciones obtenidas en la cromatografía en gel sometidas a actividad lipolítica en placas de agar-tributirina-tween 20, las fracciones que mostraron actividad fueron de la 13 a la 16.

7.2.3. Cuantificación de la proteína en las fracciones de interés

Se cuantificó la proteína en las fracciones con actividad (11 a 20). Como se puede observar en el Cuadro 5, las fracciones 12 a 20 son las que tienen los valores más altos de proteína y son las fracciones que presentan actividad enzimática.

| FRACCIÓN | Proteína, mg/ml |
|----------|-----------------|
| 11 | 0.0431 |
| 12 | 0.0757 |
| 13 | 0.0721 |
| 14 | 0.2177 |
| 15 | 0.4266 |
| 16 | 0.3522 |
| 17 | 0.1796 |
| 18 | 0.0762 |
| 19 | 0.0578 |
| 20 | 0.0608 |

Tabla 4 - Concentración de proteína de las fracciones de la cromatografía de filtración en gel. Las fracciones 11 a 20 presentaron actividad proteolítica. Las fracciones 14 a 16 son las fracciones con la mayor concentración de proteína y actividad lipolítica.

7.2.4. Electroforesis en gel en condiciones desnaturizantes en las fracciones con actividad proteolítica y lipolítica

El corrimiento de las fracciones con actividad proteolítica y lipolítica en electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 12% de poliacrilamida (Fig. 16). Mostraron un patrón electroforético con bandas de 99, 89, 79.5, 60, 55.5, 48, 30, 21 y 11 kDa, siendo estos patrones semejantes entre si.

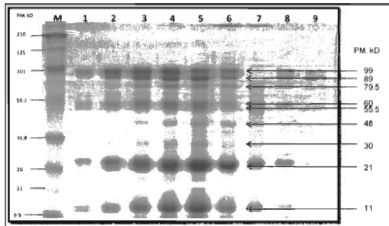


Figura 16. Electroforesis en gel SDS-PAGE (12%) de las fracciones con actividad de la cromatografía de filtración en gel. M) marcador de peso molecular. 1) Fracción 11; 2) Fracción 12; 3) Fracción 13; 4) Fracción 14; 5) Fracción 15; 6) Fracción 16; 7) Fracción 17; 8) Fracción 18; 9) Fracción 19. Las cantidades cargadas fueron: 1) 0.86 ug; 2) 1.51 ug; 3) 1.44 ug; 4) 4.35 ug; 5) 8.53 ug; 6) 7.04 ug; 7) 3.59 ug; 8) 1.52 ug; 9) 1.15 ug. En la imagen se muestran los pesos moleculares obtenidos calculando el Rf de las proteínas.

7.2.5. Zimogramas de actividad proteolítica en condiciones nativas

Los corrimientos de las proteínas en condiciones nativas al 8% de poliacrilamida, expuestos a zimogramas de sustrato con agarosa-caseína 1% mostraron actividad como halos de hidrólisis, las muestras de las fracciones 12 a la 18, una banda de 172 kDa en la que se observa una fuerte actividad proteolítica, las fracciones 12 a la 17 presentan una banda de 133 kDa con una marcada actividad proteolítica (Fig. 17).

7.2.6. Zimogramas de actividad lipolítica en condiciones nativas

Los corrimientos de las proteínas en condiciones nativas al 8% de poliacrilamida expuestos a zimogramas para detectar la actividad lipolítica, mostraron que las fracciones 13 a la 16 tuvieron actividad observada como halos de hidrólisis en las proteínas con pesos moleculares 80 kDa, 133 kDa y 172 kDa. (Fig. 18). Los pesos

moleculares de estas proteínas son similares a los de las proteínas con actividad lipolítica en los extractos crudos, lo que sugiere que las proteínas no han perdido su actividad al ser sometidas a la cromatografía.

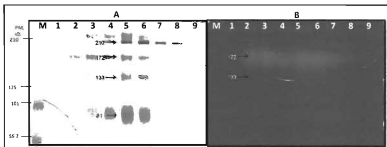


Figura 17. Electroforesis en gel y zimograma de actividad proteolítica de las fracciones de la cromatografía de filtración en gel. A) Gel de acrilamida al 8% en condiciones nativas. M) marcador de peso molecular. 1) Fracción 11; 2) Fracción 12; 3) Fracción 13; 4) Fracción 14; 5) Fracción 15; 6) Fracción 16; 7) Fracción 17; 8) Fracción 18; 9) Fracción 19. B) Gel de agarosa-caselina al 1% en contacto con el gel A por 20 horas. Las cantidades cargadas fueron: 1) 0.86 ug; 2) 1.51 ug; 3) 1.44 ug; 4) 4.35 ug; 5) 8.53 ug; 6) 7.04 ug; 7) 3.59 ug; 8) 1.52 ug; 9) 1.15 ug. En la imagen se muestran los pesos moleculares obtenidos calculando el Rf de las proteínas.

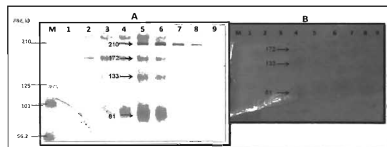


Figura 18. Electroforesis en gel y zimograma de actividad lipolítica de las fracciones de la cromatografía de filtración en gel. A) Gel de acrilamida al 8% en condiciones nativas. M) marcador de peso molecular. 1) Fracción 11; 2) Fracción 12; 3) Fracción 13; 4) Fracción 14; 5) Fracción 15; 6) Fracción 16; 7) Fracción 17; 8) Fracción 18; 9) Fracción 19. B) Gel de agar-tri-butirina 0.5% en contacto con el gel A por 15 horas. Las cantidades cargadas fueron: 1) 0.86 ug; 2) 1.51 ug; 3) 1.44 ug; 4) 4.35 ug; 5) 8.53 ug; 6) 7.04 ug; 7) 3.59 ug; 8) 1.52 ug; 9) 1.15 ug. En la imagen se muestran los pesos moleculares obtenidos calculando el Rf de las proteínas.

7.2.7. Zimogramas de actividad proteolítica y lipolítica después de SDS-PAGE

Los ensayos de actividad de proteasa y lipasa utilizando los corrimientos electroforéticos en condiciones desnaturalizantes y tratados con buffer de renaturalización de las fracciones 12 a la 20 no mostraron halos de hidrólisis después de 20 horas de incubación.

7.3. Cromatografía de intercambio aniónico

De las fracciones que mostraron actividad en la cromatografía de filtración en gel, fracciones de la 11 a la 20, se formó un lote que fue sometido a cromatografía de intercambio aniónico para separar las proteínas por su carga y no por su tamaño, ya que los resultados apuntaban a la posibilidad de que ser un complejo multienzimático, debido a que la actividad sólo se observó en las proteínas en sus condiciones nativas.

Se obtuvieron 120 fracciones de 1 ml cada una. A cada fracción se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm (Fig. 19), se observa que las fracciones 1 a la 31 que corresponden al lavado con buffer a bajas concentraciones de NaCl (0.0 y 0.1 M) presentan valores bajos de absorbancia. A partir de la fracción 32 se observan varios picos continuos que terminan en la fracción 71. Estos picos corresponden a las concentraciones 0.2 M y 0.3 M de NaCl en el buffer de elución. Sin embargo, estos valores son considerablemente menores a los obtenidos en las fracciones recolectadas en la cromatografía de filtración en gel. El pico mejor definido está entre las fracciones 63 a la 72, siendo la fracción 69 la que presenta el valor más alto de absorbancia (Anexo C).

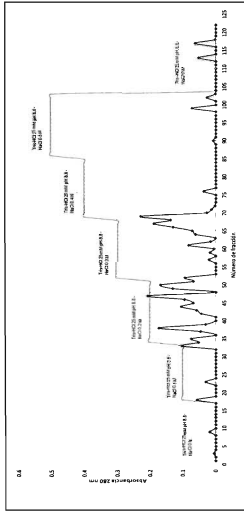


Figura 19 – Espectro de absorbancia del perfil de elusión de proteínas por cromatografía de intercambio iónico. Buffer de elusión: Tris-HCl 25 mM, pH 8.8 con un gradiente escalonado de NaCl 0 a 0.5 M. Intercambiador aniónico: DEAE Sepharose. Muestra cargada: pool 11-20 a una concentración de 0.4 mg/ml. Velocidad de flujo: 2 ml/min. Tamaño de las fracciones: 1 ml.

7.3.1. Actividad proteolítica y lipolítica en placa fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico

Las fracciones que presentaron la actividad proteolítica en placa fueron las fracciones 58 a la 88, y la actividad lipolítica en placa de la fracción 62 a la 72.

Los resultados de la cuantificación de la proteína presente en las fracciones 58 a la 89 se presentan en la Tabla 5, rango dentro del que caen las fracciones con las dos actividades. A diferencia de la cromatografía de filtración en gel, no se observa un pico o rango de fracciones donde se encuentre concentrada la mayor cantidad de proteína.

| FRACCIÓN | Proteína, mg/ml | FRACCIÓN | Proteína, mg/ml |
|----------|-----------------|----------|-----------------|
| 58 | 0.0836 | 74 | 0.0973 |
| 59 | 0.0827 | 75 | 0.0981 |
| 60 | 0.1084 | 76 | 0.1212 |
| 61 | 0.0964 | 77 | 0.0913 |
| 62 | 0.1032 | 78 | 0.0921 |
| 63 | 0.1032 | 79 | 0.0844 |
| 64 | 0.0998 | 80 | 0.0879 |
| 65 | 0.0921 | 81 | 0.1109 |
| 66 | 0.0870 | 82 | 0.0913 |
| 67 | 0.0990 | 83 | 0.1050 |
| 68 | 0.0759 | 84 | 0.1161 |
| 69 | 0.0964 | 85 | 0.0921 |
| 70 | 0.0896 | 86 | 0.0887 |
| 71 | 0.1024 | 87 | 0.0819 |
| 72 | 0.0921 | 88 | 0.0716 |
| 73 | 0.0921 | 89 | 0.0913 |

Tabla 5- Concentración de proteína de las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones 58 a la 88 son las fracciones que presentaron actividad proteolítica. Las fracciones 62 a la 72 presentaron actividad lipolítica.

7.3.2. Determinación de los pesos moleculares de las proteínas en las fracciones con actividad proteolítica y lipolítica por SDS-PAGE

Por lo observado en los ensayos anteriores, se seleccionaron como fracciones de interés las fracciones 60 a 78. Se cargó el equivalente a 2 μ g de proteína en cada carril.

En los corrimientos electroforéticos bajo condiciones desnaturalizantes de las fracciones de interés se visualizaron proteínas con pesos moleculares de 30, 45, 48, 78, 80, 92 y 99 kDa (Fig. 20).

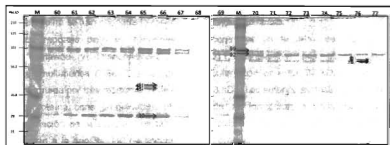


Figura 20 – Electroforesis en gel SDS-PAGE (12%) de las fracciones con actividad de la cromatografía de intercambio aniónico. En la parte superior de los gels se indica el número de fracción en cada carril. En cada carril se cargó el equivalente a 2 μ g de proteína.

En la separación electroforética en condiciones desnaturalizantes de estas fracciones se puede observar una proteína de aproximadamente 80 kDa, misma que se había observado en los corrimientos de los extractos crudos preparados a una concentración del 16% de poliacrilamida (Fig. 9) y que también se observó en los SDS-PAGE de las fracciones con actividad de la cromatografía de filtración en gel (Fig. 16) y que después de la cromatografía de intercambio aniónico se observa con mejor resolución (Fig. 20). Esta proteína de 80 kDa observada, tiene un peso molecular semejante a la proteasa reportada por Prasad y Virupaksha (1990), de 79.5 kDa, la cual fue purificada por cromatografía de intercambio aniónico. En ese estudio se determinó que era una proteína de un solo polipéptido con tamaño de 79.5

kDa, *pI* 6.3 y un pH óptimo de 8.0, a la que se le denominó artocarpina. Esta proteasa tiene una relativamente amplia especificidad de sustratos. Sin embargo, fue la única actividad que encontraron en el látex de jaca.

La proteína observada de peso 48 kDa, coincide en tamaño con una proteasa reportada por Siritapetawee y colaboradores (2012), purificada a partir del látex de jaca por cromatografías de intercambio aniónico (con Q Sepharose Fast Flow) y catiónico (con SP Sepharose). Esta enzima mostró actividad proteolítica contra gelatina y caseína y además presentó propiedades antibacteriana y antifúngica; sin embargo no se han encontrado reportes de actividad de lipasa.

Otros reportes pero en glicoproteínas encontradas en el látex de jaca por Siritapetawee y Thammahirak en el 2011, identificaron una glicoproteína heteromultimérica (HSGPL1) con peso molecular superior a los 97 kDa que está conformada por tres monómeros de 29, 31 y 33 kDa. Los autores demostraron que la glicoproteína tiene propiedades inhibitorias de serinoproteasas e inhibición de la coagulación de la sangre. Los tamaños moleculares identificados en este estudio apuntan a la posibilidad de encontrar a una proteína heteromultimérica dados los tamaños de las diferentes bandas identificadas en los geles en condición desnaturizante.

7.3.3. Zimogramas de actividad proteolítica en condiciones nativas

Los resultados de los zimogramas en geles en condiciones no desnaturizantes (8%), en agarosa-caseína 1% como sustrato (Fig. 21), revelaron actividad proteolítica en las fracciones 60 a la 68 en una proteína de 123 kDa, cabe señalar que el peso corresponde con el observado en los ensayos de actividad con los extractos crudos y con la observada después de la cromatografía de filtración en gel. Es decir, que esta proteína no ha perdido su actividad al ser sometida a dos procesos de separación, sin embargo, en los geles en condiciones desnaturizantes no se ha detectado la actividad, lo que sugiere que esta enzima de peso aproximado a los 123 kDa podría ser una enzima compuesta por varias subunidades que necesitan estar en su conformación nativa.

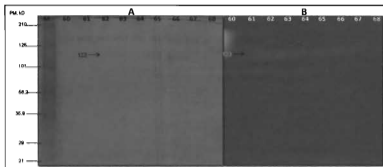


Figura 21 – Electroforesis en gel y zimograma de actividad proteolítica de las fracciones 60 a la 68 de la cromatografía de intercambio aniónico. A) Gel de acrilamida al 8% en condiciones nativas. M) marcador de peso molecular. B) Gel de agarosa-caseína al 1% en contacto con el gel A por 20 horas.

En las fracciones 69 a 75 también se observó actividad proteolítica en las proteínas de 123 y 172 kDa, las cuales se observaron en los extractos crudos y en las fracciones obtenidas de la cromatografía de filtración en gel. Ya que en los geles SDS-PAGE no se observaron bandas de este tamaño, estos resultados podrían evidenciar una enzima multimérica cuya actividad no fue posible recuperar tras la renaturalización.

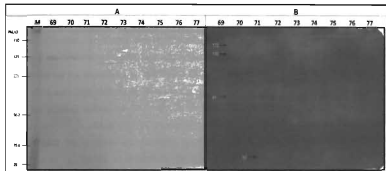


Figura 22 – Electroforesis en gel y zimograma de actividad proteolítica de las fracciones 69 a la 77 de la cromatografía de Intercambio aniónico. A) Gel de acrilamida al 8% en condiciones nativas. M) marcador de peso molecular. B) Gel de agarosa-caseína al 1% en contacto con el gel A por 20 horas.

En las fracciones 69 a 77 se observó hidrólisis en los zimogramas en las bandas de 81 y 30 kDa (Fig. 22). Como ya se mencionó, una de las proteasas purificadas a partir de látex de jaca (Prasad y Virupaksha, 1990) tiene peso molecular de 79.5 kDa, y como se describió, es una proteína monomérica que se puede ver en geles desnaturalizantes y no desnaturalizantes.

7.3.4. Zimogramas de actividad lipolítica en condiciones nativas

En los zimogramas para identificar la actividad lipolítica, no fue posible detectar la actividad lipolítica, a pesar de que en los ensayos en placa sí se observa esta actividad. Esto puede deberse a que se trata con un complejo multienzimático que aumenta tanto su estabilidad como su actividad. Los geles ND-PAGE, aunque no someten a las proteínas bajo condiciones que las desnaturalicen, pueden ocasionar cambios conformacionales, que disminuyen la afinidad entre el sitio catalítico y el sustrato. La actividad catalítica de la mayoría de las lipasas depende del estado de agregación de sus sustratos. Se supone que la activación de la lipasa requiere el desenmascaramiento y la estructuración del sitio activo de la enzima a través de

cambios conformacionales que involucran la presencia de gotitas de aceite en el agua. Este fenómeno ha sido llamado activación interfacial (Pignol *et al.*, 1998).

También se ha reportado la formación de agregados moleculares con baja o nula actividad catalítica debido al bloqueo de los centros activos (Snellman *et al.*, 2002) por las propias moléculas enzimáticas, debido a la interacción de las enzimas con otras sustancias. Este tipo de interacción no es descartable, dada la naturaleza hidrofóbica de la zona de contacto lipídico cercana al centro activo (González-Bacero *et al.*, 2010). El fenómeno de agregación en soluciones acuosas ha sido demostrado experimentalmente por varios grupos de investigadores (Flaschel y Renken, 1991; Guisán *et al.*, 1996; Palomo *et al.*, 2003) quienes obtuvieron un rápido descenso de la actividad enzimática al aumentar la concentración de enzima (Pedersen *et al.*, 2006).

7.4. Electroforesis en doble dimensión (2-DE)

El corrimiento de las proteínas con actividad de lipolítica y proteolítica, obtenidas de la cromatografía de filtración en gel, por electroforesis en doble dimensión (2-DE), permitió la resolución y separación de las proteínas, obteniendo un patrón de 10 manchas proteicas observables, Figura 23, las cuales tienen pI que van desde 5.22 a 7.98 y pesos moleculares de 39, 43, 48, 75, 82, 99, 110, 120 y 125 kDa. Mientras que la cromatografía de intercambio aniónico, muestran dos proteínas cuyos P.M. son 70 y 75 kDa y pI de 8.5 y 8.9 respectivamente. Sin embargo no permite determinar si hay otras proteínas (Fig. 24), por lo que es necesario realizar otros ensayos para separar las manchas proteicas. Los patrones proteicos observados en estos ensayos refuerzan la hipótesis de que es posible que estas actividades se estén llevando a cabo por un complejo multienzimático o heterodimérico, como muestran los resultados del corrimiento electroforético en condiciones nativas, y que al resolver en 2-DE las muestras observamos los diferentes pesos moleculares que tienen las proteínas identificadas.

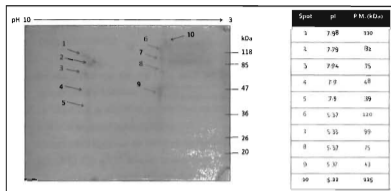


Figura 23 – Proteoma de las fracciones con actividad proteolítica y lipolítica obtenidas de la cromatografía de filtración en gel. En la electroforesis 2-D se observan 10 manchas principales con puntos isoeléctricos desde 5.2 hasta 7.98 y pesos moleculares desde 39 hasta 125 kDa.

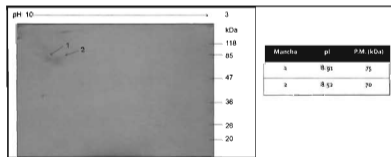


Figura 24 – Proteoma de las fracciones con actividad proteolítica y lipolítica obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico. En la electroforesis 2-D hay dos manchas claramente visibles con puntos isoeléctricos de 8.5 y 8.9 y pesos moleculares de 70 y 75 kDa, respectivamente.

VIII – CONCLUSIONES

1. En los extractos de látex de jaca se encontraron actividades proteolítica, caseinolítica y lipolítica.
2. La actividad proteolítica se observó en las bandas proteicas de 30, 81, 133 y 172 kDa en condiciones nativas.
3. La actividad lipolítica se observó en las proteínas con pesos moleculares de 81 kDa, 133 kDa y 172 kDa en condiciones nativas.
4. La resolución en 2-DE mostró que hay un complejo enzimático con actividad proteolítica.
5. La resolución en 2-DE mostró que hay un complejo enzimático con actividad lipolítica.

RECOMENDACIONES

En relación a los aspectos contemplados en la presente investigación, se proponen como perspectivas del trabajo:

1. Purificar las enzimas con las actividades encontradas en el látex de jaca y determinar sus parámetros cinéticos.
2. Continuar con los estudios necesarios para la obtención de proteínas recombinantes.
3. Continuar la búsqueda de enzimas con otras actividades en el látex de jaca, que puedan tener diferentes aplicaciones.
4. Buscar potenciales usos de las proteasas y lipasas identificadas en el látex de jaca, en procesos de alimentos.
5. Hacer estudios de factibilidad para producir alguna de estas enzimas a nivel industrial y obtener una presentación comercial y de grado alimenticio, del complejo enzimático presente en el látex de jaca.

LITERATURA CITADA

- Anderson, J.W. 1968 Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* 7:1973-88.
- Balakrishna, K.J. y Seshadri, T.R. 1947. Chemical examination of Jack tree latex and Jack fruit gum. Part I - The origin of artostenone. *Proceedings Mathematical Sciences* 26:46-51.
- Barrett, A., Rawlings, N. y Woessner, J. 2004. Introduction. En: Barrett, A.; Rawlings, N. y Woessner, J., eds. *Handbook of Proteolytic Enzymes: aspartic and metallo peptidases*. Second edition. London: Academic Press. London, England. 1666 p.
- Bertoluzzo, M. G., Bertoluzzo, S. M. R. y Rigaluso, R. 2008. Estudio cinético de la actividad proteolítica de la enzima ficina. *Anales AFA* 20(1):243-245.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-254.
- Caffini, N.O., Natalucci, C.L., Priolo, N.S. y Buttazzoni, M.S. 1988. Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrítica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb. *Acta Farm.Bonaerense* 7:9-14
- Caro, Y., Villeneuve, P., Pina, M., Reynes, M. y Graille, J. 2000. Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions. *Journal of the American Oil Chemistry Society* 77(8):891-901.
- Cavalli, S. E. V., Arribère, M. C., Cortadi, A., Caffini, N. O. y Priolo, N. S. 2003. Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae). *Journal of Protein Chemistry* 22(1):15-22.
- Chahinian, H., Snabe, T., Atlas, C., Fojan, P., Petersen, S. B. Carrière, F. 2006. How gastric lipase, an interfacial enzyme with a Ser-His-Asp catalytic triad, acts optimally at acidic pH. *Biochemistry* 45(3), 993-1001.
- Dhouib, R., Laroche-Traineau, J., Shaha, R., Lapallierie, D., Solier, E., Rualès, J., Pina, M., Villeneuve, P., Carrière, F., Bonneu, M. y Arondel, V. 2011. Identification of a putative triacylglycerol lipase from papaya latex by functional proteomics. *FEBS Journal*. 278(1):97-110.
- Domsalla, A. y Melzig, M.F. 2008. Occurrence and properties of proteases in plant lattices. *Planta Med.* 74(7):699-711.
- Dos Santos, A. L. S. 2011. Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events. *World Journal of Biological Chemistry* 2(3):48.
- Duan, C.F., Nie, Z.Y. y Zeng, R.Z. 2006. Establishment of 2-DE system and primary analyses on the membrane proteins of rubber particles in *Hevea brasiliensis* by MALDI-TOF. *Chinese J Tropic Crops* 27:22-29.
- Dubey, V., Pande, M. Singh, B. y Jagannadham, M. 2007. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. *Afr. J. Biotech.* 6:1077-1086.
- Dussourd, D. E. y Eisner, T. 1987 Vein-cutting behavior insect counterplay to the latex defense of plants. *Science* 237:898-901
- El Moussaoui, A., Nijs, A. M., Pul, C., Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M. y Looze, Y. 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible

participation in the plant defense mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:556-570.

Flaschel, E. y Renken, A. 1991. The behaviour of the *Candida rugosa* lipase in the presence of soluble substrates. En: Alberghina, L., Schmid, R. D. y Verger, R. *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. GBF Monographs, VCH. 16:349-52.

Foresi, M.L., Errazu, A. y Ferreira, M. 2005. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. *Biochem. Eng. J.* 25(1):69-77.

Freitas, C. D. T., Oliveira, J. S., Miranda, M. R. A., Macedo, N. M. R., Sales, M. P., Villas-Boas, L. A. y Ramos, M. V. 2007. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 781-789.

Giordani, R., Moulin, S. y Verger, R. 1991. Tributylroylglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other latices. *Phytochemistry* 30(4):1069-1072.

González-Bacero, J., Hernández, J. R. y del Monte Martínez, A. 2010. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*. (1):124-140.

Gotor-Fernández V., Brieva R. y Gotor V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. 2006. *J Mol Catal B Enzym*. 40:111–20.

Hag, N. 2006. Jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*. Southampton Centre for Underutilised Crops, University of Southampton. Southampton, United Kingdom.

Harborne, J.B. 1993. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press. London, England. p 210.

Hernández, M. J. 2012. Biotatálisis aplicada a la síntesis de fármacos, (I) Enzimas hidrolíticas. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XXXV(VI):194-237*.

Huang, J., McAuslane, H. y Nuessly, G. 2003. Resistance in lettuce to *Diabrotica balteata* (Coleoptera: Chrysomelidae): the roles of latex and inducible defense. *Environmental Entomology* 32:9-16.

Huber-Baur, B., Concepción, J. L. y Avilán, L. 2006. Caracterización de la actividad proteolítica en el látex de *Mandevilla veraguasensis*. *Acta Biol. Venez.* 28(1):39–44.

Jacob J. L., Prevot J. C. y Kekwick R. G. O. 1989. General metabolism of *Hevea brasiliensis* latex. p. 145–178. In: d'Auzac J., Jacob J. L. and Chrestin H. (eds). *Physiology of Rubber Tree Latex*. CRC, Boca Raton, Florida, United States of America.

Jaeger, K. E. y Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*. 13(4):390-397.

Karigar, C. S. y Rao, S. S. 2011. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Res*. 2011:1-11.

Kyndt, T., van Damme, E., van Beeumen, J. y Gheysen, G. 2007. Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp. *FEBS Journal*. 274(2):451-462.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lazreg-Aref, H., Mosbah, H., Fekih, A., Mars, M. y Said, K. 2012. Purification and biochemical characterization of lipase from *Ficus carica* latex of Tunisian East Coast Zidi variety. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 89(10):1847-1855.

Lehninger, A. L. 2009. *Principios de Bioquímica*. Omega España. Barcelona, España. 1296 p.

Lewinsohn, T. M. 1991. The geographical distribution of plant latex. *Chemecology* 2(1):64-68

Liggieri, C., Obregón, W., Trejo, S. y Priolo, N. 2009. Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L. *Acta Biochem. Biophys. Sin.* 41:154-162.

Liggieri, C., Arribère, C., Trejo, S., Canals, F., Aviés, F. y Priolo, N. 2004. Purification and biochemical characterization of Asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L. *Protein J.* 23:403-411.

López, L. M. I., Natalucci, C. L. y Caffini, N.O. 1989. Proteasas presentes en el látex de frutos de *Maciura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae). *Acta Farm. Bonaerense* 8(3):179-85.

Mahajan, R. T. y Badgujar, S. B. 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes: a review. *Journal of Pharmacy Research.* 3(9):2048-2068.

Malcolm S. B. y Zalucki M. P. 1996 Milkweed latex and cardenolide induction may resolve the lethal plant defense paradox. *Entomol. Exp. Appl.* 80:193-196

Mathewson, P. R. 1998. *Enzymes Handbook*. Eagan Press. United States of America. 109 p.

Morcelle, S., Caffini, N. y Priolo, N. 2004. Proteolytic properties of *Funastrom clausum* latex. *Fitoterapia* 75:480-493.

Natalucci, C. L., Priolo, N. S., Arribère, M. C., López, L. M. I., Brullo, A. y Caffini, N.O. 2000. Fitoproteasas: Un recurso natural renovable no explotado en Argentina. Congreso Nacional de Recursos Naturales Aromáticos y Medicinales. Vol. XVI:35-43.

Obregón, W.D. 2008. Hidrolasas de látex de especies del género *Araujia*. Purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Palocci, C., Fiorillo, F., Belsito, C., Cernia, E., Pasqua, G. y Pandalai, S. G. 2005. Plant latex lipases: physiological role and applications. *Recent Research Developments in Biochemistry* 6:87.

Palomo, J. M., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Guisan, J. M. y Fernandez-Lafuente, R. 2003. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4(1):1-6.

Pant, R. y Chaturvedi, K. 1989. 4-hydroxyundecyl docosanoate and cycloartenone in *Artocarpus integrifolia* latex. *Phytochemistry* 28:2197-2199.

Paques, F. W. y Macedo, G. A. 2006. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Química Nova* 29(1):93-99.

Pedersen, S., Nesgaard, L., Baptista, R. P., Melo, E. P., Kristensen, S. R. y Otzen, D. E. 2006. pH-dependent aggregation of cutinase is efficiently suppressed by 1,8-ANS. *Biopolymers* 83(6):619-29.

Pérez-Pérez, R. 2011. Estudio de la alteración en la expresión de proteínas en el tejido adiposo omental y subcutáneo en obesidad mediante técnicas de proteómica. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

Pignol, D., Hemmoso, J., Kerfelec, B., Crenon, I., Chapus, C. y Carlos Fontecilla-Camps, J. 1998. The lipase/colipase complex is activated by a micelle: neutron crystallographic evidence. *Chemistry and physics of lipids.* 93(1):123-129.

Prakash, O., Kumar, R., Mishra, A. y Gupta, R. 2009. *Artocarpus heterophyllus* (Jackfruit): An overview. *Phcog Rev.* 3:353-8.

Prasad, K.M. y Virupaksha, T.K. 1990. Purification and characterization of a protease from jackfruit latex. *Phytochem.* 29:1763-1766.

Rajesh, R., Raghavendra Gowda, C. D., Nataraju, A., Dhananjaya, B. L., Kemparaju, K. y Vishwanath, B. S. 2005. Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with

fibrin(ogen)olytic activity, *Toxicon* 46(1):84-92.

Ramos, M. V., Grangeiro, T. B., Freire, E. A., Sales, M. P., Souza, D. P., Araújo, E. S. y Freitas, C. D. 2010. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. *Arthropod-Plant Interactions* 4(1):57-67.

Rani, K., Rana, R. y Datt, S. 2012. Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences*, 2(1):12-18.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. y Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):597-635.

Rivera, I., Mateos-Díaz, J. C. y Sandoval, G. 2012. Plant lipases: partial purification of *Carica papaya* lipase. p. 115-122. In: *Lipases and Phospholipases*. Humana Press.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New, York, United States of America.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2012. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (En línea). Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351 (revisado el 8 de agosto de 2013).

Sethi, A., McAulane, H. J., Rathinasabapathi, B., Nuessly, G. S. y Nagata, R. T. 2009. Enzyme induction as a possible mechanism for latex-mediated insect resistance in romaine lettuce. *Journal of Chemical Ecology* 35(2):190-200.

Shanmugan, S. y Sathishkumar, T. 2009. *Enzyme Technology*. I. K. International Pub. House. New Delhi, India.

Siritapetawee, J. y Thammasirirak, S. 2011. Purification and characterization of a heteromultimeric glycoprotein from *Artocarpus heterophyllus* latex with an inhibitory effect on human blood coagulation. *Acta Biochimica Polonica*. 58(4):521-528.

Siritapetawee, J., Thammasirirak, S. y Samornsuk, W. 2012. Antimicrobial activity of a 48-kDa protease (AMP48) from *Artocarpus heterophyllus* latex. *Eur. Rev. Med. 426 Pharmacol. Sci.* 16:132-137.

Snellman, E. A., Sullivan, E. R. y Colwell, R. R. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur J Biochem* 269:5771-9.

Southampton Centre of Underutilised Crops. 2006. Jackfruit *Artocarpus heterophyllus*, Field Manual for Extension Workers and Farmers. SCUC, Southampton, UK.

Teixeira, R. D., Ribeiro, H. A., Gomes, M. T., Lopes, M. T. y Salas, C.E. 2008. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiol. Biochem.* 46:956-961.

Tomar, R., Kumar, R. y Jagannadham, M.V. 2008. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. *J. Agric. Food Chem.* 53:1479-1487.

Turner, N. A., Gaskin, D. J., Yagnik, A. T., Littlechild, J. A. y Vulfson, E. N. 2001. Enantioselectivity of recombinant *Rhizomucor miehei* lipase in the ring opening of oxazolin-5 (4H)-ones. *Protein Engineering*, 14(4):269-278.

van der Hooft, R. A. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:191-223.

Westergaard, J. L., Hackbarth, C., Treuhaff, M.W. y Roberts, R. C. 1980. Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures. *J. Immunol. Meth.* 34:167-175.

Yadav, S. C., Pande, M. y Jagannadham, M. V. 2006. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry* 67(14):1414-1426.



ANEXO A

SISTEMA DE BIBLIOTECAS

BUFFERS Y SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA

✓ AZUL DE BROMOFENOL

Stock: 10 mg en 1 ml de Agua destilada (0.01 g en 1000 uL).

✓ BUFFER DE MUESTRA 2X (SDS)

Solución a partir de la cual se preparan los buffer de muestra 1X y 2X

| Para: | 100 ml | 50 ml | 5 ml |
|------------------|---------|---------|----------|
| Trisma base, 12M | 1.52 gr | 0.76 gr | 0.076 gr |
| SDS, 0.12M | 2.0 gr | 1.0 gr | 0.1 gr |
| Ajustar pH a 6.8 | | | |
| Glicerol, 2M | 20 ml | 10 ml | 1 ml |

Posteriormente

- Agregar 500 uL de la solución de Azul de Bromofenol (para 5 ml)
- Agregar 500 uL de β -mercaptoetanol (para 5 ml).

✓ SOLUCIÓN DE PERSULFATO DE AMONIO 10%

Preparar al momento (almacenar 4°C por 1 semana)

| | |
|----------------------------|----------------------------|
| 40 mg | 0.040 g |
| 400 uL de agua bidestilada | 400 uL de agua bidestilada |

✓ 4X Tris-HCl-SDS, pH 6.8

Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado antes de aforar a 100 ml

| Para: | 100 ml | 50 ml |
|------------------|----------|--------|
| Trisma base | 6.055 gr | 3.0275 |
| Agua bidestilada | 100 ml | 50 ml |

✓ 4x Tris-HCl-SDS, pH 8.8

Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado antes de aforar a 100 ml

| Para: | 100 ml | 50 ml |
|------------------|-----------|-------|
| Trisma base | 18.170 gr | 9.085 |
| Agua bidestilada | 100 ml | 50 ml |

✓ **MIX DE ACRILAMIDA AL 30%**

Disolver la acrilamida en 40 ml de agua (se puede calentar hasta 37°C), agregar la bisacrilamida y aforar a 100 ml. Filtrar por 0.45 µm, proteger de la luz y almacenar a 4°C.

| Para: | 100 ml | 50 ml |
|------------------|--------|-------|
| Acrilamida | 29.2 | 14.6 |
| Bis-acrilamida | 0.8 | 0.4 |
| Agua bidestilada | 100 ml | 50 ml |

✓ **5x BUFFER DE CORRIDA**

| Para: | 1000 ml | 500 ml | 250 ml |
|------------------|---------|---------|----------|
| Trisma base | 15.1 gr | 7.55 gr | 3.775 gr |
| Glicina | 72 gr | 36 gr | 18 gr |
| SDS | 5 gr | 2.5 gr | 1.25 gr |
| Agua desionizada | 1000 ml | 500 ml | 250 ml |

✓ **BUFFER DE TINCIÓN AZUL DE COOMASSIE**

1. Agitar por 24 hrs el metanol y el azul de Coomassie con magneto. Mantener en agitación hasta la disolución de la mayor parte de colorante.
2. Agregar ácido acético glacial (mezclar en hielo/agua)
3. Adicionar el agua por las paredes.
4. Filtrar y almacenar a 4°C en botellas de color topacio.

| Para: | 1000 ml | 500 ml |
|-------------------------|---------|--------|
| Azul de Coomassie R-250 | 1g | 0.5 g |
| Ácido acético | 100 ml | 50 ml |
| Metanol | 500 ml | 250 ml |
| Agua destilada | 400 ml | 200 ml |

✓ **SOLUCIÓN DECOLORANTE**

| Para: | 1000 ml | 500 ml |
|----------------|---------|--------|
| Acido acético | 100 ml | 50 ml |
| Metanol | 500 ml | 250 ml |
| Agua destilada | 400 ml | 200 ml |

Preparación de geles de separación para SDS-PAGE. Los geles en condiciones nativas no llevan SDS.

| Componentes | Volumen del gel | Volumen (ml) de los componentes requeridos para preparar geles a las concentraciones y volúmenes indicados | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 5 ml | 10 ml | 15 ml | 20 ml | 25 ml | 30 ml | 40 ml | 50 ml |
| 5% gel | | | | | | | | | |
| H ₂ O | | 2.6 | 5.3 | 7.9 | 10.6 | 13.2 | 15.9 | 21.2 | 26.5 |
| 30% mix de acrilamida | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 | 10 |
| Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8) | | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5 | 6.3 | 7.5 | 10 | 12.5 |
| SDS (10%) | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% persulfato de amonio | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | | 0.004 | 0.008 | 0.012 | 0.016 | 0.02 | 0.024 | 0.032 | 0.04 |
| 8% gel | | | | | | | | | |
| H ₂ O | | 2.3 | 4.6 | 6.9 | 9.3 | 11.5 | 13.9 | 18.5 | 23.2 |
| 30% mix de acrilamida | | 1.3 | 2.7 | 4 | 5.3 | 6.7 | 8 | 10.7 | 13.3 |
| Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8) | | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5 | 6.3 | 7.5 | 10 | 12.5 |
| SDS (10%) | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% persulfato de amonio | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | | 0.003 | 0.006 | 0.009 | 0.012 | 0.015 | 0.018 | 0.024 | 0.03 |
| 10% gel | | | | | | | | | |
| H ₂ O | | 1.9 | 4 | 5.9 | 7.9 | 9.9 | 11.9 | 15.9 | 19.8 |
| 30% mix de acrilamida | | 1.7 | 3.3 | 5 | 6.7 | 8.3 | 10 | 13.3 | 16.7 |
| Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8) | | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5 | 6.3 | 7.5 | 10 | 12.5 |
| SDS (10%) | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% persulfato de amonio | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.01 | 0.012 | 0.016 | 0.02 |
| 12% gel | | | | | | | | | |
| H ₂ O | | 1.6 | 3.3 | 4.9 | 6.6 | 8.2 | 9.9 | 13.2 | 16.5 |
| 30% mix de acrilamida | | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 16 | 20 |
| Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8) | | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5 | 6.3 | 7.5 | 10 | 12.5 |
| SDS (10%) | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% persulfato de amonio | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.01 | 0.012 | 0.016 | 0.02 |
| 15% gel | | | | | | | | | |
| H ₂ O | | 1.1 | 2.3 | 3.4 | 4.6 | 5.7 | 6.9 | 9.2 | 11.5 |
| 30% mix de acrilamida | | 2.5 | 5 | 7.5 | 10 | 12.5 | 15 | 20 | 25 |
| Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8) | | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5 | 6.3 | 7.5 | 10 | 12.5 |
| SDS (10%) | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10% persulfato de amonio | | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED | | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.01 | 0.012 | 0.016 | 0.02 |

Preparación del gel separador para SDS-PAGE. Los geles en condiciones nativas no llevan SDS.

| Componentes | Volumen del gel | Volumen (ml) de los componentes requeridos para preparar geles a los volúmenes indicados | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 ml | 2 ml | 3 ml | 4 ml | 5 ml | 6 ml | 8 ml | 10 ml |
| H ₂ O | | 0.68 | 1.4 | 2.1 | 2.7 | 3.4 | 4.1 | 5.5 | 6.8 |
| 30% mix de acrilamida | | 0.17 | 0.33 | 0.5 | 0.67 | 0.83 | 1.0 | 1.3 | 1.7 |
| Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8) | | 0.13 | 0.25 | 0.38 | 0.5 | 0.63 | 0.75 | 1.0 | 1.25 |
| SDS (10%) | | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.1 |
| 10% persulfato de amonio | | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.1 |
| TEMED | | 0.001 | 0.002 | 0.003 | 0.004 | 0.005 | 0.006 | 0.008 | 0.01 |

ANEXO B

Buffer de lavado

| Compuesto | Concentración final |
|-------------------|---------------------|
| Tris-HCl pH 8.8 | 25 mM |
| NaCl | 150 mM |
| CaCl ₂ | 5 mM |
| NaN ₃ | 0.02% |
| Tritón X-100 | 0.025% |

Buffer de incubación

| Compuesto | Concentración final |
|-------------------|---------------------|
| Tris-HCl pH 8.8 | 25 mM |
| NaCl | 150 mM |
| CaCl ₂ | 5 mM |
| NaN ₃ | 0.02% |

Se utilizó el método descrito por Siritapetawee y colaboradores (2012) con modificaciones, donde el gel de poliacrilamida al 8% que contiene 0.1% SDS y 1 mg/ml de caseína se lavó tres veces en buffer de renaturalización y después se incubó en el mismo buffer sin Tritón X-100 a 37°C por 20 horas. Se tiñó y se buscó la presencia de halos de hidrólisis.

ANEXO C

TABLA DE VALORES DE ABSORBANCIA DE LA CROMATOGRFIA DE FILTRACI3N EN GEL

| FRACCI3N | Abs. 280 nm | FRACCI3N | Abs. 280 nm | FRACCI3N | Abs. 280 nm | FRACCI3N | Abs. 280 nm |
|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
| 1 | 0 | 21 | 1.047 | 41 | 0.058 | 61 | 0.103 |
| 2 | 0 | 22 | 1.189 | 42 | 0 | 62 | 0 |
| 3 | 0.026 | 23 | 1.01 | 43 | 0.025 | 63 | 0.072 |
| 4 | 0 | 24 | 0.284 | 44 | 0.011 | 64 | 0.069 |
| 5 | 0.092 | 25 | 0.595 | 45 | 0.114 | 65 | 0.084 |
| 6 | 0.003 | 26 | 0.895 | 46 | 0.076 | 66 | 0 |
| 7 | 0.051 | 27 | 0.249 | 47 | 0 | 67 | 0 |
| 8 | 0 | 28 | 0.135 | 48 | 0.057 | 68 | 0 |
| 9 | 0.004 | 29 | 0.176 | 49 | 0.038 | 69 | 0 |
| 10 | 0.036 | 30 | 0.082 | 50 | 0.013 | 70 | 0.079 |
| 11 | 0 | 31 | 0.055 | 51 | 0.213 | 71 | 0.271 |
| 12 | 0 | 32 | 0.012 | 52 | 0.085 | 72 | 0.107 |
| 13 | 0.305 | 33 | 0 | 53 | 0.025 | 73 | 0 |
| 14 | 0.283 | 34 | 0.014 | 54 | 0.027 | 74 | 0.131 |
| 15 | 0.312 | 35 | 0.066 | 55 | 0 | 75 | 0.012 |
| 16 | 0.301 | 36 | 0.106 | 56 | 0 | 76 | 0 |
| 17 | 0 | 37 | 0.009 | 57 | 0 | 77 | 0.026 |
| 18 | 0.033 | 38 | 0 | 58 | 0 | 78 | 0 |
| 19 | 0.366 | 39 | 0.113 | 59 | 0 | 79 | 0 |
| 20 | 0.818 | 40 | 0.047 | 60 | 0 | 80 | 0 |

Valores de absorbancia de las fracciones de la cromatografía de filtración en gel.

Valores de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, de las fracciones eluidas con Tris-HCl 25 mM, pH 8.8 en una columna empacada con Sefinose Fast Flow SF006-6F. Muestra cargada: extracto crudo liofilizado resuspendido en el buffer de elución a una concentración de 10 mg/ml. Velocidad de flujo: 1 ml/min. Tamaño de las fracciones: 0.5 ml.

TABLA DE VALORES DE ABSORBANCIA DE LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

| FRACCIÓN | Abs. 280 nm | FRACCIÓN | Abs. 280 nm | FRACCIÓN | Abs. 280 nm | FRACCIÓN | Abs. 280 nm |
|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
| 1 | 0 | 31 | 0 | 61 | 0.0165 | 91 | 0 |
| 2 | 0.0055 | 32 | 0.103 | 62 | 0.001 | 92 | 0 |
| 3 | 0 | 33 | 0.0525 | 63 | 0.0615 | 93 | 0 |
| 4 | 0 | 34 | 0.0745 | 64 | 0.0725 | 94 | 0 |
| 5 | 0 | 35 | 0 | 65 | 0.13 | 95 | 0 |
| 6 | 0 | 36 | 0.0465 | 66 | 0.1885 | 96 | 0 |
| 7 | 0 | 37 | 0.173 | 67 | 0.1385 | 97 | 0 |
| 8 | 0.0185 | 38 | 0.0315 | 68 | 0.2295 | 98 | 0.0725 |
| 9 | 0 | 39 | 0 | 69 | 0.0275 | 99 | 0 |
| 10 | 0 | 40 | 0 | 70 | 0.0135 | 100 | 0 |
| 11 | 0 | 41 | 0.0445 | 71 | 0.0025 | 101 | 0.0265 |
| 12 | 0 | 42 | 0.0585 | 72 | 0 | 102 | 0.001 |
| 13 | 0 | 43 | 0.105 | 73 | 0 | 103 | 0 |
| 14 | 0 | 44 | 0.0685 | 74 | 0 | 104 | 0 |
| 15 | 0 | 45 | 0.095 | 75 | 0.0365 | 105 | 0 |
| 16 | 0 | 46 | 0.207 | 76 | 0 | 106 | 0 |
| 17 | 0.0575 | 47 | 0 | 77 | 0 | 107 | 0 |
| 18 | 0 | 48 | 0.131 | 78 | 0 | 108 | 0 |
| 19 | 0 | 49 | 0.1685 | 79 | 0 | 109 | 0 |
| 20 | 0 | 50 | 0.0685 | 80 | 0 | 110 | 0 |
| 21 | 0 | 51 | 0.0935 | 81 | 0 | 111 | 0 |
| 22 | 0.0305 | 52 | 0 | 82 | 0 | 112 | 0.052 |
| 23 | 0 | 53 | 0 | 83 | 0 | 113 | 0 |
| 24 | 0 | 54 | 0 | 84 | 0 | 114 | 0 |
| 25 | 0 | 55 | 0 | 85 | 0 | 115 | 0 |
| 26 | 0 | 56 | 0.0205 | 86 | 0 | 116 | 0.063 |
| 27 | 0 | 57 | 0 | 87 | 0 | 117 | 0.0025 |
| 28 | 0 | 58 | 0.018 | 88 | 0 | 118 | 0 |
| 29 | 0 | 59 | 0.0065 | 89 | 0.008 | 119 | 0 |
| 30 | 0 | 60 | 0.082 | 90 | 0 | 120 | 0 |

Valores de absorbancia de las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico.
 Valores de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, de las fracciones eluidas con un gradiente escalonado de NaCl 0 - 0.5 M en buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8.8. Intercambiador aniónico: DEAE Sepharose. Muestra cargada: pool 11-20 a una concentración de 0.4 mg/ml. Velocidad de flujo: 2 ml/min. Tamaño de las fracciones: 1 ml.