

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

DETECCIÓN DE LA ENZIMA HIDROPERÓXIDO LIASA, EN LA CÁSCARA DE
PITAYA (*Stenocereus pruinosus*) EN DIFERENTES ESTADÍOS DE FRUTO

POR:

MARÍA ALEJANDRA TORRES LÓPEZ

TESIS

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

LICENCIADA EN TECNOLOGÍA ALIMENTARIA



CATACAMAS

OLANCHO

DICIEMBRE DE 2012

DETECCIÓN DE LA ENZIMA HIDROPERÓXIDO LIASA, EN LA CÁSCARA DE
PITAYA (*Stenocereus pruinosus*) EN DIFERENTES ESTADÍOS DE FRUTO

POR:

MARIA ALEJANDRA TORRES LOPEZ

LICZA PADILLA Ph.D

Asesor Principal (UNA)

MIRNA PATRICIA SANTIAGO Dr.

Asesor Adjunto (Universidad Tecnológica de la mixteca)

TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADA EN TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS C. A.

DICIEMBRE, 2012

ACTA DE SUSTENTACION

DEDICATORIA

A **MI PADRE CELESTIAL** por todas sus bendiciones durante toda mi carrera por la sabiduría e inteligencia que me brindo para culminar uno de mis más grandes sueños, por su misericordia hacia mí y su inmenso amor derramado en mi vida.

A mi padre (**Héctor Orlando Torres**) porque al igual que para mi este es un sueño para el y por ser el mejor padre de todo el mundo.

A mi hermana (**Sindy Bertrand**) por su apoyo, amor y complicidad en muchas etapas de mi vida.

A mi sobrino precioso por iluminar mi vida te amo **Brian Alejandro**.

A mis compañeras de cuarto (**La Bióloga, china, puchunga, pagri, bufla, curry frepi**) por ser mis compañeras y amigas por compartir estos cuatro años de nuestra vida juntas. Por las lágrimas y risas. Que nunca se olvidaran.

A los que se llaman aleros (**Allan, blandón, Jorge, Harin, Kevin**). Porque a pesar de no ser de mi carrera se portaron de forma muy especial con mi.

A mis compañeros de carrera **Tecnólogos** por ser los mejores hermanos y amigos por las peleas, fiestas, risas y todos los momentos que compartimos juntos.

A mis compañeros de la clase **GÉNESIS** por ser la mejor clase de la historia por cada momento mágico vivido.

A mis amigos del alma (**Cinthia, Arely, Karina, Rony, Eduardo, Billy,**) por estar conmigo en los momentos buenos y malos de mi vida. Y de una u otra manera contribuir a alcanzar mi sueño.

AGRADECIMIENTOS

A **MI DIOS** todo poderoso por su amor y por su misericordia derramada en mi vida porque gracias a el estoy cumpliendo uno mas de mis sueños, por la sabiduría e inteligencia que me brido para poder culminar con éxito mi carrera universitaria.

A **MI PADRE (HÉCTOR TORRES)** porque con su cariño y amor me ha ayudado a cumplir este sueño, por su apoyo espiritual, económico e incondicional en cada momento de mi vida porque sin el no hubiese sido posible alcanzar esta meta.

A mi abuela por todo su amor y consejos

A mi madre por regalarme la vida.

A mis primos lindos por su cariño (**Luis, Lito, Marcela, Michelle, Angie, Daniel.**)

A mi alma mater **Universidad Nacional De Agricultura** que con todo mi amor y cariño la recordare.

A la universidad tecnológica de la mixteca (Oaxaca, México) por darme la oportunidad de realizar mi tesis en sus instalaciones.

A mis asesores **Dr. Liza Padilla, M. Sc Carlos Inestroza, M.Sc Hilsy Sanabria** por sus consejos y ayuda.

A mi asesora principal en México **Dr. Patricia Santiago** por su dedicación, tiempo y ayuda en todos los aspectos, para realizar esta investigación porque sin ella no hubiese sido posible.

A mis maestros por todos sus conocimientos compartidos.

CONTENIDO

ACTA DE SUSTENTACION.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
2.1 General	2
2.2 Específicos.....	2
III.REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1 La Pitaya.....	3
3.1.1 Origen e historia	3
3.1.2 Clasificación taxonómica de la pitaya.....	3
3.1.3 Producción de pitaya	4
3.1.4. Estadios de desarrollo del fruto de pitaya (<i>Stenocereus pruinosus</i>).....	5
3.1.5 Valor nutritivo	6
3.1.6 Usos.....	6
3.2 Enzimas en el área de alimentos.....	6
3.2.1 Hidroperóxido Liasa.....	7
3.2.2 Especificidad del sustrato y del producto en diferentes HPO liasa	8
3.2.3 Regulación y localización.....	8

3.2.4 Estructura.....	9
3.2.5 Mecanismos de reacción.....	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1 Descripción del sitio de la práctica.....	10
4.2 Materiales y equipo	10
4.3 Materia prima	10
4.4 Extracción de la enzima.....	11
4.5 Cuantificación de proteínas totales.....	12
4.6 Detección de la actividad enzimática	12
4.7 Diseño experimental y modelo estadístico	13
4.7.1 Descripción de tratamientos	13
4.7.2 Análisis estadístico	14
4.8 Variables de respuesta	14
4.8.1 Actividad enzimática	14
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1 Detección de la actividad en la enzima HPO liasa en cáscara de fruta de pitaya.....	15
5.2 Determinación de concentración de proteína a partir de la cáscara de la fruta de pitaya fresca y congelada.....	16
5.3 Detección de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato.....	17
5.3.1 Detección con sustrato HPOT	17
5.3.2 Detección con sustrato HPOD.....	18
VI. CONCLUSIONES	20
VII. RECOMENDACIONES.....	21
VIII. BIBLIOGRAFIA	22
IX. ANEXOS	25

ABREVIATURAS

HPO.....	Hidroperóxido
HPOL.....	Hidroperóxido liasa
13-HPOD.....	Acido linoleico
13-HPOT.....	Acido linolenico
AOS.....	Aleno óxido sintasa
CO.....	Óxido de carbono
KDa.....	Kilo Dalton

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos.....	13
Cuadro 2. Formula para determinación de actividad enzimática	14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estadíos del fruto de pitaya, (A) estadío flor, (B) estadío inmaduro, (C) estadío maduro	5
Figura 2. Diagrama de proceso de la extracción de la enzima HPO Liasa.	11
Figura 3. Comportamiento de tres estadios de fruto y tres tiempos de molido con ácido linolenico y ácido linoleico a concentración de 2 mM.	15
Figura 4. Comparación en la concentración de proteína general en la cascara de pitaya en fruta fresca y fruta congelada.....	16
Figura 5. Diferentes concentraciones de sustrato HPOD (acido linolenico).....	17
Figura 6. Diferentes concentraciones de sustrato HPOD (acido linoleico).....	18

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo detección de enzima HPO liasa por el métodos de Bradford.....	26
Anexo 2. Análisis de varianza de datos transformados con LN sobre la actividad enzimática de la HPO liasa y los diferentes estadios de fruto, tiempo de molido y tipo de sustrato utilizados.	26
Anexo 3.Observaciones del sobrenadante a diferentes tiempos de centrifugado.....	27
Anexo 4. Determinación del tiempo de molido.....	27

Torres López, MA. 2012. Detección de la enzima hidroperóxido liasa, en la cáscara de pitaya (*stenocereus pruinosus*) en diferentes estadios de fruto. Tesis Lic. Tecnología Alimentaria. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Olancho Honduras. C.A. 39 Pág.

RESUMEN

El presente estudio fue realizado en la Universidad Tecnológica de la Mixteca México, el cual consistió en: la extracción de la enzima Hidroperóxido liasa, en la cáscara del fruto de pitaya (*stenocereus pruinosus*), evaluando diferentes factores: estadio del fruto (flor, inmaduro y maduro), estado: (fresco o congelado), diferentes tiempos de molido (10, 20 y 30 segundos) y el efecto de dos diferentes tipos de sustrato HPOD y HPOT, luego se determinó por el método de Bradford la concentración de proteína general presente, para finalmente proceder a la detección de actividad enzimática, dicha actividad se detectó por espectrofotometría. Los resultados obtenidos muestran detección de actividad de la enzima; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los factores para la extracción evaluados; por tanto se comprobó que la actividad está presente en su totalidad en la cáscara de la fruta de pitaya. Vale la pena mencionar que aunque no se observó diferencia estadística entre factores, los resultados muestran que la enzima es específica del sustrato HPOD a concentración de 2 mM y que su actividad más alta se encontró en el estadio de fruto: flor a 20 segundos de molido. La enzima HPO liasa se encuentra localizada en los frutos verdes y específicamente es la encargada de las notas verdes o aromas, las cuales se utilizan en la industria alimentaria en forma de C-6 Hexanal.

Palabras Claves: Cáscara de pitaya, HPO liasa, notas verdes, actividad enzimática.

I. INTRODUCCIÓN

Los aromas son productos de gran significado comercial, usados en la industria de alimentos, farmacéutica, cosméticos, perfumerías y detergentes entre otros; esto por el gran auge en la innovación de nuevos productos con aromas naturales y artificiales extraídos de las frutas y vegetales (Ponce 2006). Los aldehídos volátiles y alcoholes son compuestos de 6 carbonos con propiedades aromáticas que determinan un olor característico de una especie vegetal “nota verde” como el de los pepinos, el tomate, el pimiento y la alfalfa. Existen varios estudios sobre la producción de aldehídos de 6 carbonos obtenidos por la acción directa de la enzima hidroperóxido liasa proveniente de extractos de plantas como ser: hojas de menta, pimiento verde, alfalfa, germen de frijol y hojas verdes (Shibata *et al.* 1995).

Una planta de reciente interés en el tema es la pitaya la cual tiene un sabor especial y es rica en azúcares y minerales. El fruto de la pitaya se consume generalmente fresco; también puede utilizarse en cocteles, refrescos, dulces, jugos, jaleas, helados y vinos. El fruto pasa por tres diferentes etapas de madurez fisiológica que pueden ser conocidas por las características de color y brillo que presenta la cáscara del fruto, su suavidad y compactación; estos estadíos son: estadío de flor; estadío inmaduro y el estadío maduro.

El presente estudio fue realizado en la Universidad Tecnológica de la Mixteca, México con el objetivo de detectar la enzima hidroperóxido liasa en la cáscara de pitaya (*Stenocereus pruinosus*) en diferentes estadíos del fruto y de esta manera descubrir nuevas opciones de frutos para la obtención de las notas verdes o aromas, utilizadas en la industria de alimentos en forma hexanal.

II. OBJETIVOS

2.1 General

Detectar la enzima hidroperóxido liasa en la cáscara de pitaya (*Stenocereus pruinosus*) en diferentes estadíos del fruto.

2.2 Específicos

Extraer la enzima hidroperóxido liasa de la cáscara de pitaya en diferentes estadíos de fruto y diferentes tiempos de molido, utilizando dos tipos de sustratos (HPOD, HPOT).

Cuantificar la concentración de proteínas totales por el método de Bradford.

Determinar la actividad de la enzima hidroperóxido liasa por espectrofotometría.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 La Pitaya

3.1.1 Origen e historia

La pitaya es el fruto de una planta rústica xerofítica de la familia de las cactáceas; originaria de América tropical, fue observada por primera vez en forma silvestre por los conquistadores españoles en México, Colombia, Centroamérica y las Antillas, quienes le dieron el nombre de pitaya que significa *fruta escamosa* (Sagarpa 1987).de igual manera comenta que en los mercados internacionales, actualmente se comercializan la pitaya amarilla y la pitaya roja. La pitaya amarilla se comenzó a cultivar comercialmente en Colombia a comienzos de la década de los 80, principalmente con fines de exportación, promovida como cultivo de diversificación de zonas cafeteras por el Programa de Desarrollo y Diversificación de la Federación Nacional de Cafeteros

3.1.2 Clasificación taxonómica de la pitaya

El estudio taxonómico de las cactáceas actualmente se encuentra en proceso de desarrollo. Es importante remarcar que todavía se presentan divergencias en cuanto a ciertos niveles de organización. La especie *steneocereus spp*, pertenece al reino vegetal, subreino: Embriophyta, División: Angiospermae, Clase: dicotiledoneae, Orden: cactales, Familia cactaceae, Subfamilia: Cactoideae, Tibu: Pachycereinae, Género: Stenocereus (Pimienta 1999).

Según Bravo (1978) el género *Stenocereus* comprende las especies de mayor valor comercial y las de mejor sabor, está constituido por 24 especies de las cuales en México se encuentran 19 distribuidas en casi todo el país. La etimología *Steneocereus* deriva de las palabras “steno” que significa delgado y “cereus” que alude a cirio, vela de cera larga y gruesa.

3.1.3 Producción de pitaya

De acuerdo con la experiencia y la práctica de los productores de esta fruta, las zonas adecuadas para su cultivo están entre 1400 y 1700 msnm, con temperaturas que fluctúan entre 14°C y 26°C. Otras condiciones óptimas que se han identificado son una precipitación de 1500 a 2000 mm por año y un sombrío de 40% a 60% (en lugar de alta luminosidad, como se creía inicialmente), junto con un suelo de textura suelta con un pH entre 5.5 y 6.5, con altos contenidos de materia orgánica y pendiente del 50%. Cabe señalar, que estas condiciones pueden variar ligeramente entre las diferentes zonas altitudinales. Por tratarse de una planta que en su estado silvestre crece trepando por árboles, piedras o muros, el cultivo comercial de la pitaya requiere un sistema de tutorado (Sagarpa 1987).

Las plantaciones pueden llegar a tener una vida útil superior a los 10 años, dependiendo de las condiciones agroclimáticas y del manejo que se dé al cultivo. La producción se inicia a partir del segundo año de establecido el cultivo, con un promedio de 3 a 4 frutos por planta y aumenta continuamente hasta el quinto o sexto años cuando alcanza una producción promedio de 4.5 kg por planta, lo cual, para una densidad de siembra recomendada de 2,200 plantas por hectárea, representa una productividad aproximada de 10 toneladas por hectárea (Sagarpa 1987).

3.1.4. Estadios de desarrollo del fruto de pitaya (*Stenocereus pruinosus*)

Estadio I: Flor. Es cuando el botón “abre”, es decir que se separan los tépalos y presenta los pétalos estos son de color blanco y presenta una gran cantidad de estambres también en color blanco. (Figura 1 A) (Yañes 2009).

Estadio II: Fruto inmaduro. En este punto se desarrollan rápidamente las espinas, lo que da al fruto la apariencia de tener una mayor cantidad en este estadio. Aquí resulta muy fácil ver las espinas emergiendo de las areolas (Figura 1 B) pero se puede apreciar claramente que se encuentran en la punta de las estructuras anatómicas que forman la pared del ovario que se convierte gradualmente en el fruto. Este proceso parece proteger al fruto en esta delicada etapa de su desarrollo (Yañes 2009).

Estadio III: Fruto maduro. Conforme el fruto alcanza su madurez, el crecimiento longitudinal se hace más lento y en cambio se incrementa el diámetro ecuatorial, probablemente por la acumulación de agua en sus tejidos, lo que gradualmente va proporcionando al fruto su clásica forma aovada o redondeada. Al crecer, la superficie se estira y las estructuras que componen la pared del fruto parecen unidas haciendo la parte exterior tersa y homogénea salvo por la presencia de las areolas (Figura 1 C) (Yañes 2009).



Figura 1. Estadios del fruto de pitaya, (A) estadio flor, (B) estadio inmaduro, (C) estadio maduro

3.1.5 Valor nutritivo

Además del sabor especial que tienen las pitayas, los análisis bromatológicos han demostrado que son ricas en azúcares y minerales, aunque bajas en vitamina C (Granados 1999).

Según Becerra (1987), la pitaya es un fruto rico en fibra y en proteína en comparación con otros frutos. Ya que contiene 6.93% de fruto íntegro y 9.07% de pulpa siendo estos componentes de la proteína. También 16.76% de fruto íntegro y 23.15% de pulpa componentes de fibra cruda.

3.1.6 Usos.

El fruto por su olor y color se presta muy bien para confeccionar arreglos frutales. La pulpa en pedazos es un buen complemento en ensaladas de frutas y por su color es una gran alternativa. El fruto de la pitaya se consume generalmente fresco; también puede utilizarse en cocteles, refrescos, dulces, jugos, jaleas, nieves y vinos. Las semillas contienen un efecto de aceite laxante y ayudan al buen funcionamiento del aparato digestivo. La pulpa contiene una sustancia llamada captina que actúa como tonificante del corazón y calmante de los nervios (Becerra 1987.)

3.2 Enzimas en el área de alimentos

De las miles de enzimas reconocidas, solo algunas se conocen a nivel industrial, para emplearse en la manufactura tanto de los alimentos como en materias primas (Badui 2006). Las enzimas son productos de las células, y por lo tanto pueden obtenerse a partir de tejidos animales, tejidos vegetales o mediante procesos de fermentación empleando microorganismos seleccionados. Las plantas han sido la fuente tradicional de ciertas enzimas, a partir del látex producido por la papaya, o de algunas proteasas aisladas de la higuera y la piña. La cebada malteada también ha sido fuente importante de enzimas

vegetales. La industria cervecera ha empleado tradicionalmente este material crudo por su actividad proteásica y amilásica. En cuanto a las enzimas de origen animal, se han obtenido pocas, por ejemplo lipasa pancreática y tripsina, debido principalmente a la disponibilidad limitada de material adecuado y a la posibilidad de reemplazarlas por enzimas similares derivadas de microorganismos. Debido a que las aplicaciones industriales de las enzimas requieren que éstas sean producidas a gran escala y bajo costo, El empleo de algunas enzimas de origen vegetal y animal ha ido decayendo, a favor de las enzimas de origen microbiano, Revista Virtual Pro (2010).

La lipoxigenasa (LOX, EC 1.13.11.12). Es una enzima que cataliza reacciones de oxidación de ácidos grasos insaturados que presentan en su estructura un sistema cis-1,4-pentadieno originando hidroperóxidos conjugados como productos primarios de oxidación. Esta enzima pro oxidante está ampliamente distribuida en vegetales, animales, hongos y algunas bacterias. En el reino vegetal, la LOX interviene en la germinación de semillas, maduración de frutos, mecanismos de defensa frente a factores de estrés, etc. En mamíferos, los productos resultantes de su actividad catalítica son intermediarios en la formación de biorreguladores involucrados en procesos como inflamación, artritis, etc. (Robinson 1995).

3.2.1 Hidroperóxido Liasa

La enzima hidroperóxido liasa de ácido graso es una enzima que divide la unión C-C de los hidroperóxidos (HPOs) de los ácidos grasos poliinsaturados para generar aldehídos. Esta enzima es ampliamente distribuida en plantas y está involucrado en la biosíntesis de aldehídos volátiles y los alcoholes. También es un componente importante de los sabores característicos de las verduras y las hojas verdes. Además es una enzima clave implicada en la producción los ácidos grasos como los ácidos linolénicos en alfa y linoleico en cualquier átomo de carbono C-9 o C-13 para producir lo correspondiente 9 o 13 Hidroperóxidos; esta enzima es la que hace que se ponga en cortocircuito los productos de aldehído de la cadena según la especificidad del sustrato (Hatanaka 1995).

3.2.2 Especificidad del sustrato y del producto en diferentes HPO liasa

Las HPO liasa se clasifica en dos grupos, conforme a la especificidad del sustrato. Un grupo divide los 13-HPOD en 12-oxo-(9Z)-ácido dodecenoico y hexanal, y α -13-HPOT en 12-oxo-(9Z)-ácido dodecenoico y (3Z)-hexenal. El otro grupo divide los isómeros 9 hidroperóxidos de ácido linoleico y α -ácido linolenico en 9-oxo ácido nonanoico y (3Z) nonenal o 9-oxo ácido nonanoico y (3Z 6Z)-nonadienal respectivamente. Las plántulas de sandía, hojas de té, tomate, manzanas, pimientos dulces y la soya, contienen la actividad de la HPO liasa; se obtuvo éxito en la determinación de la actividad de HPO liasa en 13-HPO y 9-HPO para plántulas de pepino, indicando que las diferentes enzimas son específicas para diferentes sustratos. Recientemente se hizo una copia clónica de la enzima HPO liasa a partir del pepino en la que se compararon 2 sustratos y en cual se demostró una similitud de la secuencia de Aleno Oxido Sintasa en comparación a la de 13-HPO liasa (Matsui *et al.* 2000).

3.2.3 Regulación y localización

Según Vick y Zimmerman (1976), en plántulas de pepinos y sandías, las raíces son la fuente más rica de la actividad de la HPO liasa. Por otra parte un análisis inmunoblot del tejido de los pimientos mostró que la HPO liasa se encuentra en las células externas en el parénquima del pericarpio. Esto concuerda con las referencias respecto al papel principal de protección de las plantas contra los ataques del exterior. La localización de la HPO liasa parece estar relacionada con el crecimiento celular y el desarrollo (Shibata *et al.* 1995). La actividad HPO liasa en células de *Marchantia polymorpha* es mayor cuando las células están creciendo logarítmicamente y disminuye rápidamente cuando las células entran en la fase estacionaria (Matsui *et al.*, 2000). Se cree que las HPO liasas son proteínas de membrana y los detergentes son necesarios para su solubilización. En algunas fuentes vegetales la HPO liasa se localiza en el cloroplasto o en los microsomas mientras que en otros no hay ninguna localización específica (Bate *et al.*, 1998).

3.2.4 Estructura

Los genes que codifican a la enzima Hidroperóxido liasa hasta el momento han mostrado un peso de 55kDa. Estudios basados en electroforesis de varios hidroperóxidos liasas aisladas de plantas han mostrado subunidades de 55-60 kDa, se ha propuesto que la enzima existe como trímeros o tetrámeros de alrededor de 200-250 kDa. Con base en su homología de secuencia, la HPO liasa fue identificada como enzima citocromo P450 ya que las masas de la HPO liasas encontradas son similares a los de otros citocromos de enzimas P450. El grupo hemo en el sitio activo el cual fue identificado como hemo b, es otra característica de las enzimas del citocromo P450, la HPO liasa contiene una cisteína altamente conservada, que se supone que es el grupo hemo. La HPO liasa sin embargo, no muestra un máximo de absorción a 450 nm después de la reducción y el tratamiento con oxido de carbono (Shibata *et al*, 1995).

3.2.5 Mecanismos de reacción

Se ha encontrado que los hidroperóxidos de ácidos grasos pueden ser divididos homolíticamente en una reacción de auto oxidación. Así como también puede ser dividido heterolíticamente en una reacción catalizada por un ácido, durante mucho tiempo se pensó que un mecanismo de reacción heterolítico ocurría probablemente en la acción de la HPO liasa, debido a que los productos de la reacción heterolítica se parecían a los formados por las HPO liasas. Se propuso un mecanismo de reacción heterolítico en donde en primer lugar los 13-hidroperóxidos son divididos por la HPO liasa, la hidroperóxido liasa protona el hidroperóxido, causando una ciclización en un 12,13-epoxycarbocation y la pérdida de una molécula de agua. Un catión éter alílico localizado en el C13 es formado a través de un 1,2-desplazamiento de la unión del C13 al oxígeno deficiente en electrones. Posteriormente, la adición de agua produce una reordenación espontánea del intermediario dando lugar a la formación de un oxoácido C12 y un aldehído C6 (Matsui, *et.al*, 2000).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Descripción del sitio de la práctica

La práctica se llevó a cabo en México, en los laboratorios de Ciencia de los Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca ubicada en el municipio de Huajuapán de León, la cual tuvo una duración de 3 meses y medio.

4.2 Materiales y equipo

El material utilizado para la investigación consistió en: frutos de pitaya de la especie (*Stenocereus pruinosus*), buffer fosfato de potasio, dos tipos de sustrato: ácido linoleico y ácido linolénico, detergente bioquímico Tritón 100 X R, reactivo de Bradford, papel filtro, pipetas, tubos eppendorf, tubos de ensayos, buretas, beakers. El equipo utilizado fue: licuadora, centrifuga, espectrofotómetro.

4.3 Materia prima

Se utilizaron pitayas recolectados en Santa María Camotlán. Huajuapán de León, Oaxaca. Para la recolección de las frutas se utilizó una canasta térmica, para evitar daño mecánico y que este interfiriera en la extracción de la enzima. Para la extracción en fruta fresca se hizo la recolección diaria y se cortaron 3 frutas una para cada estadio del fruto (Estadio flor, estadio inmaduro estadio maduro) y para la extracción en fruta congelada, estas se almacenaron a -4°C para evitar pérdidas en sus propiedades químicas.

4.4 Extracción de la enzima

En la primera fase, previo a la extracción de la enzima se realizaron pruebas para determinar el tiempo óptimo de molido (10, 20 y 30 segundos) (Anexo 3), de igual manera se realizaron pruebas para la determinación del tiempo de centrifugado (5, 10 y 15 minutos) (Anexo 4), ideales para la extracción de la enzima.

Para la extracción de la enzima (Figura 2), primeramente se retiró la pulpa de las cáscaras y se cortaron en pequeños trozos, luego se licuo la cáscara con 25ml de Tampón fosfato de potasio, 0.1 M, pH7 conteniendo un detergente bioquímico (Tritón X-100R al 0.5%), el cual facilito la separación y la solubilización de la enzima de la membrana. Una vez licuada la cáscara, la suspensión se centrifugo a 9000 rpm esto para la clarificación y se recuperó el sobrenadante el cual contiene la enzima (Psylinakis *et al.* 2001). Este mismo procedimiento se utilizó para la extracción en frutas congeladas y frescas.

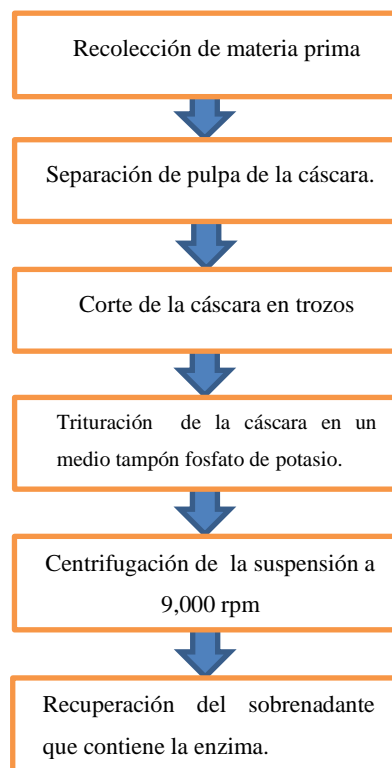


Figura 2. Diagrama de proceso de la extracción de la enzima HPO Liasa.

4.5 Cuantificación de proteínas totales

Después de la obtención de los extractos celulares (sobrenadante) se cuantificó la cantidad de proteína total por el método de Bradford (Bradford et al 1976) (Anexo 1), el cual consiste en la obtención de una curva patrón con proteína de albumina bovina y partir de allí se realiza la determinación de la concentración en la enzima que se está utilizando (proteína general). Para la cuantificación se utilizó 3 ml de reactivo de Bradford, 300µl de proteína (sobrenadante que contiene la enzima) seguidamente se hace la lectura a 595nm. por espectrofotometría; luego se verifican los datos obtenidos con la curva patrón para asegurarse que se encuentren dentro del rango permitido y de esta forma hacer los cálculos en U/L de solución.

4.6 Detección de la actividad enzimática

La actividad de la enzima hidroperóxido liasa fue medida por el rompimiento del conjugado dieno de hidroperóxidos de ácidos grasos haciendo uso de un espectrofotómetro marca (GENESIS), una celda de cuarzo de 1 mm de grosor, a la cual se le añadió 10 µl de sustrato (HPOT=ácido linolenico, HPOD=ácido linoleico a una concentración de 2 mM) 10µl del sobrenadante que contiene la enzima, 2,980µl de buffer fosfato de potasio pH 6.8, haciendo un total de 3,000 µl de muestra; la cual se introdujo al espectrofotómetro y de esta manera la actividad fue detectada por el decremento en absorbancia a 234 nm (Vick y Zimmerman 1976).

4.7 Diseño experimental y modelo estadístico

Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño trifactorial (DTF) en dieciocho (18) tratamientos con tres (3) repeticiones cada uno. El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + C_j + B_iC_j + E_{ijk}$$

Y_{ijk} =efecto del i-ésimo estadio de maduración, j-ésimo tiempo de molido en la k-ésima repetición sobre la actividad de la enzima hidropéroxido liasa.

μ =media de todas las observaciones

B_i =i-esimo efecto del estadio del fruto sobre la actividad de la enzima hidropéroxido liasa.

B_iC_j =interacción del efecto de la i-ésimo estadio con el efecto del j-ésimo tiempo de molido en la extracción de la enzima hidropéroxido liasa

E_{ijk} =error independiente con distribución normal, esperanza cero y varianza homogénea.

4.7.1 Descripción de tratamientos

El Cuadro 1 muestra la distribución de tratamientos donde se evaluaron dieciocho tratamientos con tres repeticiones cada uno, analizándose tres diferentes tiempos de molido y dos diferentes tipos de sustrato, para un total de 54 muestras.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos

Tratamientos	Estadíos	Tiempos de molido	Tipos de sustrato
T1	Flor	10	HPOD
T2	Flor	10	HPOT
T3	Flor	20	HPOD
T4	Flor	20	HPOT
T5	Flor	30	HPOD
T6	Flor	30	HPOT
T7	Inmaduro	10	HPOD
T8	Inmaduro	10	HPOT
T9	Inmaduro	20	HPOD
T10	Inmaduro	20	HPOT
T11	Inmaduro	30	HPOD
T12	Inmaduro	30	HPOT
T13	Maduro	10	HPOD
T14	Maduro	10	HPOT
T15	Maduro	20	HPOD
T16	Maduro	20	HPOT
T17	Maduro	30	HPOD
T18	Maduro	30	HPOT

4.7.2 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico en el programa infostat con una significancia del 5 %.

4.8 Variables de respuesta

4.8.1 Actividad enzimática

Fue determinada por el decremento en absorbancia utilizando el método de espectrofotometría, seguidamente calculando su actividad con la formula (Cuadro 2) obteniendo los resultados en porcentaje unidades por litros de solución (U/L) de cada tratamiento.

Cuadro 2. Formula para determinación de actividad enzimática

Formula actividad		
V. Total	Δ Absorbancia	1
V. Muestra	Δ Tiempo	ϵ enzima (concentración de prot)

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Detección de la actividad en la enzima HPO liasa en cáscara de fruta de pitaya

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran detección de actividad enzimática de la HPO liasa en la cáscara de fruto de pitaya; sin embargo no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los factores de extracción evaluados en relación con la variable respuesta: actividad enzimática de la HPO liasa (Anexo 2), por tanto se determinó que la actividad está presente en su totalidad en la cáscara de la fruta de pitaya, diversos estudios han reportado la detección de la enzima en diferentes cultivos como ser: hojas de tomate por Shibata *et al* (1995), hojas de amaranto por Olías *et al* (1991) Pimiento dulce por Psylinakis *et al* (2001) y en plántulas de sandía, hojas de té, manzanas, y soya por (Matsui *et al.* 2000).

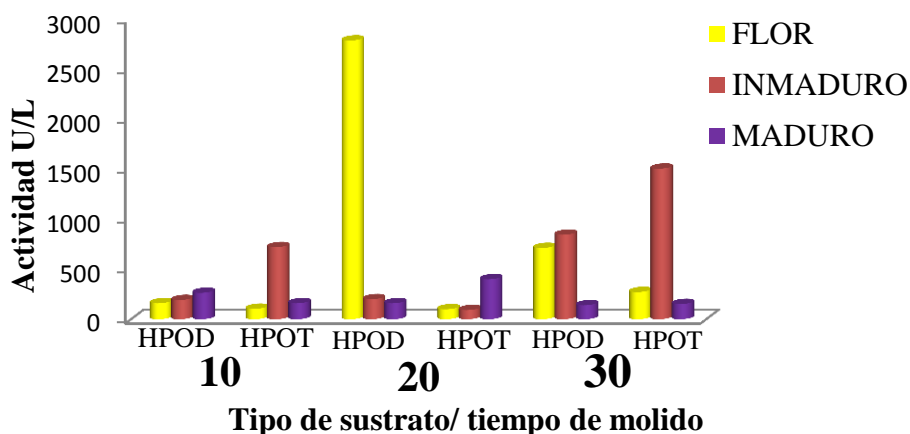


Figura 3. Comportamiento de tres estadios de fruto y tres tiempos de molido con ácido linolenico y ácido linoleico a concentración de 2 mM.

La Figura 3 muestra el comportamiento de la actividad de la enzima Hidroperóxido liasa, observándose que aunque no existe diferencia estadística entre los factores en estudio la mayor actividad de la enzima se detectó en el estadio flor a 20 segundos de molido con el sustrato HPOD a concentración de 2mM. Donde la actividad fue de (2,500 U/L).

La localización de la HPO liasa parece estar relacionada con el crecimiento celular y el desarrollo (Shibata *et a.*1995). Un estudio realizado en células de *marchantia polymapha* reporta que la actividad de la enzima es mayor cuando las células están creciendo y disminuyen rápidamente cuando las células están en fase estacionaria (Matsuit *et al*, 2000).

5.2 Determinación de concentración de proteína a partir de la cáscara de la fruta de pitaya fresca y congelada

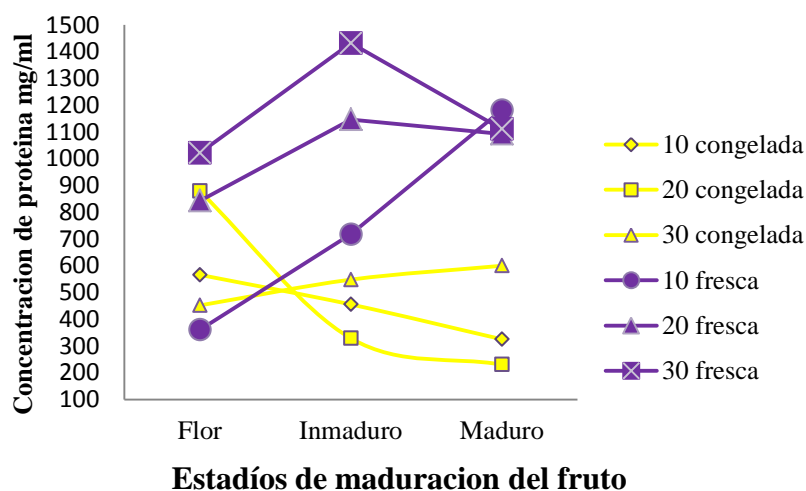


Figura 4. Comparación en la concentración de proteína general en la cáscara de pitaya en fruta fresca y fruta congelada.

Previo a la detección de actividad de la enzima Hidroperóxido liasa se realizaron pruebas para determinación de concentración de proteína general en cáscara de pitaya en las cuales se observó, que la mayor concentración de proteína total en la cáscara de pitaya en fruta fresca se obtuvo en el estadio inmaduro a 30 segundos de molido y la más alta concentración de proteína en fruta congelada se encuentra el estadio de flor a 10 segundos de molido (Figura 4).

Una de las posibles razones por las cuales se determinó una menor concentración de proteínas en las frutas que sufrieron un proceso de congelación, es debido a que cuando las frutas son congeladas, lentamente se da la formación de cristales de hielo los cuales dañan los tejidos de la fruta (pared celular) permitiendo la liberación de sustancias dentro de las células, al momento en que las frutas se descongelan se produce una exudación, este conjunto de procesos pueden tener un impacto en la concentración de proteínas presentes en la cáscara.

5.3 Detección de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato

5.3.1 Detección con sustrato HPOT

La figura 5 refleja los resultados obtenidos, de las muestras evaluadas, para la determinación óptima de concentración de sustrato en la detección de actividad enzimática, con un estado de fruto de flor a 20 segundos de molido, donde anteriormente se encontró una alta actividad a concentración de 2 mM.

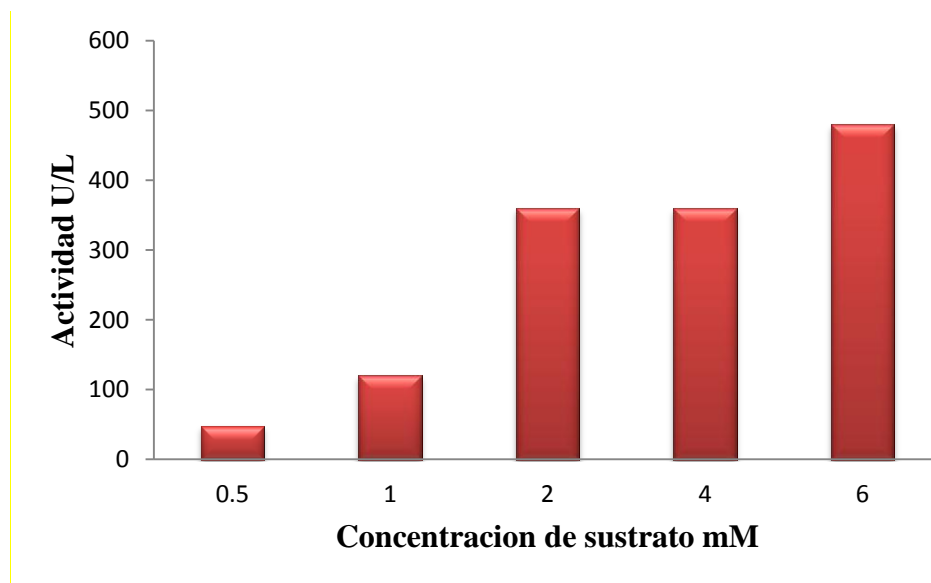


Figura 5. Diferentes concentraciones de sustrato HPOD (acido linolenico).

La concentración de sustrato es un factor indispensable en la detección de actividad de enzimas ya que de ello depende la manera como reaccione; al evaluar el efecto de la concentración del sustrato HPOT (ácido linolénico) sobre la actividad de la enzima HPO liasa se observó que la actividad se incrementa conforme aumenta la concentración de sustrato y se hace máximo en 6 mM; con una actividad de (480 U/L) y a partir de allí la actividad empieza a verse inhibida o saturada de igual forma que reporta (Rivera *et al* ;2006) en un estudio realizado sobre la concentración de sustrato en la enzima catalasa y peroxidasa en pitaya amarilla.

5.3.2 Detección con sustrato HPOD

En la figura 6 se muestran los resultados de la evaluación a diferentes concentraciones de sustrato HPOD sobre la actividad de la enzima HPO liasa. Para determinar a que concentración la enzima muestra mayor actividad y a que concentración la enzima se satura y ya no se encuentra actividad enzimática.

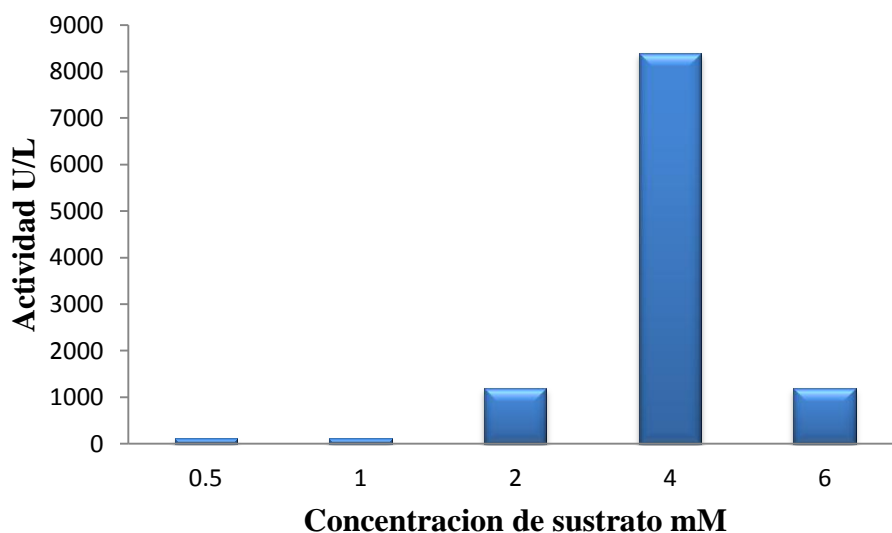


Figura 6. Diferentes concentraciones de sustrato HPOD (ácido linoleico)

Los resultados muestran un aumento en la actividad de la enzima al incrementar la concentración del sustrato (figura 6) se observó que la actividad de la enzima es alta a concentración 4 mM (8400 U/L) a diferencia del sustrato HPOT donde la mayor fue a 6mM (480 U/L) seguidamente la enzima comenzó a inhibirse. Se determinó que la enzima es mas específica para el sustrato HPOD ya que después de la comparación de las dos pruebas en el mismo estadio de fruto (flor, inmaduro, maduro) y al mismo tiempo de molido (10, 20, 30) segundos; se encuentra una actividad mucho mas alta a todas las concentraciones. Similares a los estudios reportados por (Shibata *et al*, 1995) realizados en hojas de tomate y olías *et al* (1991) en un estudio sobre pimiento dulce.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ La cáscara de los frutos de pitaya contienen la enzima hidróperóxido liasa en los 3 estadios del fruto (flor, inmaduro y maduro), los tres tiempos de molido y con los 2 diferentes tipos de sustratos (HPOD) (HPOT) evaluados.

- ✓ La concentración más alta de proteína general en pitaya se encuentra en fruta fresca y en menor cantidad en fruta congelada.

- ✓ Se encontró que la enzima Hidróperóxido liasa es específica del sustrato HPOD obteniéndose una actividad de (2500 U/L) en el estadio flor a 20 segundos de molido a concentración de 2Mm.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Utilizar las frutas de pitaya frescas para la extracción de la enzima HPO liasa.
- ✓ Realizar las pruebas de extracción de la enzima en pulpa de pitaya
- ✓ Elaborar manualmente en el laboratorio los hidroperóxidos de ácidos grasos (linolénico, linoleico) para la detección de la enzima ya que comprarlos tienen un precio comercial alto.
- ✓ Utilizar el tiempo a 10 segundos de molido ya que es en ese tiempo donde se puede hacer la extracción de la manera mas fácil.
- ✓ Centrifugar la solución que se obtiene de la extracción por 15 minutos para obtener un sobrenadante limpio y fácil de utilizar para la determinación de concentración de proteína y por consiguiente la detección de actividad enzimática.
- ✓ Usar el estadio de fruto flor a 20 segundos de molido con el sustrato HPOD para la detección inmediata de la enzima HPO liasa ya que en este estadio y a este tiempo de molido se encontró la mayor actividad estadísticamente de los 18 tratamientos.
- ✓ Las concentraciones de sustrato sobre la HPO liasa utilizada para la detección de actividad enzimática en frutos de pitaya debe ser de 2mM a 6mM para HPOD y de 2 mM a 4 mM para HPOT ya que a concentraciones más altas la reacción se inhibe o satura y no permite la detección; y a una concentración menor a 2 mM se detecta actividad despreciable para ser tomada en cuenta como U/L de la enzima.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Badui, DS. 2006. Química de alimentos aroma y sabor ciudad de México Pearson educación. cap10 pag 663.

Bate, NJ; Sivasankar S; Moxon C; Riley; JMC; Thompson; JE. y Rothstein SJ. 1998 Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible, *Plant Physiol.* **117**, 1393-1400.

Becerra Ochoa, LA. 1987. El cultivo de la pitaya. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Bradford, MM. 1976 A rapid and sensitive method for the quantification or microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*72, 248-254.

Bravo, HH. 1978. Las cactáceas de México. 2ª. ed. vol. I. UNAM, México. Pp643.

Hatanaka, A. 1995. Purification and properties of fatty acid hydro peroxide lyase from green bell pepper fruits. *Plant Cell Physiol.*36, 147-156.

Matsui K; Ujita C; Fujimoto S; Wilkinson J; Hiatt B; Knauf V; Kajiwara T; and Feussner, I. 2000. Fatty acid 9 and 13-hydroperoxide lyases from cucumber, *FEBS Lett.*481, 183-188

Muller, BL; 1995. The Industrial Use of Plant Enzymes for the Production of Natural “Green Note” Flavour Compounds. *Bioflavour*.95, 14-17.

Olías, JM; Rios JJ; Valle M; Zamora R; Sanz LC; and Axelrod, B. 1991. Fatty acid hydroperoxide lyase in germinating soybean seedlings, *J. Agric. Food Chem.* 38, 624-630.

Pimienta, BE; 1999. El pitayo en Jalisco y especies afines en México. Universidad de Guadalajara. Fundación Produce Jalisco,A.C., Guadalajara,Jalisco,Mexico.223p.

Psylinakis, E; Davoras EM; Ioannidis N; Trikeriotis M; Petrouleas V; Ghanotakis. 2001. DF. Isolation and spectroscopic characterization of recombinant bell pepper hydro peroxide lyase. *BiochimBiophys Acta*2001;1533:119–27.

Granados, DS; Mercado AB Y Florencia GL. 1999. Las pitayas de México. *Revista Ciencia y desarrollo* Vol. xxv # 145. Pág. 67-59.

Rivera, JA; Duarte LE; Narvárez CE. 2006. Catalasa, peroxidasa y polifenoxidasa de pitahaya amarilla. *Revista colombiana de química*. Vol. 35 n 1.

Revista virtual pro.2010. Enzimas en alimentos virtual pro. Vol. ISSN 1900-6241 #101. Pág. 16.

Robinson DS; Zecai W; Claire D; Rod C; 1995. Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chemistry*, 54, 33–43.

Sagarpa.1987. El cultivo de la pitaya en Colombia en línea www.sagarpa.com

Shibata Y Matsui K; Kajiwara T and Hatanaka, A. 1995 Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 438-443.

Vick BA. and Zimmerman, D.C. 1976 Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings, *Plant Physiol.* 57, 780-788.

Yañes LL. 2009. Estudio de tres cactáceas de la Mixteca baja. Desarrollo de frutos de pitaya *Stenocereus*. Ciudad de México Printed in México, pag 50-51

IX. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo detección de enzima HPO liasa por el métodos de Bradford.

Procedimiento

Consiste en Preparar una curva patrón de albúmina bovina en un rango desde 0 hasta 60 µg; de tal manera que el volumen final en cada tubo sea de 300 µl. Mezclar para ello el volumen adecuado de la disolución madre de albúmina bovina de un 1 mg/ml y el correspondiente volumen necesario de agua, de acuerdo con la siguiente tabla:

µg (prot)	0	10	20	30	40	50	60
µg (alb)	0	10	20	30	40	50	60
µg (agua)	300	290	280	270	260	250	240
µg total	300	300	300	300	300	300	300

Finalmente añadir 3 ml del reactivo de Bradford a todos los tubos; tanto a las diluciones que contienen la albúmina como a las que contienen la proteína diluida. Agitar los tubos y a continuación proceder a la lectura de la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

Anexo 2. Análisis de varianza de datos transformados con LN sobre la actividad enzimática de la HPO liasa y los diferentes estadíos de fruto, tiempo de molido y tipo de sustrato utilizados.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LN Actividad Enzima		54	0,31	0,00 21,22

	FV	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo		20.82	17	1.22	0.97	0.5066
Estadio		1.29	2	0.64	0.51	0.6041
Tiempo		0.46	2	0.23	0.18	0.8354
Sustrato		0.01	1	0.01	0.01	0.9438
Estadio * tiempo		6.55	4	1.64	1.30	0.2886
Estadio * Sustrato		4.78	2	2.39	1.90	0.1646
Tiempo * Sustrato		1.82	2	0.91	0.72	0.4929
Estadio*Tiempo*sustrato		5.93	4	1.48	1.18	0.3377
Error		45.35	36	1.26		
Total		66.18	53			

5% significancia

P-valor= probabilidad

N=total corridas experimentales

R²= porcentaje de ajuste de datos al modelo

CV= coeficiente de variación de datos.

Anexo 3. Observaciones del sobrenadante a diferentes tiempos de centrifugado

Tiempo de Centrifugado (min)	Observaciones
5	Se presentó dificultad para separar los solidos del líquido.
10	El sobrenadante se torno sucio y fue difícil extraerlo de los Tubos de ensayo, esto sucedió debido a las características físicas de la fruta ya que esta muy viscoso y no se pudo Separar completamente la parte solida.
15	Es aquí donde se obtuvo el sobrenadante de forma deseada y la cantidad necesaria para los estudios de la enzima .
20	Se obtuvo el sobrenadante de manera muy clarificada. Y toda la parte solida cambia de color.

Anexo 4. Determinación del tiempo de molido

Tiempo de Molido	Sobrenadante (ml)	Observaciones
1 min	3.5	Se lograron separar los residuos solidos de los líquidos pero no totalmente clarificados.
30 seg	4.5	Se lograron separar los residuos del líquido pero no totalmente clarificados.
20 seg	5.5	Se lograron separar los residuos del líquido pero no totalmente clarificados.
10 seg	6.0	Mejor sedimentación de los residuos y obtención del sobrenadante deseado