

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO LIPOLÍTICO  
IDENTIFICADO EN EL LÁTEX DE JACA (*Artocarpus heterophyllus* L.)**



Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de:  
**Maestro en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias  
Agrícolas**

**PRESENTA:**

**VICTORIA MARTÍNEZ ACEBEDO**

**DIRECTOR: DRA. LETICIA MÓNICA SÁNCHEZ HERRERA**

**CODIRECTOR: DRA. MARÍA TERESA SUMAYA MARTÍNEZ**

Xalisco, Nayarit, Octubre 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

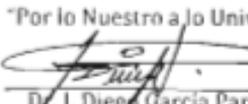
CHAP/204/16.

Xalisco, Nayarit; 14 de octubre de 2016.

**ING. ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**P R E S E N T E.**

Con base al oficio de fecha 11 de octubre del presente, enviado por los CC. Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera, Dra. María Teresa Sumaya Martínez, Dr. Edgar Iván Jiménez Ruíz, Dra. Leticia Guerrero Rosales y Dra. Claudia Amézcua Vega, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza a la QFB. Victoria Martínez Acebedo, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"Por lo Nuestro a lo Universal"  
  
Dr. J. Diego García Paredes  
Coordinador del Posgrado  
  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE NAYARIT  
POSGRADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICO  
AGROPECUARIAS

C.c.p.- Expediente

8211

Tepic, Nayarit; 11 de octubre de 2016

**DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO CBAP**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**P R E S E N T E**

Los que suscribimos, integrantes del consejo Tutorial de la QFB. Victoria Martínez Acebedo, declaramos que hemos revisado la tesis titulada "Evaluación de la actividad del complejo lipolítico identificado en el látex de jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.)", y determinamos que la tesis puede ser presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias Biológico Agropecuarias con opción terminal en Ciencias Agrícolas

**ATENTAMENTE**  
**EL CONSEJO TUTORAL**



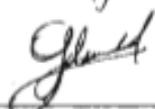
\_\_\_\_\_  
Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera  
Director



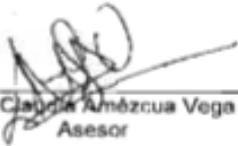
\_\_\_\_\_  
Dra. María Teresa Bumsaya Martínez  
Co-Director



\_\_\_\_\_  
Dr. Edgar Iván Jiménez Ruiz  
Asesor



\_\_\_\_\_  
Dra. Leticia Guerrero Rosales  
Asesor



\_\_\_\_\_  
Dra. Claudia Amézcuea Vega  
Asesor

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Análisis Especiales de la Unidad de Tecnología de Alimentos y el Laboratorio de Análisis Cuantitativo del Área de Ciencias Básicas e Ingenierías en la Universidad Autónoma de Nayarit.

*El que quiere hacer algo conseguirá  
un medio, el que no, una excusa."*

**Stephen Dolley**

## DEDICATORIA

A Dios por guiarme siempre

A mi madre Maricela por ser mi fortaleza y motivarme a ser mejor cada día

A mis amigos y

Con amor a Lucio Antonio que me ha apoyado incondicionalmente y ha estado conmigo en los bueno y en los malos momentos por los que he atravesado.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera mi director de tesis, por todos los conocimientos y experiencias que compartió conmigo, por su valioso tiempo y dedicación para la realización de esta tesis.

A la Dra. María Teresa Sumaya Martínez por su tiempo, paciencia y dedicación para guiarme durante el desarrollo de este trabajo.

A mi asesor de tesis Dr. Edgar Iván Jiménez Ruiz por su orientación, explicación y recomendaciones relacionadas al trabajo desarrollado.

A la Dra. Leticia Guerrero Rosales por sus gestos de amabilidad para brindarme orientación y apoyo durante la realización de esta tesis.

Al M.C. Yolotzin Apatzingan Palomino Hermosillo por sus enseñanzas, sus consejos y motivación durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Rosendo Balois Morales por facilitarnos el equipo liofilizador para dar continuidad a los procesos del presente trabajo.

A todas las personas que estuvieron conmigo y que participaron directa o indirectamente en este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS - FINANCIAMIENTOS**

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit y por el apoyo con una beca, con el número de CVU 623279. Esta investigación fue realizada en la Unidad de Tecnología de Alimentos, Secretaría de Investigación y Posgrado bajo la dirección de la Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera.

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.

A la Dra. Leticia Guerrero Rosales por todo el apoyo recibido con las instalaciones del Laboratorio de Análisis Cuantitativo del Área de Ciencias Básicas e Ingenierías y reactivos para las pruebas de transesterificación.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2.- REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. La jaca ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> L.).....	3
2.2. Biocatalizadores.....	4
2.3. Enzimas lipolíticas.....	4
2.3.1. Clasificación de las enzimas lipolíticas.....	5
2.3.2. Mecanismo de acción de las lipasas.....	7
2.3.3. Multiplicidad de las lipasas.....	9
2.4. Reacciones de transesterificación.....	9
2.4.1. Transesterificación de aceites.....	10
2.4.2. Factores que afectan la transesterificación enzimática.....	11
2.4.2.1. Relación molar alcohol: aceite y tipo de alcohol.....	11
2.4.2.2. Solventes.....	12
2.4.2.3. Temperatura y tiempo.....	13
2.4.2.4. Intensidad de mezclado.....	13
2.4.2.5. Concentración de enzima.....	14
2.4.2.6. Estado de la enzima.....	14
2.4.2.7. Contenido de agua.....	14
2.5. Investigación de lipasas en la transesterificación.....	15
2.6. Aplicación de las lipasas en la industria.....	17
<b>3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	18
3.1. Justificación.....	18
3.2. Hipótesis.....	19
3.3. Objetivo general.....	19
3.3.1. Objetivos específicos.....	19
<b>4.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
4.1. Obtención de extracto crudo del látex de la jaca.....	20
4.2. Cuantificación de la concentración de proteína.....	20
4.3. Cromatografía de filtración en gel.....	20
4.4. Determinación de pesos moleculares de proteínas (SDS-PAGE).....	20
4.5. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (ND-PAGE).....	21
4.6. Caracterización de la actividad lipolítica.....	21

4.6.1. Ensayo en placa con púrpura de bromocresol.....	21
4.6.2. Ensayo en placa con rodamina B.....	21
4.6.3. Actividad hidrolítica sobre ésteres de p-Nitrofenol.....	22
4.7. Efecto del pH en la actividad del complejo lipolítico.....	23
4.7.1. Efecto del pH en la hidrólisis de p-Nitrofenil palmitato (pNFP).....	23
4.7.2. Efecto del pH en la hidrólisis de p-Nitrofenil Acetato (pNFA).....	23
4.7.3. Efecto del pH en la hidrólisis de tributirina en emulsión.....	24
4.8. Efecto de la temperatura.....	24
4.9. Efecto de solventes orgánicos sobre la estabilidad del complejo lipolítico.....	25
4.10. Determinación de los parámetros cinéticos.....	25
4.11. Transesterificación de aceites.....	25
4.11.1. Transesterificación alcalina: Metilación básica de ácidos grasos presentes en el aceite.....	25
4.11.2. Pruebas de transesterificación (alcoholólisis) enzimática de aceites.....	26
4.11.2.1. Determinación de la densidad de los aceites.....	26
4.11.2.2. Pruebas de transesterificación enzimática con extracto crudo.....	26
4.11.2.3. Transesterificación de aceites usando el complejo lipolítico parcialmente purificado.....	29
4.11.3. Cromatografía en capa fina.....	31
<b>5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
5.1. Hidrólisis de ésteres de p-Nitrofenol.....	34
5.2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	35
5.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	38
5.4. Efecto de solventes orgánicos sobre la estabilidad del complejo lipolítico.....	40
5.5. Parámetros cinéticos del complejo lipolítico.....	41
5.6. Transesterificación de aceites.....	43
5.6.1. Transesterificación alcalina.....	43
5.6.2. Pruebas de transesterificación enzimática de los aceites.....	45
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>7.LITERATURA CITADA.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Mecanismo de hidrólisis de las lipasas.....	8
<b>Figura 2.-</b> Esquema general de la reacción de transesterificación.....	10
<b>Figura 3.-</b> Representación de la reacción de metanólisis.....	12
<b>Figura 4.-</b> Actividad lipolítica en placa.....	32
<b>Figura 5.-</b> SDS-PAGE (12%) de fracciones con actividad lipolítica.....	33
<b>Figura 6.-</b> ND-PAGE (12%) de las fracciones con actividad lipolítica.....	33
<b>Figura 7.-</b> Hidrólisis de ésteres de p-Nitrofenol: p-NFA y p-NFP.....	35
<b>Figura 8A.-</b> Efecto del pH en la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis de p-NFP.....	36
<b>Figura 8B.-</b> Efecto del pH en la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis de p-NFA.....	37
<b>Figura 8C.-</b> Efecto del pH en la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis de tributirina.....	37
<b>Figura 9A.-</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis p-NFP.....	39
<b>Figura 9B.-</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis p-NFA.....	39
<b>Figura 10.-</b> Actividad lipolítica en placa, estabilidad del complejo lipolítico frente a solventes orgánicos.....	41
<b>Figura 11A.-</b> Efecto de la concentración de sustrato en la actividad lipolítica del complejo enzimático.....	42
<b>Figura 11B.-</b> Representación gráfica Lineweaver-Burk. Relación entre la concentración de sustrato $1/[s]$ y la actividad lipolítica $1/V$ (U/mg) del complejo enzimático.....	42
<b>Figura 12.-</b> Separación de compuestos metilados por cromatografía en capa fina.....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Condiciones de temperatura y pH en la prueba 8 de transesterificación enzimática.....	30
Tabla 2.- Condiciones experimentales de la prueba 9 de transesterificación enzimática.....	30
Tabla 3.- Condiciones experimentales de la prueba 10 de transesterificación enzimática.....	31
Tabla 4.- Valores de Rf de los diferentes compuestos presentes en los aceites: soya y oliva.....	44
Tabla 5.- Condiciones de operación en el proceso de transesterificación enzimática.....	46

## SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

<b>BSA</b>	Seroalbúmina de bovino
<b>cm</b>	Centímetros
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>Fig.</b>	Figura
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michael-Menten
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mL</b>	Mililitro
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µL</b>	Microlitros
<b>M</b>	Molar
<b>N</b>	Normal
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>N°</b>	Número
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>pK</b>	Constante de equilibrio ácido-base

<b>p-NFA</b>	p-Nitrofenil acetato
<b>p-NFP</b>	p-Nitrofenil palmitato
<b>PSA</b>	Persulfato de amonio
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>TEMED</b>	N,N,N', N' - tetrametiletilendiamina
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
<b>Tween</b>	Monolaureato de polioxietileno sorbitano
<b>U/mg</b>	Unidades por miligramo
<b>UV</b>	Radiación ultravioleta
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima
<b>%</b>	Por ciento

## RESUMEN

Los biocatalizadores presentan ventajas frente a los catalizadores clásicos empleados en los diversos procesos químicos, tal como su especificidad en particular. Las enzimas lipolíticas son biocatalizadores con amplia aplicación en reacciones de hidrólisis y síntesis. Mediante cromatografía en gel se purificó parcialmente el complejo enzimático con actividad de lipasa a partir del látex de la jaca (*Artocarpushytilus* L.). Se encontró que dicho complejo está formado por proteínas con peso molecular de 63, 105, 120, 136, 176 y 209 kDa en condiciones nativas, estimando 10 bandas con pesos moleculares que van de 24 a 106 kDa por electroforesis en SDS-PAGE; la actividad lipolítica fue detectada en placas con agar, por medio de la hidrólisis de los sustratos tributirina y aceite de olivo, utilizando púrpura de bromocresol y rodamina B como indicador respectivamente. Se observó una mayor actividad del complejo enzimático al utilizar como sustrato al p-Nitrofenil acetato (p-NFA), con una temperatura óptima de 70 °C y pH óptimo de 8. El complejo lipolítico sigue una cinética típica de Michaelis-Menten. Los valores estimados de  $K_m$  y  $V_{max}$  en la hidrólisis del p-NFA, fueron de 1.083 mM y 833.33 U/mg, respectivamente. Se encontró que conservó la actividad lipolítica después de su exposición a solventes como metanol, etanol y hexano. Los resultados obtenidos sugieren que las propiedades catalíticas encontradas en el complejo lipolítico podrían ser útiles como herramienta biotecnológica en diversas aplicaciones.

## 1. INTRODUCCIÓN

La jaca (*Artocarpus heterophyllus*) pertenece a la familia Moraceae, se cultiva ampliamente en regiones con clima tropical, el árbol de jaca produce látex en todas sus partes. Diversas investigaciones en *Artocarpus heterophyllus* han determinado que la composición química del látex del árbol y fruto es la misma, contiene un alto porcentaje de materia cerosa, resinas y minerales, así también, presenta 4-hidroxiundecil docosanoato y cicloartenona como ésteres de ácidos grasos (Pant y Chaturvedi, 1989; Balakrishna y Seshadri, 1947; NIIR Board, 2004). Otros estudios han reportado una gran variedad de compuestos activos presentes en diferentes partes del árbol, ricos en compuestos fenólicos incluyendo flavonoides, estilbenoides, arilbenzofuranos y jacalina, una lectina de importancia en estudios de inmunología (Hakim *et al.*, 2006; Kabir, 1998). La jaca es catalogada como una fuente potencial de compuestos con actividad antiinflamatoria (Wei *et al.*, 2005) y actividad antibacterial (Khan *et al.*, 2003). Además contiene una gran cantidad de proteínas, algunas de estas con función catalítica, conocidas como enzimas, las cuales facilitan la conversión de sustratos en productos (Cooper, 2000). En el látex de este árbol, se ha encontrado la presencia de hidrolasas, grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces C-O, C-N, O-P, C-C y otros enlaces sencillos. Este grupo incluye esterasas, glucosidasas, lipasas y proteasas (Panesar, *et al.*, 2010; Sanghi y Singh, 2012). La investigación de enzimas hidrolíticas en el látex de *Artocarpus heterophyllus* ha reportado la presencia de proteasas, por ejemplo la artocarpina de 79.5 kDa con un punto isoeléctrico (pI) de 6.3 y un pH óptimo de 8.0 (Prasad y Virupaksha, 1990). La proteasa AMP48 (anti-microbial protease 48 kDa) con propiedades antimicrobianas fue reportada por Siritapetawee *et al.* (2012). Por otra parte, estudios recientes mostraron la presencia de un complejo enzimático con actividad proteolítica y lipolítica (Martinez, 2013). Las enzimas lipolíticas catalizan la hidrólisis de los enlaces ésteres formados entre un ácido y un alcohol, y pertenecen a la clase de las hidrolasas (E.C.3) (Ro *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2008). El reciente interés en este tipo de catalizadores está asociado con su aplicación como aditivo en alimentos, síntesis química, detergentes, su utilidad en la industria cosmética y

farmacéutica. Adicionalmente, las lipasas tienen una importante aplicación en el campo de la bioenergía, especialmente en la producción de biodiesel, el cual es un sector en expansión como resultado de la creciente demanda mundial del uso de energías renovables (Salihu *et al.*, 2012). Las lipasas de plantas, pueden tener una ventaja sobre las lipasas de origen animal o microbiano, debido a su disponibilidad, bajo costo, especificidad y fácil purificación o posible uso sin ninguna purificación. Por tanto, la obtención y evaluación de nuevas lipasas, constituye un punto de partida en la generación de un nuevo conocimiento, que pudiera promover a futuro el interés por integrar este tipo de catalizadores en diversos procesos de transformación.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. La jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.)

La jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) pertenece a la familia Moraceae, se ha cultivado en Tailandia, Malacia y la India. Se introdujo a Brasil en el siglo XIX. En los últimos años su producción se ha extendido a otros países de América, como México (Madrigal-Aldana *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2013). El árbol de la jaca produce látex en todas sus partes, el cual proviene de las células lactíferas que se encuentran bajo presión positiva, lo que implica que en respuesta a cortaduras o mordeduras a la planta resulta en una rápida expulsión de látex hacia el exterior (Mekkriengkrai *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2003). Evidencias experimentales han demostrado que el látex protege la planta del ataque contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros, de dos maneras distintas: mecánicamente (por coagulación sobre la herida) y químicamente por presencia de sustancias tóxicas en éste (Kyndt *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2009). El látex es una emulsión acuosa compuesta por lípidos, gomas, resinas, azúcares y proteínas incluyendo enzimas (Fonseca *et al.*, 2010). En el látex de la jaca se ha determinado la presencia de enzimas hidrolíticas tal es el caso de artocarpina, una proteasa de 79.5 kDa, con un pI de 6.3 y un pH óptimo de 8.0 (Prasad *et al.*, 1990). La artocarpina ha sido utilizada en estudios de cáncer de piel, cáncer de pecho, se ha estudiado su actividad como agente aclarador, en la síntesis de melanina entre otros (Arung *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2015). El estudio de una proteasa denominada AMP48 (anti-microbial protease 48 kDa) con propiedades antimicrobianas fue reportado por Siritapetawee *et al.* (2012). Los estudios realizados por Martínez, (2013), mostraron la presencia de un complejo enzimático con actividad proteolítica y lipolítica con pesos moleculares que van de 80 a 180 kDa.

## 2.2. Biocatalizadores

En la actualidad, la tecnología enzimática es parte integrante de la industria. Las enzimas a diferencia de los catalizadores inorgánicos, catalizan reacciones específicas. Sin embargo, hay distintos grados de especificidad, así las enzimas actúan de acuerdo a su selectividad por sustrato, regio- y enantioselectividad, las cuales, son propiedades de interés para su aplicación en una amplia gama de industrias. En general, las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas se multiplican de  $10^6$  a  $10^{12}$  veces con respecto a las mismas reacciones no catalizadas por ellas. Adicionalmente, las enzimas pueden catalizar una variedad de reacciones en rangos de pH y temperatura amplios. El uso de enzimas conduce a menudo al ahorro de materias primas, de energía y reducción en el tiempo de proceso. Por otra parte, los procesos enzimáticos resultan ser más amigables con el medio ambiente (Voet *et al.*, 2013; Mojsos, 2011; Peña-Montes y González-Saravia, 2008; Jegannathan y Nielsen, 2013).

## 2.3. Enzimas lipolíticas

Las enzimas lipolíticas son un grupo de enzimas que se encuentra ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en animales, en plantas como en microorganismos (Navarro-González y Perigo, 2012). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces ésteres formados entre un ácido y un alcohol (Bornscheuer, 2002).

Debido a la facilidad de producción y a los conocimientos de su genética hacen de los microorganismos la fuente más abundante de enzimas lipolíticas (Treichel *et al.*, 2010). Algunas de las más conocidas son las lipasas de *Cándida antartica* B, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa* y *Thermomyces lanuginosus* (Nagarajan, 2012). No obstante, las lipasas de plantas presentan algunas ventajas como su especificidad en particular, éstas enzimas se encuentran presentes en las semillas oleaginosas y en laticíferos (células secretoras en las hojas y/o tallos de plantas que

producen látex), tienen propiedades bioquímicas interesantes: pH que varía de 4 a 9 y permanecen activas a temperaturas entre 37 a 80 °C (Rivera *et al.*, 2012).

Diversos estudios han reportado la presencia de actividad lipolítica en el látex de varias familias de plantas, incluyendo *Asclepiadaceae*, *Moraceae*, *Apocynaceae*, *Euphorbaceae*, *Caricaceae* y *Bromeliaceae* (Paques y Macedo, 2006). En tanto, Fiorillo *et al.* (2007) han reportado la presencia de actividad lipolítica en el látex de *Euphorbia Characias* L. Recientemente, Rivera y Sandoval, (2014) caracterizaron la actividad lipolítica en el látex de *Carica papaya*. 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).

### 2.3.1. Clasificación de las enzimas lipolíticas

Las enzimas lipolíticas se clasifican de acuerdo con la nomenclatura de enzimas (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme>). Conforme a la especificidad por el sustrato pueden clasificarse en triacilglicerol lipasa, esterases, arilesterases, fosfolipasa, lisofosfolipasa, etc. No obstante, las enzimas lipolíticas pueden dividirse en dos grandes grupos principalmente: las lipasas (EC 3.1.1.3) y las esterases o carboxilesterases (EC 3.1.1.1) (Akoh *et al.*, 2004; Messaoudi *et al.*, 2010).

De acuerdo a su selectividad se clasifican en:

*Regioselectivas*, subdivididas en:

- Lipasas no específicas. Hidrolizan ésteres de ácidos grasos primarios o secundarios, liberando ácidos grasos en la posición 1(3) o 2.
- 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 antártica* que hidroliza en la posición 2.

*Tiposelectivas.* Con relación al tamaño de cadena carbónica y/o el número de insaturaciones del grupo acilo (Paques y Macedo, 2006).

Con respecto a su estructura, todas las enzimas lipolíticas presentan el plegamiento típico de las  $\alpha/\beta$  hidrolasa, que consiste en una estructura central formada por 8 láminas  $\beta$  interconectadas por hélices  $\alpha$ . Los tres aminoácidos que forman la triada catalítica son la serina nucleofílica, un ácido aspártico/glutámico y una histidina (Mogensen *et al.*, 2005).

Las lipasas son específicas en la catálisis de acilglicérols con ácidos grasos de cadena larga (> 10 átomos de carbono), siendo la trioleína su sustrato de referencia. Por su parte, las esterasas actúan específicamente sobre acilglicérols de cadena corta (<10 átomos de carbono) y otros ésteres simples, siendo la tributirina su sustrato estándar (Arpigny y Jaeger, 1999).

Estos dos tipos de enzimas se pueden diferenciar por sus características relacionadas directamente con la especificidad de sustrato. Así, las lipasas muestran preferencia por sustratos altamente hidrofóbicos, insolubles y agregados, presentan sitios de unión largos para acomodar al ácido graso a escindir. Por su parte, las esterasas actúan sobre sustratos más solubles y con un grado de hidrofobicidad más variable. Además, las lipasas muestran un mayor número de aminoácidos no polares localizados en las zonas expuestas al solvente y en la región del centro activo en comparación con las esterasas, así como un rango de sustrato más amplio, una mayor regioselectividad y estereoespecificidad (Fojan *et al.*, 2000).

Las esterasas pueden distinguirse de las lipasas por el denominado fenómeno de activación interfacial, el cual ha sido observado en lipasas. Este fenómeno de activación interfacial es debido a un dominio hidrofóbico, denominado lid (Tapa), que se encuentra alrededor del centro activo de la enzima. Por lo que requieren una concentración crítica de sustrato para que se produzca el movimiento de lid, haciendo accesible el sustrato al centro activo. Por ello, las esterasas obedecen a la clásica cinética de Michaelis-Menten, mientras que las lipasas presentan una

científica atípica Michaeliana (Torres-Sáez, 2014; Jelen, 2011; Navarro-González y Periago, 2012).

### 2.3.2. 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 (Fig. 1).

1.- El sustrato ( $R_1COOR_2$ ) 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  $N\epsilon$  del anillo imidazólico de la His del centro activo, cuya carga positiva es estabilizada por el aspartato (o glutamato) que forma parte de la tríada. Se forma así, el primer intermedio tetraédrico (I). La carga negativa, en principio situada en el oxígeno  $O_y$  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  $R_3OH$ , 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<sup>+</sup> captado por la His a partir del nucleófilo atacante, liberándose el producto (un ácido graso como producto natural) y regenerándose la serina catalítica (Hernáiz, 2012).

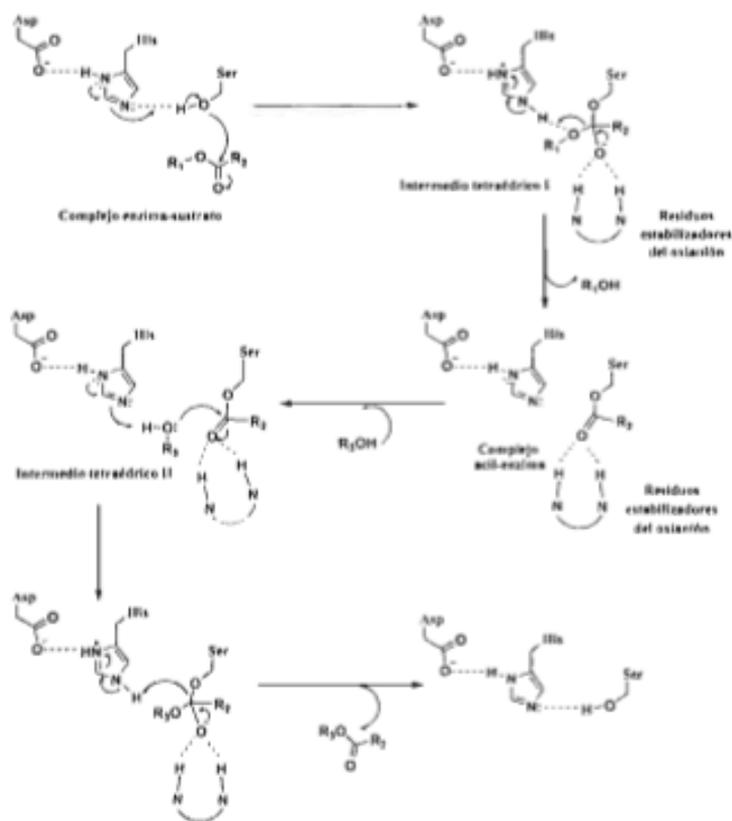


Fig. 1. Mecanismo de hidrólisis de las lipasas (Chahinian et al., 2006).

### 2.3.3. Multiplicidad de las lipasas

El papel fisiológico de las lipasas no solo es la hidrólisis de triglicéridos en diglicéridos, mono-glicéridos, ácidos grasos sino que también catalizan reacciones de esterificación y transesterificación (Colla *et al.*, 2010).

**Esterificación.** Es la reacción inversa de la hidrólisis. La reacción entre un ácido carboxílico y un mono alcohol en presencia de un catalizador.

**Transesterificación.** La *transesterificación* es un término general que se utiliza para designar a las reacciones orgánicas en las cuales se produce un intercambio o sustitución del grupo acilo o alquilo de un éster. Así, si un éster interactúa con un alcohol para sustituir a su grupo alquilo por el del alcohol, la reacción se denomina *alcohólisis*; si el éster reacciona con un ácido carboxílico para sustituir su grupo acilo por el del ácido, el proceso se conoce como *acidólisis*, y si existe incorporación de ácidos grasos diferentes a los originales existentes en la estructura de un determinado triglicérido, la reacción se define entonces como *Interesterificación*. Durante el proceso se puede lograr el cambio en la posición de un ácido graso dentro de un mismo triglicérido o entre diferentes triglicéridos (Torossi, 2006; Sharma y Kanwar 2014).

### 2.4. Reacciones de transesterificación

La transesterificación (también llamada alcohólisis) se define como la reacción mediante la cual, los triglicéridos presentes en los aceites vegetales o grasas animales se combinan con un alcohol de bajo peso molecular en presencia de un catalizador adecuado, para formar glicerina y una mezcla de ésteres grasos (Torossi, 2006; Demirbas, 2008).

El proceso de transesterificación consisten en una secuencia de tres reacciones reversibles consecutivas que incluyen la conversión de triglicéridos a diglicéridos, seguido por la conversión de diglicéridos a monoglicéridos y de este a glicerol,

originado una molécula de éster en cada paso (Fig. 2), reaccionando 1 mol del total de triglicéridos con 3 moles de alcohol, aunque en la práctica al ser un proceso reversible, se necesita alimentar un exceso de alcohol para desplazar la reacción hacia la formación del éster (Vyas *et al.*, 2011; Romero y Barrera, 2013).



Fig. 2. Esquema general de la reacción de transesterificación.

#### 2.4.1. Transesterificación de aceites

La reacción de transesterificación de aceites con alcohol para la obtención de alquil ésteres, se ha llevado a cabo en presencia de un catalizador ácido, alcalino o biocatalizadores (enzimas). En la catálisis alcalina los catalizadores más comúnmente utilizados son NaOH, KOH y NaOCH<sub>3</sub>. En la catálisis ácida, los ácidos empleados generalmente son H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y ácidos orgánicos sulfónicos (Dall'Oglio *et al.*, 2014; López, 2011; Marcano *et al.*, 2014; Marchetti *et al.*, 2007). La catálisis ácida o alcalina presenta desventajas, tales como el alto consumo de energía y la dificultan en la transesterificación de materias primas con alto contenido en ácidos grasos libres (formación de jabones). Además los procesos de recuperación de glicerol, la eliminación de sales inorgánicas, la eliminación del catalizador y el tratamiento de aguas residuales son complejos e incurren en costos adicionales (Bajaj *et al.*, 2010). Actualmente se promueve que la industria química utilice productos menos contaminantes durante el desarrollo de procesos químicos. Bajo esta perspectiva los biocatalizadores ofrecen ventajas frente a los catalizadores

químicos, ya que su uso propicia un proceso más eficiente, son altamente selectivos, implica menos consumo de energía, la recuperación de glicerol es más fácil, se generan menos residuos. Por otra parte, las enzimas son insensibles al contenido de ácidos grasos libres y al agua que aportan las materias primas (Akoh *et al.*, 2007; Robles-Medina *et al.*, 2009; Kulkarni y Dalai, 2006; citado en: Aarthy *et al.*, 2014).

## **2.4.2. Factores que afectan la transesterificación enzimática**

Se han reportado en la literatura estudios en los que se evalúan diferentes variables para optimizar la reacción de transesterificación enzimática. Las principales condiciones que afectan el proceso son: la relación molar alcohol: aceite, el tipo de alcohol, tiempo de reacción, cantidad de catalizador, intensidad de mezclado, temperatura de reacción, tipo de solvente, formulación de la enzima (lipasa inmovilizada o no) y contenido de agua (Demirbas, 2009; Delgado y Pashova, 2010)

### **2.4.2.1. Relación molar alcohol: aceite y tipo de alcohol**

En diversas investigaciones se ha reportado que la relación molar alcohol: aceite es uno de los factores principales que afectan el rendimiento en la producción de ésteres de ácidos grasos. Se sugiere que la reacción de transesterificación requiere 3 moles de alcohol por cada 1 mol de triglicérido para producir 3 moles de ésteres de ácidos grasos y 1 mol de glicerol. Generalmente, la producción de ésteres se incrementa cuando se utiliza una relación mayor de 3:1 alcohol: aceite (Anastopoulos *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 2012; Dantas *et al.*, 2013).

*Tipo de alcohol.* Los alcoholes utilizados más frecuentemente en procesos de transesterificación incluyen: metanol, etanol, propanol, butanol, alcohol amílico, octanol y alcoholes ramificados (Ghaly *et al.*, 2010; Ramirez *et al.*, 2012).

En los procesos de transesterificación el metanol es el alcohol más utilizado, debido a que es más barato en comparación con otros alcoholes. Cuando se utiliza metanol en el proceso, la reacción es conocida como metanólisis, (Fig. 3) (Ghaly *et al.*, 2010; Marcano *et al.*, 2014).

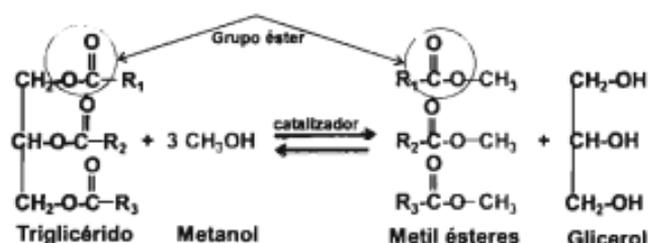


Fig. 3. Representación de la reacción de metanólisis.

El tipo de alcohol empleado y su concentración en el medio presenta un fuerte efecto sobre la enzima y sobre el rendimiento de los ésteres. Esto puede explicarse por dos razones fundamentales: la polaridad del alcohol y su solubilidad con el aceite. Alcoholes polares como el metanol y etanol causan un efecto de inactivación en las enzimas, ya que afectan su microambiente y extraen el agua necesaria para mantener su actividad; alcoholes superiores como el propílico o butílico no presentan este comportamiento tan acentuadamente (Véras *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2009; Castellanos y Gonzáles, 2004). Para evitar la desactivación de las lipasas por el alcohol, éste se adiciona a diversos tiempos durante la reacción, como es el caso donde se realiza la adición del alcohol por pasos que tiene por objeto optimizar la relación molar en sistemas libres de solvente (Yang *et al.*, 2009).

#### 2.4.2.2. Solventes

La presencia de solventes orgánicos en el medio de reacción hace posible que las enzimas adquieran un nuevo comportamiento catalítico, por ejemplo, las lipasas catalizan la hidrólisis de grasas y aceites en presencia de agua en el medio, mientras que la misma enzima cataliza reacciones de esterificación y transesterificación en medios orgánicos.

La inhibición por alcoholes de cadena corta es debida a la insolubilidad de éstos. Los solventes son utilizados para proteger a la enzima de desnaturalización por el

alcohol, incrementando su solubilidad (Kumari *et al.*, 2009). Cuando se utiliza metanol y etanol generalmente es necesario el uso de solventes que permitan un mejor contacto entre los sustratos, incrementando significativamente la velocidad de reacción en comparación con un medio de reacción libre de solvente. Los solventes más comúnmente utilizados en la transesterificación son no polares, como el hexano, n-heptano, ciclohexano, isooctano y terbutanol (Chen *et al.*, 2009; Azocar *et al.*, 2014).

#### **2.4.2.3. Temperatura y tiempo**

La velocidad de conversión incrementa con la temperatura y el tiempo de reacción, y por lo tanto estos factores son importantes en el proceso de transesterificación (Parawira, 2009). La temperatura puede disminuir la viscosidad del aceite, dando lugar a un aumento de la velocidad de reacción y a una disminución del tiempo de reacción (Rojas-González y Girón-Gallego, 2011). El tiempo de reacción da una idea de la eficiencia de la enzima a medida que avanza la reacción, lo cual es útil para determinar el tiempo mínimo necesario para obtener alto rendimiento. En la catálisis enzimática el tiempo de reacción puede ser mayor, comparado con la catálisis química (Ebrahimi *et al.*, 2012).

#### **2.4.2.4. Intensidad de mezclado**

Al inicio de la reacción, los triglicéridos y el alcohol forman dos fases inmiscibles. La reacción es controlada por el mecanismo de transferencia de masa. La agitación es necesaria para aumentar el grado de mezcla de las fases y aumentar la velocidad de la transesterificación. A medida que los triglicéridos se convierten en ésteres de ácidos grasos, disminuye la viscosidad de la mezcla de reacción produciéndose un aumento en la velocidad de la misma. En la transesterificación enzimática se sugiere una velocidad de agitación entre 150-200 rpm para no afectar la estructura de la lipasa. Sin embargo, se han reportado velocidades de agitación de 500 y 700 rpm sin efectos importantes durante la reacción. Cuando la lipasa se encuentra inmovilizada en un soporte sólido, se requiere mayor velocidad de agitación para aumentar la

transferencia de masa en el soporte y disminuir la saturación de los poros en el mismo con la glicerina (Pardal, 2012; Gonzáles *et al.*, 2010; Ebrahimi *et al.*, 2012).

#### **2.4.2.5. Concentración de enzima**

Cuanto mayor es la concentración de enzimas, mayor será el rendimiento de la reacción. A fin de establecer la cantidad adecuada del catalizador se han reportado trabajos en los que se utilizan diferentes cantidades de enzima que varían de 3 a 7% y 10 a 30% con relación al peso del aceite (Ribeiro *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2004; Su y Wei 2014).

#### **2.4.2.6. Estado de la enzima**

El rendimiento de la reacción de transesterificación depende del estado libre o inmovilizado de la enzima. Las principales limitaciones del uso de lipasas en la producción de alquil ésteres son los costos de producción, se emplea un mayor tiempo de reacción, desactivación de la enzima por los alcoholes e inhibición debido a la adsorción de glicerol sobre la lipasa (Gog *et al.*, 2012; Garlapati *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2014). Sin embargo, la inmovilización de lipasas disminuye el costo de producción, por su reutilización, lo cual es necesario para hacer que sea más atractiva y de potente aplicación industrial. El principal propósito de la inmovilización de enzimas es para mejorar sus propiedades tales como estabilidad térmica, la actividad en medio no acuoso, para mejorar el manejo, recuperación y reciclaje de éste biocatalizador (Narwal *et al.*, 2015).

#### **2.4.2.7. Contenido de agua**

El contenido de agua desempeña un papel importante en la transesterificación enzimática ya que es vital para mantener la conformación tridimensional de sitio catalítico de la enzima. La presencia de una interface de agua-aceite crea un ambiente favorable para la conformación del sitio activo. El agua interactúa con los grupos hidrofílicos de la enzima situados en la superficie, y cambia la conformación de las interacciones de enlaces de hidrógeno en la enzima, que lleva a la

transformación de la lipasa activa. Generalmente se sugiere un valor del 5% en el contenido inicial de agua como óptimo para la producción de alquil ésteres, la actividad lipasa aumenta con aumento del contenido de agua hasta un 15% (Gupta *et al.*, 2014)

## 2.5. Investigación de lipasas en la transesterificación

La transesterificación de aceites realizada por vía enzimática con lipasas es una buena alternativa a los procesos químicos debido a su capacidad para catalizar eficientemente la reacción en la producción de ésteres de ácidos grasos como se ha comprobado en diversos estudios. El uso de estos catalizadores genera menos residuos obteniendo así una serie de ventajas medioambientales. Muchos aceites vegetales tales como aceite de soya, aceite de girasol, aceite de colza, aceite de palma y aceites residuales de restaurantes han sido utilizados como materia prima en estos procesos de transesterificación (Kumari *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014). Algunas lipasas procedentes de diversas fuentes han sido objeto de estudio y se ha reportado que tienen un alto potencial para catalizar reacciones de transesterificación por ejemplo, lipasa extraída de *Streptomyces sp* (Mander *et al.*, 2012). Lipasa de páncreas de porcino (Ebrahimi *et al.*, 2012). Lipasa de *Jatropha curcas L* (De Sousa, 2010). Así como *Pseudomonas fluorescens*, *Thermomyces lanuginosus* (TL IM Lipozyme), *Mucor miehei* (Lipozyme RM IM), *Candida antarctica* (Novozym 435). (Yang *et al.*, 2009; Sim *et al.*, 2010; Delgado y Pashova, 2010; Haigh *et al.*, 2012). Además se han estudiado lipasas de origen vegetal presentes en el látex, Saad (2005), reportó el uso de lipasas de látex de *Carica papaya* durante la transesterificación de aceite de maíz con etanol para la obtención de ésteres de ácidos grasos. En el año 2009 Cambon *et al.* estudiaron la capacidad catalítica de lipasas presentes en el látex de *Vasconcellea x heilbornii* para producir metil ésteres a través de la transesterificación de diversos aceites vegetales. El análisis realizado por Delgado y Pashova (2010), se ha enfocado a la evaluación del efecto de diversas variables en el proceso de transesterificación enzimática, estudiaron la síntesis de biodiesel mediante la transesterificación de aceite de ricino con etanol,

usando n-hexano como solvente y una lipasa comercial Lipozyme TL IM como biocatalizador. Evaluaron el efecto de la relación molar etanol: aceite en un rango de 3:1 a 10:1, temperatura de reacción (35-65 °C), carga enzimática (5-20 % p/p) y la cantidad de agua (0-10% p/p). La máxima conversión de etil-ésteres se obtuvo a una temperatura de 35°C, una relación molar etanol aceites de 5:1, una carga enzimática inicial de 15% p/p y una concentración de agua de 2% p/p, ambos con base en el peso del aceite de ricino. Por su parte, en el estudio realizado por Su y Wei, (2014), se investigó la producción de butil ésteres de ácidos grasos a partir de diferentes aceites vegetales utilizando como catalizador lipasa del látex de *Carica papaya*, bajo las condiciones óptimas la máxima conversión encontrada fue de un 96%.

Dinorin, (2012), realizó un estudio en el que se evaluó la actividad de lipasas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y bacterias Gram (+), microorganismos que fueron aislados a partir de diferentes muestras de suelos. El mayor porcentaje de conversión en la transesterificación de aceites de desecho con metanol fue de 57%, 55% y 38% con *Pseudomonas aeruginosas*, *Proteus mirabilis* y bacterias Gram (+) respectivamente. En el año 2008 Kovács *et al.* utilizaron tres lipasas comerciales inmovilizadas de *Candida antártica*, *Rhizomucor miehei* y *Thermomyces lanuginosus* para comparar su eficiencia en procesos de transesterificación de aceites de fritura empleando las mismas condiciones para cada una de las lipasas. Encontraron como resultado la obtención de más del 94% de metil ésteres al utilizar lipasas de *Candida antártica*.

En lo referente a enzimas lipolíticas se han realizado trabajos en los que se evalúa la actividad catalítica de lipasas ya comercializadas, de células secas, extractos parcialmente purificados a partir de microorganismos y de origen animal. Estas enzimas han sido utilizadas en procesos tanto de hidrólisis como en los de transesterificación. No obstante, la investigación en lipasas nuevas de origen vegetal aun es escasa.

## 2.6. Aplicación de las lipasas en la industria

El reciente interés en este tipo de catalizadores tal como lo son las lipasas, está asociado con su aplicación como aditivo en alimentos (modificación de los sabores), síntesis química (obtención de ésteres), detergentes (hidrólisis de grasas), pre-tratamiento de aguas residuales (descomposición y remoción de sustancias oleosas), amplia utilidad en la industria cosmética y farmacéutica (Salihi *et al.*, 2012). Adicionalmente, las lipasas tienen una importante aplicación en el campo de la bioenergía, especialmente en la producción de biodiesel, el cual es un sector en expansión como resultado de la creciente demanda mundial del uso de energías renovables (Colla *et al.*, 2010). El biodiesel comercial se produce a partir de fuentes renovables de aceites, los cuales están constituidos de triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga (de 14-20 carbonos pero pueden variar). Estos triglicéridos son convertidos a sus respectivos ésteres de ácidos grasos por una reacción de transesterificación utilizando alcoholes de cadena corta (típicamente metanol) dando como subproducto glicerol (Li y Xie, 2006). Los ésteres derivados de los compuestos grasos han llamado mucho la atención para su aplicación en alimentos, bebidas y en la industria química. Los alquil ésteres de ácidos grasos producidos a partir de aceites vegetales son importantes intermediarios en la oleoquímica y en la síntesis de un amplio rango de productos utilizados en la industria de lubricantes, surfactantes, carburantes, solventes, poliésteres biodegradables y agentes dispersantes (Dossat *et al.*, 2002; Rajendra *et al.*, 2009; Séverac *et al.*, 2011).

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1. Justificación

Las enzimas lipolíticas de plantas poseen propiedades catalíticas importantes para su aplicación en diferentes procesos industriales. El uso de lipasas de plantas tiene ventaja sobre las lipasas de origen animal o microbiano debido a su disponibilidad, bajo costo, fácil purificación y su especificidad en particular. Desde el punto de vista químico, los procesos en los que se utilizan lipasas ofrecen ciertos atractivos frente a la catálisis química; actúan en condiciones moderadas de temperatura, pH, presión, etc., lo cual disminuye los costos de operación. Por tanto, la obtención y evaluación de nuevas lipasas constituye un punto de partida en la generación de un nuevo conocimiento, que pudiera promover a futuro el interés por integrar éste tipo de catalizadores en diversos procesos de transformación. Lo anterior tomando en cuenta que las enzimas existentes en la naturaleza son desconocidas, que cada una de éstas presenta diferentes propiedades catalíticas y que los procesos enzimáticos resultan ser más amigables con el medio ambiente.

### **3.2. Hipótesis**

La actividad de un complejo lipolítico del látex de la jaca sobre aceites vegetales originará ésteres de ácidos grasos.

### **3.3. Objetivo general**

Evaluar la actividad de un complejo lipolítico identificado en el látex de la jaca y su aplicación en la transesterificación de aceites vegetales.

#### **3.3.1. Objetivos específicos**

- Determinar los valores de pH y de temperatura óptimos de un complejo enzimático.
- Determinar los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  de un complejo enzimático.
- Determinar la actividad de transesterificación enzimática en aceites vegetales.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

- Un complejo enzimático con actividad lipolítica obtenido a partir del látex de la jaca.

#### 4.1. Obtención de extracto crudo del látex de la jaca

El látex se obtuvo a partir del pedúnculo de los frutos de jaca, *Artocarpus heterophyllus* L. Se recuperó en tubos de centrifuga que contenían buffer de fosfato 0.2 M, ácido cítrico 0.1M, EDTA 5 mM y cisteína 5 mM, pH 6.4. La suspensión fue sometida a centrifugación en frío (4°C) a 9000 rpm por 20 minutos (HERMLE, Z 326 K, rotor 221.18), se descartaron los materiales insolubles obteniendo así el extracto crudo, el cual fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

#### 4.2. Cuantificación de la concentración de proteína

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976), se utilizó BSA (albumina de suero bovino) como estándar.

#### 4.3. Cromatografía de filtración en gel

La separación de las proteínas se realizó por medio de cromatografía en columna (Econo-Column Bio-Rad) empacada con Sefinose Fast Flow SF006-6F (Bio Basic Inc.), la elución de proteínas se realizó con buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8.8. La velocidad de flujo utilizada fue de 500  $\mu$ L/min.

#### 4.4. Determinación de pesos moleculares de proteínas (SDS-PAGE)

Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE. ANEXO A). Utilizando marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad, 161-0318). Las muestras se colocaron a baño de ebullición durante 5 min en presencia de buffer de muestra, cargando en cada uno de los pocillos del gel 20  $\mu$ L de muestra. Las condiciones de corrida electroforética

fueron 110 mV por 90 min y los geles se tiñeron con azul de Coomassie brillante R-250.

#### **4.5. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (ND-PAGE)**

Se mezclaron 20 µg de proteína (complejo lipolítico) con buffer de muestra en ausencia de SDS y 2-mercaptoetanol. La electroforesis se realizó utilizando geles de poliacrilamida al 12% y de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970). El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul de Coomassie brillante R-250.

#### **4.6. Caracterización de la actividad lipolítica**

##### **4.6.1. Ensayo en placa con púrpura de bromocresol**

La actividad lipolítica de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel fue monitoreada por detección en placas, las cuales contenían medio sólido; 1.5% de agar agar, púrpura de bromocresol al 0.5%, lípido tributirina al 0.5% y tween 20 al 0.1%. Se depositaron de 10 a 30 µg de proteína, las placas se incubaron a temperatura ambiente (28°C) durante 18 horas. La presencia de actividad lipolítica se determinó cualitativamente al observar el cambio de coloración del indicador de pH presente en el agar frente a la reacción de hidrólisis efectuada por el complejo lipolítico (Martínez, 2013).

##### **4.6.2. Ensayo en placa con rodamina B**

Se realizó una prueba confirmatoria utilizando aceite de oliva y aceite de soya, rodamina B como indicador (Kouker y Jaeger, 1987). El aceite se preparó al 1% en buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8.8, al cual se le añadió 0.1% de goma arábiga, agar agar (1.5%) y 0.001% de rodamina B. La actividad lipolítica fue probada en placa utilizando cada una de las fracciones obtenidas por columna, se depositaron de 10 a 30 µg de proteína. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (28 °C) durante 24 horas. La actividad se monitoreó irradiando las placas con luz UV, tomando como

positivas aquellas fracciones en las que se observó la presencia de halos fluorescentes de color naranja.

#### 4.6.3. Actividad hidrolítica sobre ésteres de p-Nitrofenol

La actividad hidrolítica hacia sustratos cromogénicos (ésteres de p-Nitrofenol) se evaluó siguiendo la técnica de descrita por Pencreac'h y Baratti (1996), con una ligera modificación. Los ésteres elegidos fueron p-Nitrofenil acetato (p-NFA) y p-Nitrofenil palmitato (p-NFP) (Sigma). La prueba de actividad de hidrólisis sobre ésteres de p-Nitrofenol utilizando el complejo lipolítico y lipasa comercial *Thermus thermophilus* (sigma) como control se realizó a partir de la preparación de un stock del sustrato 10 mM en 2-propanol, a partir de éste, se tomó la cantidad necesaria para obtener una concentración de 0.2 mM en una solución amortiguadora de Tris-HCl 25 mM de pH 8 que contenía 0.3% de tritón X-100. La reacción se realizó en placas de PCR, donde en cada pocillo se agregó 100 µL de la dilución del sustrato, posteriormente para comenzar la reacción se añadieron 100 µL del complejo enzimático / lipasa comercial (solución 0.5 mg/mL) después de 30 min de reacción a 65 °C, se procedió a tomar lectura de absorbancia a 348 nm en un lector de placas Sinergy HT. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado y calculando la desviación estándar. Para determinar la cantidad de µmoles liberados por la acción del complejo lipolítico, se construyó una curva de calibración de p-Nitrofenol (ANEXO C-2). La actividad enzimática fue calculada empleando las siguientes formulas:

$$\text{Actividad enzimática (U/mL)} = \frac{A \times B}{C \times D \times E}$$

Donde, A- se refiere a los µmol de p-Nitrofenol liberado, B- Volumen de reacción, C- Volumen usa en la determinación espectrofotométrica, D- Volumen de enzima utilizado y E- Tiempo de incubación.

$$\text{Actividad específica (U/mg)} = \frac{\text{Actividad enzimática (U/mL)}}{\text{Concentración de proteína (mg/mL)}}$$

#### 4.7. Efecto del pH en la actividad del complejo lipolítico

El pH óptimo para el complejo lipolítico fue determinado a diferentes pH de 5 a 9.5 unidades utilizando ésteres de p-Nitrofenol y tributirina como sustrato en diferentes soluciones amortiguadoras; Acetato de sodio, Fosfatos, Tris-HCl y glicina- NaOH.

##### 4.7.1. Efecto del pH en la hidrólisis de p-Nitrofenil palmitato (pNFP)

La determinación del pH óptimo en la hidrólisis de p-NFP se realizó por la preparación de una dilución a partir de un stock del sustrato para obtener una concentración 0.5 mM en distintas soluciones reguladores 50 mM, que contenían 0.3% de tritón X-100. La reacción fue llevada en placas de PCR como se menciona en el apartado anterior. Se utilizó 100 µL de un stock de 0.5 mg/mL de proteína. La actividad enzimática fue medida a 348 nm después de incubar la mezcla de reacción enzima-sustrato a 37° durante 30 min.

##### 4.7.2. Efecto del pH en la hidrólisis de p-Nitrofenil Acetato (pNFA)

La actividad de hidrólisis se evaluó a distintos pH en buffer 25 mM que contenían 0.3% de tritón X-100. En este caso se preparó una dilución a una concentración de 0.4 mM a partir de un stock del sustrato p-Nitrofenil acetato, así como 100 µL de un stock de 0.25 mg/mL de proteína. La actividad enzimática fue medida a 348 nm después de incubar la mezcla de reacción enzima-sustrato a 37° durante 20 min. La actividad enzimática fue calculada empleando la siguiente formula:

$$\text{Actividad enzimática (U/mL)} = \frac{A \times B}{C \times D \times E}$$

Donde, A- se refiere a los µmol de p-Nitrofenol liberado, B- Volumen de reacción, C- Volumen usa en la determinación espectrofotométrica, D- Volumen de enzima utilizado y E- Tiempo de incubación.

#### 4.7.3. Efecto del pH en la hidrólisis de tributirina en emulsión

Se estudió la hidrólisis del sustrato tributirina en emulsión utilizando distintas soluciones reguladoras (pH 7 a 10); se incubó en tubos de ensaye 2.5 mL de solución de enzima (7 mg proteína) y 160 µL de tributirina a 37 °C durante 60 min a una velocidad de agitación de 200 rpm. Posteriormente, se añadió 2.5 mL de etanol para detener la reacción y cada uno de los tubos fueron colocados a temperatura de ebullición durante 10 min para inactivar la enzima. La mezcla resultante fue titulada con NaOH 0.05 N. Se determinó el porcentaje de ácidos grasos liberados restando el consumo de NaOH de una muestra control (Blanco) a la cual se añadió enzima inactiva. El porcentaje de hidrólisis fue calculado con la siguiente formula:

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{V \text{ NaOH} \times 10^{-3} \times M \text{ NaOH} \times MM}{P \times F}$$

Donde V es el volumen de NaOH consumido durante la titulación, M es la molaridad de la solución de NaOH, MM, es el peso molecular del sustrato tributirina, P es el peso de la muestra y F corresponde a la fracción de volumen de la muestra.

#### 4.8. Efecto de la temperatura

La determinación de la temperatura óptima se llevó a cabo a condiciones de pH óptimo, se evaluó la actividad en un rango de temperaturas de 20 a 90 °C en intervalos de 10 unidades; El sustrato p-NFP se preparó a una concentración de 0.4 mM, y se utilizó 100 µL de una solución 0.5 mg/mL de proteína. La actividad enzimática fue medida a 348 nm después de 30 min de incubación. Para el caso del sustrato p-NFA, se utilizó una concentración de 0.3 mM y 0.25 mg/mL de proteína. Se tomó lectura de absorbancia a 348 nm después de 20 min de incubación. La actividad enzimática fue calculada empleando la siguiente formula:

$$\text{Actividad enzimática (U/mL)} = \frac{A \times B}{C \times D \times E}$$

Donde, A- se refiere a los µmol de p-Nitrofenol liberado, B- Volumen de reacción, C- Volumen usa en la determinación espectrofotométrica, D- Volumen de enzima utilizado y E- Tiempo de incubación.

#### **4.9. Efecto de solventes orgánicos sobre la estabilidad del complejo lipolítico**

Se evaluó la estabilidad del complejo lipolítico sobre distintos solventes orgánicos; 100  $\mu\text{L}$  de la enzima (pH 9 Tris-HCl 50 mM, 0.125 mg de proteína) fueron incubados con 100  $\mu\text{L}$  de diferentes concentraciones de metanol, etanol y hexano: metanol (50, 80 y 100%) durante una hora en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Como control positivo se utilizó la enzima sin solvente, como control negativo se utilizó buffer sin enzima con la preparación del solvente. Después del periodo de incubación, 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las preparaciones fueron colocadas sobre placas con agar-tributirina al 0.5% y púrpura de bromocresol como indicador, estas fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante tres horas (Salihu *et al.*, 2012).

#### **4.10. Determinación de los parámetros cinéticos**

Se estudió la influencia de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción del complejo lipolítico con p-NFA como sustrato. Se utilizó una concentración de 0.25 a 2 mM, así como 100  $\mu\text{L}$  de un stock de 0.1 mg/mL de proteína. Las pruebas se realizaron a la temperatura y pH determinados como óptimos, la mezcla de reacción fue incubada durante 20 minutos y la absorbancia fue medida a 348 nm. La constante de Michelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) fueron determinadas a partir del gráfico de Lineweaver-burk,  $1/V$  frente a  $1/S$ .

#### **4.11. Transesterificación de aceites**

##### **4.11.1. Transesterificación alcalina: Metilación básica de ácidos grasos presentes en el aceite**

Con el objetivo de identificar los ésteres que se forman al utilizar el aceite de soya y de oliva en un proceso de transesterificación, se partió de la preparación de metil ésteres en condiciones básicas; en tubos de ensaye se pesaron 30 mg de cada uno de los aceites, se añadió 2 mL de hexano, dicha mezcla se agitó con vórtex hasta disolver el aceite. Posteriormente se añadió 200  $\mu\text{L}$  de KOH 2 M/Metanol, la nueva mezcla se agitó nuevamente en vórtex durante 10 segundos para favorecer la

reacción. La preparación se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente, después fue centrifugada a 3500 rpm durante 5 minutos. Se recuperó en un vial 1 mL de la fase superior, de este vial se tomó una alícuota para depositarla en una cromatoplaaca de sílica gel  $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  para identificar los compuestos presentes antes y después de la metilación de los aceites.

#### **4.11.2. Pruebas de transesterificación (alcoholólisis) enzimática de aceites**

A continuación se describen los experimentos elegidos para llevar a cabo el estudio de la transesterificación enzimática de aceites vegetales

##### **4.11.2.1. Determinación de la densidad de los aceites**

Para llevar a cabo los experimentos se estimó la densidad de cada uno de los aceites de prueba para encontrar el volumen necesario a añadir en la mezcla de reacción. Se pesó un matraz aforado de 10 mL, se llenó con aceite hasta la marca y volvió a pesarse una vez más. Posteriormente se registró la diferencia de peso. Con el peso neto del aceite se calculó la densidad:

$$D = m/v$$

Para estimar el peso molecular del aceite, se tomaron en cuenta los datos conocidos del alcohol, es decir, el metanol tiene un peso molecular de 32.04 g/mol y densidad de 0.792 g/mL. Así, la relación molar alcohol aceite se estimó como se muestra en el ANEXO B.

##### **4.11.2.2. Pruebas de transesterificación enzimática con extracto crudo**

###### **Prueba 1**

Para encontrar experimentalmente la concentración adecuada para que se llevará a cabo la transesterificación enzimática, se utilizó el extracto crudo a una concentración de proteína de 0.32 mg en buffer de fosfatos pH 6.4 (Toscano *et al.*, 2014; Dinorin, 2012). En tubos eppendorf se colocó 559  $\mu\text{L}$  de aceite de soya sin usar, equivalente a 2 mM de acuerdo al peso molecular promedio de ácidos grasos del aceite (PM: 253.26 g/mol), así mismo se añadió la cantidad de 384  $\mu\text{L}$  de metanol

a un equivalente de 10 mM obteniendo una relación molar 1:5, la mezcla se preincubó por 15 minutos y posteriormente se añadió el complejo enzimático contenido en el extracto crudo del látex de la jaca. La mezcla de reacción obtenida se incubó a 37°C durante cinco horas manteniendo la agitación constante a 200 rpm. Transcurrida una hora de incubación se tomó una alícuota de 20 µL, la cual fue mezclada con 200 µL de hexano para posteriormente analizar los compuestos por cromatografía de capa fina. Esta última operación volvió a repetirse a las 2, 4 y 5 horas de incubación.

### **Prueba 2**

Se utilizó una relación molar 1:4 del aceite de soya y metanol, el extracto crudo a una concentración mayor; 3 mg/mL en buffer de fosfatos pH 6.4, la mezcla se preincubó por 15 minutos y posteriormente se añadió el complejo enzimático contenido en el extracto crudo del látex de la jaca. La mezcla de reacción obtenida se incubó a 40 °C durante 20 horas manteniendo la agitación constante a 200 rpm. Transcurridas tres horas de incubación se tomó una alícuota de 20 µL, la cual fue mezclada con 200 µL de hexano para posteriormente analizar los compuestos por cromatografía de capa fina. Esta última operación volvió a repetirse a las 6 y 9 horas de incubación.

### **Prueba 3**

Se utilizó etanol, para lo cual se realizaron los cálculos correspondientes. Se utilizó una relación molar 1:4 aceite de soya: etanol, el extracto crudo a una concentración de 3 mg/mL en buffer de fosfatos pH 6.4, la mezcla se preincubó por 15 minutos y posteriormente se añadió el complejo enzimático contenido en el extracto crudo del látex de la jaca. La mezcla de reacción obtenida se incubó a 40 °C durante 20 horas manteniendo la agitación constante a 200 rpm. Transcurridas tres horas de incubación se tomó una alícuota de 20 µL, la cual fue mezclada con 200 µL de hexano para posteriormente analizar los compuestos por cromatografía de capa fina. Esta última operación volvió a repetirse a las 6 y 9 horas de incubación.

#### **Prueba 4**

Se utilizó una concentración de enzima de 9 mg hidratada en un volumen del 4 % de buffer en relación al aceite a pH 9, 25 mM. En tubos eppendorf se colocó aceite de soya y etanol a una relación molar 1:2.5, la mezcla se preincubó por 15 minutos. Posteriormente, se añadió el extracto crudo liofilizado (complejo enzimático). La mezcla de reacción obtenida se incubó a 40 °C durante 24 horas manteniendo la agitación constante a 180 rpm. Se tomaron dos muestras de 20 µL a las seis y a las 24 horas de incubación, a las cuales se les adicionó 200 µL de hexano para posteriormente analizar los compuestos por cromatografía de capa fina.

#### **Prueba 5**

Se utilizó extracto crudo liofilizado a una concentración de proteína de 15 mg hidratada en un volumen del 5 % de buffer en relación al aceite, pH 9 25 mM. En tubos eppendorf se colocó aceite de oliva y etanol a una relación molar 1:2, la mezcla se preincubó por 15 minutos y posteriormente se añadió el complejo enzimático. La mezcla de reacción obtenida se incubó a 40 °C durante 24 horas manteniendo la agitación constante a 200 rpm. Se tomaron dos muestras de 20 µL a las seis y a las 24 horas de incubación, a las cuales se les adicionó 200 µL de hexano para posteriormente analizar los compuestos por cromatografía de capa fina

#### **Prueba 6**

Se utilizó extracto crudo liofilizado a una concentración de proteína de 15 mg hidratada en un volumen del 5 % de buffer en relación al aceite, pH 9 25 mM. En tubos eppendorf se colocó aceite de oliva y metanol a una relación molar 1:2. La mezcla se preincubó por 15 minutos y posteriormente se añadió el complejo enzimático. La mezcla de reacción obtenida se incubó a 40 °C durante 24 horas manteniendo la agitación constante a 200 rpm. Se tomaron dos muestras de 20 µL a las seis y a las 24 horas de incubación, a las cuales se les adicionó 200 µL de hexano para posteriormente analizar los compuestos por cromatografía de capa fina.

## **Prueba 7**

### **Aumento de la concentración de enzima y uso de co-solvente.**

Se utilizó extracto crudo liofilizado a una concentración de proteína de 23 mg hidratada en un volumen del 10 % de buffer en relación al aceite, pH 9 25 mM. En tubos eppendorf se colocó el aceite de soya y 2.25 mL de hexano. Posteriormente se añadió metanol a una relación molar 4:1 con el aceite. La mezcla se preincubó por 15 minutos y posteriormente se añadió el complejo enzimático. La mezcla de reacción obtenida se incubó a 40 °C durante 48 horas manteniendo la agitación constante a 200 rpm. Se tomaron muestras de 20 µL a las 6, 24 y 48 horas de incubación.

Se realizó la misma prueba utilizando aceite de oliva, así como heptano y terbutanol como co-solvente.

## **Prueba 8**

### **4.11.2.3. Transesterificación de aceites usando el complejo lipolítico parcialmente purificado**

Se utilizó una concentración de 5 mg del complejo lipolítico hidratado en el 5% de buffer 25 mM, metanol a una relación molar 3:1 con aceite de soya y 4:1, una velocidad de agitación de 300 rpm, variando la temperatura y pH como se muestra en la Tabla 1. Los valores de temperatura fueron elegidos acorde a los rangos establecidos en estudios de transesterificación de aceites al utilizar enzimas de origen vegetal (Su y Wei, 2014; Cambon *et al.*, 2009). Los valores de pH fueron de 8 y 9, los cuales fueron determinados previamente como valores óptimos de actividad lipolítica. Se tomaron muestras a las 6, 24, 48 y 72 horas de incubación. Se adicionaron 200 µL de hexano para posteriormente analizar los compuestos por cromatografía de capa fina.

**Tabla 1. Condiciones de temperatura y pH utilizadas.**

Experimento	8a	8b	8c	8d
Temperatura	40	50	40	50
Buffer pH	pH 8	pH 8	pH 9	pH 9

**Prueba 9**

Se utilizó aceite de soya y el complejo lipolítico parcialmente purificado a distintas concentraciones preparado en un volumen del 10% de buffer 25 mM, pH 9. Utilizando en algunos casos hexano como co-solvente en el medio de reacción, Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones experimentales de la prueba 9.**

Experimento	9a	9b
Relación molar	1:4 Metanol	1:4 Metanol
Concentración de enzima	10 mg	20 mg
Tiempo	72 horas	72 horas
Hexano	Con hexano y sin hexano	Con hexano y sin hexano
Temperatura	40 y 65	40 y 65
Agitación	300 rpm	300 rpm

**Prueba 10**

Modificación de la relación molar aceite alcohol (1:5) añadiendo en dos pasos el etanol (2.5 mol de etanol al inicio y 2.5 mol al cabo de seis horas de incubación). Se utilizó aceite de soya y el complejo lipolítico parcialmente purificado a distintas concentraciones preparado en un volumen de 5 % de buffer 25 mM, pH 9 (Tabla 3).

**Tabla 3. Condiciones experimentales de la prueba 10.**

<b>Experimento</b>	<b>10a</b>	<b>10b</b>
Relación molar	1:5 etanol	1:5 etanol
Concentración de enzima	10 mg	20 mg
Tiempo	36 horas	36 horas
Hexano	con hexano y sin hexano	con hexano y sin hexano
Temperatura	40 y 70	40 y 70
Agitación	300 rpm	300 rpm

En las últimas pruebas (9 y 10) realizadas se optó por utilizar temperaturas más altas (65 y 70 °C, ya que se tomó como referencia un estudio previo en el que se determinó que el complejo lipolítico es capaz de actuar a altas temperaturas cuando fue probado sobre otros sustratos tal como lo son los ésteres de p-Nitrofenol.

#### **4.11.3. Cromatografía en capa fina**

Las muestras obtenidas de la reacción de metilación básica y las obtenidas a partir de la mezcla de reacción de transesterificación enzimática fueron analizadas por cromatografía de capa fina. Se tomaron 20 µL de las muestras los cuales fueron diluidos en 200 µL hexano, la mezcla resultante fue sometida a centrifugación durante 2 minutos. Posteriormente 10 µL se depositaron sobre la cromatoplaqueta de sílica gel. Una vez seca la placa, se introdujo a la cubeta cromatográfica que contenía solución de elución; hexano/etil acetato/ ácido acético (90:10:1), permitiendo que el eluyente se siluara a unos 3 mm aproximadamente del borde superior de la placa. La cromatoplaqueta fue extraída de la cubeta y se permitió el secado a temperatura ambiente. Las bandas obtenidas en las cromatoplaquetas fueron comparadas frente a las bandas obtenidas en el proceso de metilación básica (Bergamasco *et al.* 2013; Bendikienė *et al.* 2008; Kleiner, 2012; Yang *et al.* 2009).

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de proteína estimada en el extracto crudo estudiado fue de 3.2 mg/mL. Se obtuvieron 30 fracciones por cromatografía en gel, las cuales fueron utilizadas para la detección de actividad lipolítica; en los ensayos en placa la presencia de actividad fue encontrada en las fracciones 8 a 17, en donde se utilizó tributirina como sustrato la actividad fue evidenciada por un cambio de color de púrpura a amarillo debido a la hidrólisis de dicho sustrato (Fig. 4A). Por otra parte, la actividad lipolítica fue confirmada en placas con agar que contenían aceite-rodamina B, la presencia de halos fluorescentes de color naranja en las placas revelaron la actividad lipolítica después de ser irradiadas con luz UV (Fig. 4B1-B2). Las fracciones que resultaron positivas para la presencia de actividad lipolítica fueron utilizadas para determinar el peso molecular de las proteínas presentes utilizando SDS-PAGE, en la Fig. 5 puede observarse el perfil electroforético; un patrón de al menos 10 bandas con pesos moleculares de 106 a 24 kDa que corresponde a las proteínas que constituyen el complejo lipolítico. Como se observa en la Fig. 6, en condiciones nativas se identificaron varias bandas con pesos moleculares aproximados de 63, 105, 120, 136, 176 y 209 kDa.

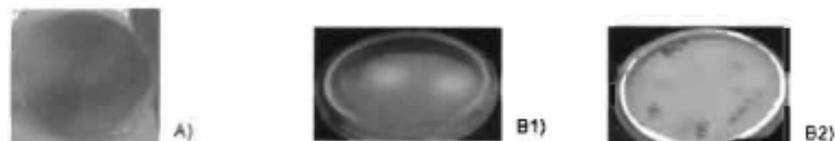


Fig. 4. Actividad lipolítica en placa: A) hidrólisis de tributirina utilizando púrpura de bromocresol como indicador. B1-B-2) hidrólisis de triglicéridos presentes en aceite de soja y aceite de oliva respectivamente, utilizando Rodamina B como indicador.

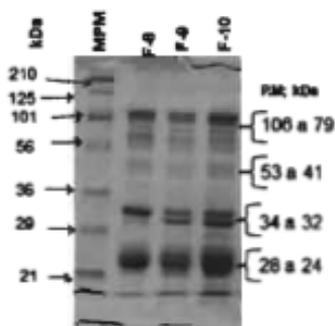


Fig. 5. Perfil electroforético de proteínas; gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE (12%). Marcador de peso molecular (MPM). Pesos moleculares calculados (P.M.; kDa). F8-F10: (Fracciones de cromatografía en gel con actividad lipolítica).

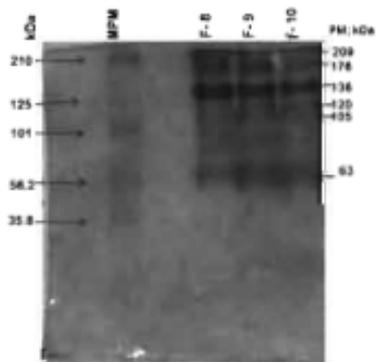


Fig. 6. Perfil electroforético de proteínas; gel de poliacrilamida en condiciones nativas ND-PAGE (12%). Marcador de peso molecular (MPM). Pesos moleculares calculados (P.M.; kDa). F8-F10: (Fracciones de cromatografía en gel con actividad lipolítica).

### 5.1. Hidrólisis de ésteres de p-Nitrofenol

Se investigó la capacidad del complejo lipolítico para hidrolizar ésteres de p-Nitrofenol; p-Nitrofenil palmitato (pNFP) y p-Nitrofenil acetato (pNFA), observando la mayor actividad enzimática sobre pNFA. Resultados semejantes se obtuvieron para la lipasa comercial de *Thermus thermophilus* (Fig. 7), aunque dicha lipasa presentó menor actividad enzimática comparada con la alcanzada por el complejo lipolítico. Las lipasas generalmente presentan actividad frente a ésteres de cadena larga e insolubles en agua. Por el contrario, las estereasas catalizan la hidrólisis preferentemente de ésteres simples solubles en agua, de cadena corta o media (Lopes *et al.*, 2011). En el presente estudio se encontró que el complejo lipolítico posee capacidad catalítica para hidrolizar ésteres de cadena corta y cadena larga, que corresponde a los presentes en los sustratos tributirina y ésteres de p-Nitrofenol. Con respecto a estos últimos, se determinó que presenta mayor actividad enzimática frente p-Nitrofenil acetato, lo que indica que el complejo lipolítico es más específico para ésteres solubles de cadena corta. Un comportamiento semejante fue observado en la hidrólisis de los ésteres de p-Nitrofenol; p-Nitrofenil butirato y p-Nitrofenil laurato, al utilizar lipasa del látex de *Araujia sericifera*, Apocynaceae Di Santo *et al.* (2014). Los autores reportaron que la lipasa presentó mayor actividad en presencia de p-Nitrofenil butirato con enlace éster de cadena corta. En este contexto, la mayor actividad hacia p-Nitrofenil acetato podría atribuirse al tamaño del sustrato. Cuanto mayor sea el tamaño del éster, mayor será el impedimento estérico para que el sustrato tenga acceso al sitio activo de la enzima, lo que explicaría la menor actividad hacia p-Nitrofenil palmitato.

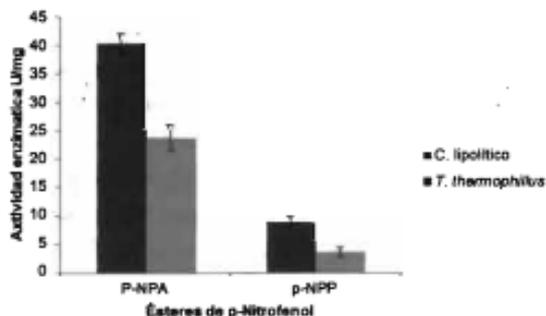


Fig. 7. Hidrólisis de ésteres de p-Nitrofenol: p-NFA y p-NFP (0.2 mM). Enzima comercial *Thermus thermophilus* (control positivo) y complejo lipolítico del látex de la jaca, (*Artocarpus heterophyllus* L.); (Tris-HCl 25 mM pH 8 a 65 °C).

## 5.2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La evaluación del efecto del pH sobre la actividad lipolítica del complejo enzimático, demostró que la máxima actividad la adquiere a valores de pH de 8 y 9 unidades con los sustratos p-NFA y p-NFP respectivamente (Fig. 8A y 8B). Además, en la prueba de hidrólisis de tributirina en emulsión, la máxima actividad fue observada a pH 9 (Fig. 8C). Resultados semejantes fueron reportados por Rivera y Sandoval (2014), quienes evaluaron el efecto del pH en la actividad enzimática de lipasa del látex de *Carica papaya*. En dicho estudio encontraron un pH óptimo de 8.5 en la hidrólisis de triglicéridos de cadena corta (tributirina) y pH 9 en triglicéridos de cadena larga contenidos en el aceite de oliva extra virgen. En el año 2014, Di Santo *et al.* estudiaron el efecto del pH durante la hidrólisis del aceite de algodón realizada por lipasa del látex de *Araujia sericifera*, la mayor actividad fue encontrada a un pH de 8.5. En contraste, Dhoubi *et al.* (2010), identificaron una lipasa putativa de pH óptimo de 8 a 9 unidades. Como puede observarse en la Fig. 8B, la actividad enzimática a pH 6 para el caso del sustrato p-NFA alcanzó un valor cercano al óptimo, lo que sugiere que el complejo lipolítico es resistente a los cambios de pH. En tanto, cabe la

posibilidad de que dicho comportamiento sea debido a la presencia de isoformas de la enzima con actividad lipolítica, lo que explica la diferencia en la determinación de pH óptimo cuando se utilizan sustratos con variación en el tamaño de cadena. No obstante, la actividad hidrolítica se ve favorecida mayormente en condiciones alcalinas. Un pH óptimo alcalino es una característica que comparten algunas enzimas lipolíticas de origen vegetal como la lipasa de *Jatropha curcas* L. (Abigor *et al.*, 2002) y las presentes en *Avena fatua* (Mohamed *et al.*, 2000). Estas enzimas lipolíticas alcalinas resultan muy atractivas a nivel industrial para su aplicación, principalmente en la producción de detergentes.

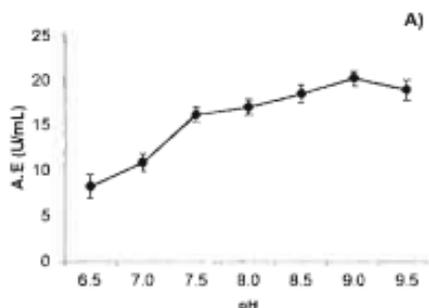


Fig. 8A. Efecto del pH en la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis de p-NFP (37 °C durante 30 min).

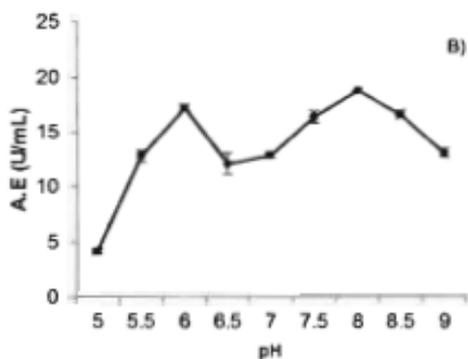


Fig. 8B. Efecto del pH en la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis de p-NFA (37 °C durante 20 min).

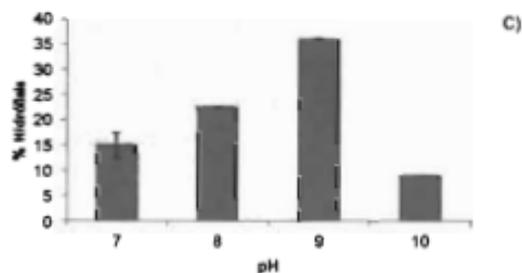


Fig. 8C. Efecto del pH en la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis de tributirina en emulsión (37 °C durante 60 min).

### 5.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

El efecto de la temperatura fue evaluado sobre la actividad enzimática en presencia de los sustratos p-NFA y p-NFP a condiciones de pH óptimo. El valor de temperatura óptima fue estimado a 70 °C para los dos experimentos probados (a pH 8 y 9) observando pérdida de la actividad enzimática a partir de 80 °C (Fig. 9A y 9B). Los cambios de temperatura dan lugar a la ruptura de los puentes de hidrógeno entre el sustrato y los sitios activos de la enzima, mientras que los valores de temperatura óptima favorecen la unión de la enzima al sustrato. Siritapetawee *et al.* (2012), reportaron un estudio relacionado con una enzima hidrolítica de *Artocarpus heterophyllus* (serin proteasa), la cual presentó actividad máxima a una temperatura entre 55 y 60 °C, con una marcada disminución de la actividad catalítica entre los 85 a 95 °C. Cambon *et al.* (2006), encontraron que la actividad óptima de hidrólisis para lipasa del látex de babaco (*Vasconcellea x Heilbornii* cv.) fue de 50 °C y una temperatura óptima de 55 °C en la actividad hidrolítica de lipasa del látex de *Plumeria rubra*. La actividad máxima se obtuvo a 50 °C para lipasa del látex de *Carica papaya* (Rivera *et al.*, 2014). En el caso de lipasa del látex de *Araujia sericifera*, la temperatura óptima alcanzada fue de 60 °C (Di Santo *et al.*, 2014). En contraste con dichos estudios, los resultados del presente trabajo sugieren que la resistencia a altas temperaturas y a valores de pH alcalino son propiedades importantes del complejo lipolítico para su posible aplicación industrial, industria farmacéutica, agrícola, procesamiento de alimentos, etc.

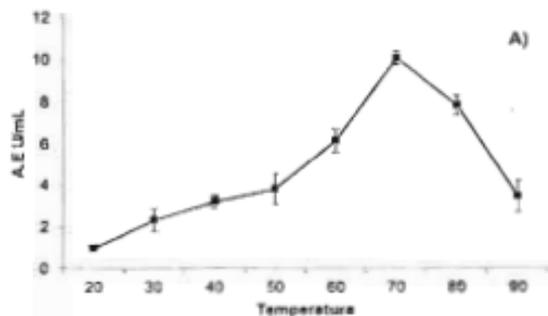


Fig. 9A. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis p-NFP (20-90 °C durante 30 min).

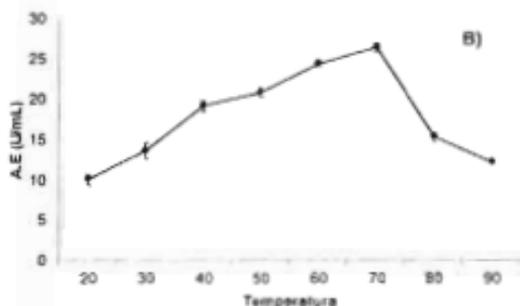


Fig. 9B. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática del complejo lipolítico en la hidrólisis p-NFA (20-90 °C durante 20 min).

#### 5.4. Efecto de solventes orgánicos sobre la estabilidad del complejo lipolítico

El uso de lipasas para bio-conversión en solventes orgánicos es una ventaja desde el punto de vista biotecnológico. La estabilidad y actividad de la enzima en solventes orgánicos dependen no sólo de las propiedades y la concentración de éstos, sino también de la naturaleza de las enzimas (Torres y Castro, 2004; Sharma y Kanwar 2014). La potencialidad de las enzimas lipolíticas para ser funcionales frente a distintos solventes es importante para su aplicación en diversos procesos, por ejemplo aquellos en los que se requieren condiciones no acuosas. Los resultados del presente estudio demuestran que el complejo enzimático conserva actividad lipolítica sobre los distintos solventes probados, incluso después de 24 h de tratamiento. La presencia de actividad lipolítica se observó después de un periodo de incubación de tres h a 37 °C. Esta actividad enzimática fue evidenciada por un cambio en la coloración en el medio de púrpura a amarillo como resultado de la hidrólisis de los ácidos grasos del sustrato tributirina (Fig. 10). La estabilidad sobre solventes orgánicos fue estudiada también para lipasa del látex de *Euphorbia peplus* (Aref et al., 2014). Los autores reportan que la lipasa conserva la actividad en solventes como metanol y butanol, así como buena estabilidad en hexano. La estabilidad frente a solventes orgánicos es muy importante cuando los catalizadores enzimáticos son empleados para la síntesis de ésteres. Desde éste punto de vista, la búsqueda de nuevas fuentes de enzimas de origen vegetal es importante, tomando en cuenta la existencia de enzimas que resultan ser resistentes a los solventes orgánicos empleados a menudo para solubilizar los sustratos y productos. Por consiguiente, la tolerancia del complejo lipolítico en solventes orgánicos es una característica que resulta de interés para diferentes aplicaciones biotecnológicas, especialmente en los procesos en donde se requiere bajo contenido de agua o bien, en reacciones de síntesis.

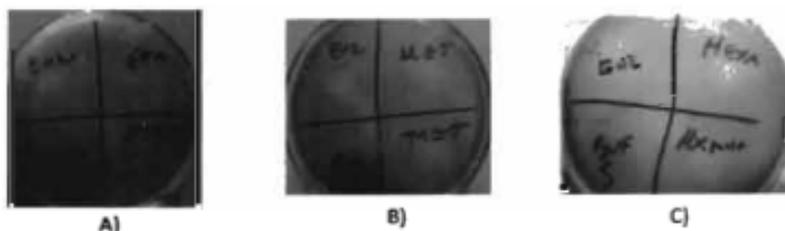


Fig. 10. Actividad lipolítica en placa, halos de hidrólisis que muestran la estabilidad del complejo lipolítico frente a solventes orgánicos: A) etanol, B) metanol y C) hexano.

### 5.5. Parámetros cinéticos del complejo lipolítico

Se estudió el efecto de la concentración de sustrato, la velocidad de hidrólisis fue medida a diferentes concentraciones de pNFA. El complejo lipolítico sigue una cinética de Michaelis-Menten como puede observarse en la Fig. 11A. Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron calculados mediante el método de Lineweaver-Burk. El parámetro  $K_m$  es una medida de la afinidad de una enzima por un sustrato en particular, un valor de  $K_m$  bajo representa alta afinidad, lo cual puede ser importante especialmente para algunas aplicaciones donde el sustrato es la limitante. Así mismo, un valor bajo de  $K_m$  significa que una baja concentración de sustrato es suficiente para hacer funcionar la reacción a la mitad de su velocidad máxima. En el presente estudio se determinó un valor de  $K_m$  de 1.083 mM y un valor de  $V_{max}$  de 833.33 U/mg (Fig. 11B). Mohamed *et al.* (2000), reportaron un valor de  $K_m$  de 0.52 y 0.58 mM para esterasas parcialmente purificadas de *Avena fatua*; isoenzimas EII y EIII respectivamente. En el año 2008, Polizelli *et al.* estudiaron la lipasa de *Pachira aquatica* (Bombacaceae), encontraron un valor de  $K_m$  de 1.63 mM cuando utilizaron como sustrato p-NFA. La afinidad que presentó el complejo lipolítico hacia p-NFA es mayor comparada frente a la afinidad que presentó la lipasa de *Pachira aquatica*, así mismo, es menor que la de *Avena fatua* que poseen la mejor capacidad catalítica hacia dicho sustrato.

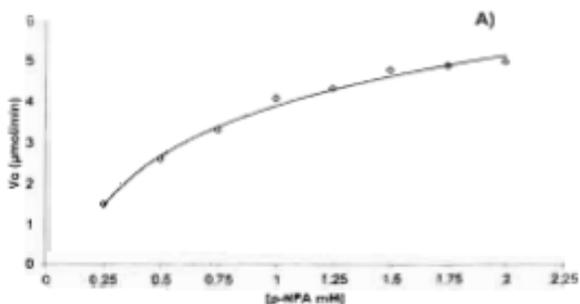


Fig. 11A. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad lipolítica del complejo enzimático. p-NFA: 0.25 a 2 mM (pH 8, 70 °C durante 20 minutos).

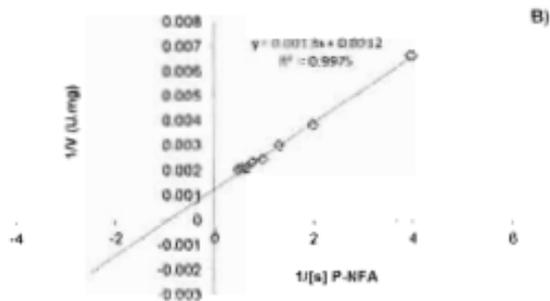


Fig.11B. Representación gráfica de Lineweaver-Burk. Relación entre la concentración de sustrato  $1/[s]$  y la actividad lipolítica  $1/V$  (U/mg) del complejo enzimático. p-NFA: 0.25 a 2 mM (pH 8, 70 °C durante 20 minutos).

## 5.6. Transesterificación de aceites

### 5.6.1. Transesterificación alcalina

La cromatografía de capa fina separó cuatro bandas, los valores del factor de retención ( $R_f$ ) de los aceites probados (aceite de soya y aceite de oliva) sugieren la presencia de triglicéridos, diglicérido, monoglicéridos y ácidos grasos libres (Fig. 12A). Por otra parte, se observó una sola banda que corresponde a los productos (metil ésteres) de la transesterificación en condiciones básicas (Fig. 12B) (Bose y Keharia, 2013; Caro *et al.*, 2000). En la tabla N° 4 (A y B) se observa que los valores de  $R_f$  de los productos (metil ésteres) son más altos con respecto al valor  $R_f$  obtenido antes de la metilación básica del aceite, lo que sugiere que se han obtenido compuestos menos polares y que los metil ésteres son los derivados acorde a la composición de sus ácidos grasos: ácido palmítico, oléico, esteárico, y ácido linoléico para el caso del aceite de oliva. Para el aceite de soya: metil ésteres de ácido palmítico, oléico y linoléico principalmente (Martínez *et al.*, 2014; Kostik *et al.*, 2013; Jokić *et al.*, 2013). Los resultados de la cromatografía en capa fina fueron utilizados como referencia para monitorear la reacción de transesterificación enzimática.

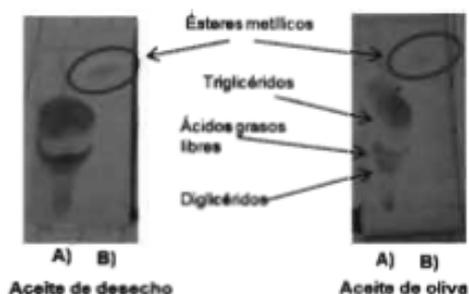


Fig. 12. Separación de compuestos metilados por cromatografía en capa fina. A) Muestras de aceite de desecho (soya) y de oliva sin metilar. B) Ésteres metílicos de aceites de soya y oliva.

Tabla N°4. Valores de Rf de los diferentes compuestos presentes en los aceites

A) Aceite de desecho (soya)		B) Aceite de oliva	
N° banda	Rf	N° banda	Rf
1	0.46	1	0.55
2	0.26	2	0.3
3	0.2	3	0.27
4	0.17	4	0.2
Ésteres metílico	0.79	Ésteres metílicos	0.8

### 5.6.2. Pruebas de transesterificación enzimática de los aceites

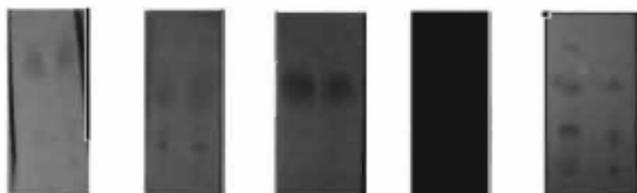
Para evaluar la capacidad de transesterificación del complejo lipolítico se llevaron a cabo diversos experimentos con base en estudios previos que fueron empleados para optimizar el proceso de transesterificación enzimática en la producción de ésteres de ácidos grasos (Bendikienė *et al.*, 2008; Su y Wei, 2014). Se han reportado en la literatura, estudios en los que se evalúan diversas variables para optimizar la reacción de transesterificación, principalmente el efecto de la relación molar alcohol:aceite, el tipo de alcohol, tiempo de reacción, cantidad de catalizador, intensidad de mezclado, temperatura de reacción, tipo de solvente, formulación (lipasa inmovilizada o no) (Demirbas, 2009; Delgado y Pashova, 2010). Como puede observarse en la tabla N° 5, se muestran algunas de las pruebas de transesterificación enzimática realizadas. En algunos casos se empleó hexano como cosolvente ya que existen reportes como los citados por Bendikienė *et al.* (2008) y Kumari *et al.* (2009), quienes mencionan el fenómeno de inactivación de la enzima, que ocurre por el uso de alcoholes de cadena corta generalmente insolubles. Por lo tanto, el uso de solventes como el hexano favorece la obtención de mezclas de reacción más homogéneas y evita a su vez la inhibición de la enzima. La mayoría de los autores describe que son diversas las variables que tienen efecto en las reacciones de transesterificación. No obstante, al hacer el análisis por cromatografía de capa fina se observó que no hay transformación de los compuestos presentes en los aceites y por tanto no se llevó a cabo la producción de ésteres de ácidos grasos. Por ésta razón, los resultados obtenidos muestran que el complejo lipolítico no posee la capacidad catalítica para actuar sobre los sustratos en las condiciones probadas. El análisis de los resultados obtenidos de actividad enzimática muestran que el complejo lipolítico presentó mayor capacidad para hidrolizar sustratos con enlaces éster de cadena corta, tal como lo son el pNFA y la tributirina. Además, demostró la menor actividad hacia enlaces éster de cadena larga y posee un comportamiento cinético típico Michaelis-Menten, por lo cual se deduce que ha actuado con mayor actividad esterasa. Por consiguiente, con base en dichos resultados se descarta la posibilidad de aplicación del complejo lipolítico en la transesterificación de aceites y

obtención de ésteres de ácidos grasos. Sin embargo, debido a sus características, es decir, presentar alta actividad frente a sustratos con enlace éster de cadena corta es una propiedad de interés para procesos de la industria, como lo es su aplicación en la producción de aromas y sabores (Brault *et al.*, 2012).

**Tabla N° 5. Condiciones de operación en el proceso de transesterificación enzimática**

Variable independiente	P1 (soya)	P2 (soya)	P5 (oliva)	P8 (soya)	P9 (soya)
Alcohol	Metanol	Metanol	Etanol	Metanol	Metanol
Relación molar	1:5	1:4	1:2	1:3 y 1:4	1:4
Concentración de enzima	0.32 mg	3 mg	15 mg	5 mg p*	10 mg y 20mg p*
Hexano					C/S
Tiempo (horas)	5	3,6,9	6,24	6,24,48 y 72	6,24,48 y 72
Temperatura °C	37	40	40	40 y 50	40 y 65
Agitación rpm	200	200	200	300	300
Solución reguladora pH 25 mM	6,4	6,4	9	8 y 9	9

**Resultados:**



Nota: p\* = Enzima parcialmente purificada, C/S= con y sin hexano, P1, P2..... prueba uno, prueba dos.

## 6.- CONCLUSIONES

- Se purificó parcialmente el complejo enzimático con actividad lipolítica a partir del látex de la jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.).
- El complejo demostró mayor capacidad para hidrolizar sustratos con enlace éster de cadena corta como el p- Nitrofenil acetato (pNFA) y la tributirina.
- La actividad óptima del complejo se alcanzó a pH 8 en presencia de p-NFA y pH 9 en presencia de p-NFP a temperatura óptima de 70 °C.
- El complejo lipolítico presentó estabilidad en presencia de solventes orgánicos.
- El estudio del comportamiento cinético del complejo lipolítico indica que este sigue una cinética de Michaelis-Menten y aunado a la alta actividad sobre enlaces éster de cadena corta, se deduce que actúa mayormente con actividad esterasa.
- Se descartar la posibilidad de aplicación del complejo lipolítico en la transesterificación de aceites y obtención de ésteres de ácidos grasos.

## 7.- LITERATURA CITADA

- Aarthy, M., Saravanan, P., Gowthaman, M., Rose, C. y Kamini, N. 2014. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. Chemical Engineering Research and Design. Elsevier.
- Abigor, R.D., Uadia, P.O., Foglia, T.A., Haas, M.J., Scott, K. y Savary, B.J. 2002. Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. Journal of the American Oil Chemist's Society. 79 (11): 1123.
- Agrawal, A. A. y Konno, K. 2009. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 40, 311-331.
- Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H. y Shaw, J. F. 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. Progress in lipid research. 43(6), 534-552.
- Akoh, C., Chand, S., Lee, G. y Shaw, J. 2007. Enzymatic approach to biodiesel production. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55, 8995-9005.
- Anastopoulos, G., Zannikou, Y., Stournas, S. y Kalligeros, S. 2009. Transesterification of vegetable oils with ethanol and characterization of the key fuel properties of ethyl esters. Energies. 2(2), 362-376.
- Aref, H.L., Mosbah, H., Fekih, A. y Kenani, A. 2014. Purification and biochemical characterization of lipase from *Tunisian Euphorbia peplus* latex. Journal of the American Oil Chemists' Society. 91(6): 943-951.
- Arpigny, J. L., y Jaeger, K. E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochemical Journal. 343(1), 177-183.
- Arung, E. T., Shimizu, K. y Kondo, R. 2006. Inhibitory effect of isoprenoid-substituted flavonoids isolated from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. Planta medica. 72(09), 847-850.
- Bajaj, A., Lohan, R., Jha, P., Mehrotra, R. 2010. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 62, 9-14.
- 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.
- Bendikienė, V., Joudka, B. y Surinėnaitė B. 2008. Lipases in conversion of oils. Experimental screening of enzymes and substrates for biodiesel production. Biologija. 54 (4) 247-252.
- Bergamasco, J., Araujo, M., Vasconcellos, F., Hatanaka, R., Giotto, M., Aranda, D. y Nery J. 2013. Enzymatic transesterification of soybean oil with ethanol using lipases immobilized on highly crystalline PVA microspheres. Biomass and Bioenergy. 59: 218-233.

Bornscheuer, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*. 26:73-81.

Bose, A. y Keharia, H. 2013. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2(3), 255-26

Brault, G., Shareck, F., Hurtubise, Y., Lépine, F. y Doucet, N. 2012. Isolation and characterization of EstC, a new cold-active esterase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Plos One*. 7(3), e32041.

Cambon, E., Gouzou, F., Pina, M., Barea, B., Barouh, N., Lago, R. y Villeneuve P. 2006. Comparison of the lipase activity in hydrolysis and acyl transfer reactions of two latex plant extracts from babaco (*Vasconcellea*× *Heilbornii* Cv.) and *Plumeria rubra*: effect of the aqueous microenvironment. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54(7): 2726-2731.

Cambon, E., Bourlieu, C., Salum, T. F. C., Piombo, G., Dubreuca, E. y Villeneuve, P. 2009. Ability of *Vasconcellea*× *heilbornii* lipase to catalyse the synthesis of alkyl esters from vegetable oils. *Process biochemistry*. 44(11), 1265-1269.

Caro, Y., Villeneuve, P., Pina, M., Revnes, M. y Graille, J. (2000). Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77(8), 891-902.

Castellanos, M.F. E., Gonzáles, S.R.A. 2004. Síntesis de ésteres alquílicos mediante alcoholísis del aceite de palmiste utilizando como catalizador Lipasa de *Mucor miehei*. Tesis de licenciatura. Universidad industrial de Santander.

Chahinian, H., Snabe, T., Atlas, C., Fojan, P., Petersen, S. B. y 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.

Chen, H. M., Wang, P. Y. y Tsai, S. W. 2009. *Carica papaya* lipase-catalyzed transesterification resolution of secondary alcohols in organic solvents. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 40, 549-554.

Colla, L. M., Rizzardi, J., Pinto, M. H., Reinehr, C. O., Bertolin, T. E. y Costa, J. A. 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*. 101(21), 8308-8314.

Cooper, G.M. 2000. The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. In: *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Sunderland.

Dall'Oglio, E. L., Sousa, P., Oliveira, P., Vasconcelos, L. G., Parizotto, C. A. y Kuhn, C. A. 2014. Use of heterogeneous catalysts in methylic biodiesel production induced by microwave irradiation. *Química Nova*. 37(3), 411-417.

Dantas, J. H., De Paris, L. D., Barão, C. E., Arrovo, P. A., Soares, C. M. F., Visentainer, J. V. y Zanin, G. M. 2013. Influence of alcohol: oil molar ratio on the

production of ethyl esters by enzymatic transesterification of canola oil. African Journal of Biotechnology. 12(50), 6968.

Delgado, C. y Pashova, V. 2010. Producción enzimática de ésteres etílicos del aceite de ricino. Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. 53: 9-19.

Demirbas, A. 2008. Biodiesel from triglycerides via transesterification. Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines. 121-140.

Demirbas, Avhan. 2009. "Progress and recent trends in biodiesel fuels." Energy conversion and management. 50 (1), 14-34.

Dhouib, R., Laroche-Traineau, J., Shaha, R., Lapailletie, D., Solier, E., Rualès, J. y Arondel, V. 2010. Identification of a putative triacylglycerol lipase from papaya latex by functional proteomics. Febs journal. 278(1): 97-110.

Dinorin, T.G.J. 2012. Evaluación de la actividad de lipasas a partir de cultivos de microorganismos aislados de suelos y su aplicación en la transesterificación de aceites de desecho. Tesis de maestría. CIBA-IPN. Tlaxcala.

Di Santo, F.M.E., Foresti, M.L. y Morcelle, S.R. 2014. Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in *Araujia sericifera* Brot. (Apocynaceae) latex. Catalysis Science and Technology. 4(5): 1386-1394.

Dossat, V., Combes, D. y Marty, A. 2002. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process. Journal of biotechnology. 97(2), 117-124.

Ebrahimi, S., Amini, G., Younesi, H. y Najafpour, G. D. 2012. Production of Biodiesel Using Soybean Oil Catalyzed by Porcine Pancreas Lipase in a Solvent Free System. Middle-East Journal of Scientific Research. 11(10), 1323-1327.

Fiorillo, F., Palocci, C., Soro, S. y Pasqua, G. 2007. Latex lipase of *Euphorbia characias* L.: An aspecific acylhydrolase with several isoforms. Plant science. 172(4): 722-727.

Fojan, P., Johnson, P.H., Petersen, T.N. y Petersen, S.B. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. Biochimie. 82:1033-1041.

Fonseca, K.C., Morais N.C., Queiroz, M.R., Silva, M.C., Gomes M.S., Costa, J.O., Mamede, C.C., Torres F.S., Penha-silva, N., Beletti, M.E., Canabrava, H.A. y Oliveira F. 2010. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. hislopilii latex. Phytochemistry. 71: 708-715.

Garlapati, V. K., Kant, R., Kumari, A., Mahapatra, P., Das, P. y Banerjee, R. 2013. Lipase mediated transesterification of Simarouba glauca oil: a new feedstock for biodiesel production. Sustainable Chemical Processes. 1(1), 1.

Ghalv, A. E., Dave, D., Brooks, M. S. y Budde, S. 2010. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 6(2), 54.

Goq, A., Roman, M., Tosa, M., Paizs, C. y Irimie, F. D. 2012. Biodiesel production using enzymatic transesterification—current state and perspectives. *Renewable Energy*. 39(1), 10-16.

González, A. F. R., Galleo, E. G. y Castañeda, H. G. T. 2010. Variables de operación en el proceso de transesterificación de aceites vegetales: una revisión-catálisis enzimática. *Ingeniería e Investigación*. 30(1), 17-21.

Gupta, V. G., Tuohy, M., Kubicek, C. P., Saddler, J. y Xu, F. 2014. *Bioenergy Research: Advances and Applications*. Newnes, Elsevier, USA.

Haigh, K. F., Saha, B., Vladisavljević, G. T. y Reynolds, J. C. 2012. Kinetics of the pre-treatment of used cooking oil using Novozyme 435 for biodiesel production. *Procedia Engineering*. 42, 1106-1113.

Hakim, E.H., Achmad, S.A., Juliawaty, L.D., Makmur, L., Syah, Y.M., Aimi, N., Kitajima, M., Ghisalberti, E.L. 2006. Prenylated flavonoids and related compounds of the Indonesian *Artocarpus* (Moraceae). *Journal of Natural Medicine*. 60, 161-184.

Hernández, M. J. 2012. Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I) Enzimas hidrolíticas. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.

Hu, S. C., Lin, C. L., Cheng, H. M., Chen, G. S., Lee, C. W. y Yen, F. L. 2015. Artocarpin Induces Apoptosis in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma HSC-1 Cells and Its Cytotoxic Activity Is Dependent on Protein-Nutrient Concentration. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

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.

Hsu, A.F., Jones, K.C., Foglia, T.A. y Marmor, W.N. 2004. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. *Biotechnology Letters*. 26: 917-921.

Jeoannathan, K. R. y Nielsen, P. H. 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production a literature review. *Journal of cleaner production*. 42, 228-240.

Jelen, H. 2011. *Food flavors: chemical, sensory and technological properties*. CRC Press.

Jokić, S., Sudar, R., Svilović, S., Vidović, S., Bilić, M., Velić, D. y Jurković, V. 2013. Fatty Acid Composition of Oil Obtained from Soybeans by Extraction with Supercritical Carbon Dioxide. *Czech Journal of Food Science*. 31(2).

Joseph, B., Ramteke, P. W. y Thomas, G. 2008. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnology advances*. 26(5), 457-470.

- Kabir, S. 1998. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed derived lectin of versatile applications in immunological research. *Journal of Immunological Methods*. 212, 193–211.
- Khan, M.R., Omoloso, A.D., Kihara, M. 2003. Antibacterial activity of *Artocarpus heterophyllus*. *Fitoterapia*. 74, 501–505.
- Kleiner, L., Vazquez, L. y Akoh, C. 2012. Lipase-catalyzed concentration of stearidonic acid in modified soybean oil by partial hydrolysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 89 (11).
- Kostik, V., Memeti, S. y Bauer, B. 2013. Fatty acid composition of edible oils and fats. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 4, 112-116.
- Kouker, G. y Jaeger, K. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 (1), 211-213.
- Kovács, S., Krár, M. y Hancsók, J. 2008. Investigation of Enzyme-Catalyzed Transesterification of Used Frying Oils. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*. 36(1-2) 59-63.
- Kulkarni, M. y Dalai, A. 2006. Waste Cooking oils an economical source for biodiesel: a Review. *Industrial y Engineering Chemistry Research*. 45: P.2901-2913.
- Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V.K. y Banerjee, R. 2009. Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil. *Biotechnology for biofuels*. 2 (1): 1–7.
- 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.
- Li, H. y Xie, W. 2006. Transesterification of soy bean oil to biodiesel with Zn/2 catalyst. *Catalysis Letters*. (107): 25-30.
- Lopes, D.B., Fraga, L.P., Fleuri, L.F. y Macedo, G.A. 2011. Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately?. *Food Science and Technology (Campinas)*. 31(3): 603-613.
- López Blanco, E. 2011. Estudio y desarrollo de una planta piloto para la obtención de biodiesel.
- Luna, E. G., Alejo, S.G., Ramírez, G. y Arévalo, G.M. 2013. La yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) un fruto de exportación. *Agro Productividad*. 6(5): 65-70.
- Madrigal-Aldana, D. L., Tovar-Gómez, B., de Oca, M. M., Sámano-Averdi, S. G., Gutierrez-Meraz, F. y Bello-Pérez, L. A. 2011. Isolation and characterization of Mexican jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) seeds starch in two mature stages. *Starch-Stärke*. 63(6), 364-372.

Mander, P., Cho, S. S., Simkhada, J. R., Choi, Y. H. y Yoo, J. C. 2012. An organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. CS133 for enzymatic transesterification of vegetable oils in organic media. *Process Biochemistry*. 47(4), 635-642.

Marchetti, J. M., Miquel, V. U. y Errazu, A. F. 2007. Possible methods for biodiesel production. *Renewable and sustainable energy reviews*. 11(6), 1300-1311.

Marcano, L., Machillanda, E., Sojo, M., Quijada, K. y Discipio, S. 2014. Estudio de la obtención de biodiesel a partir de productos secundarios de la reacción de transesterificación de aceites residuales de cocina. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*. 29(1), 65-74.

Martínez, M.E. 2013. Identificación y caracterización de las proteínas con actividad de proteasa y lipasa del látex de Jaca (*Artocarpus Heterophyllus* L.) (Tesis de Maestría en Ciencias Agrícolas CBAP-UAN). Nayarit. Universidad Autónoma de Nayarit.

Martínez, M., Fuentes, M., Franco, N., Sánchez, J. y de Miquel, C. 2014. Fatty Acid Profiles of Virgin Olive Oils from the Five Olive-Growing Zones of Extremadura (Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 91(11), 1921-1929.

Mekkiengkrai, D., Ute, K., Swiezewska, E., Chojnacki, T., Tanaka, Y. y Sakdapipanich, J. T. 2004. Structural characterization of rubber from jackfruit and *euphorbia* as a model of natural rubber. *Biomacromolecules*. 5(5), 2013-2019.

Messaoudi, A., Belguith, H., Gram, I., Hamida, J.B. 2010. Classification of EC 3.1. 1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *African journal of biotechnology*. 9(48): 8243-8247.

Mogensen, J.E., Sehgal, P. y Otzen, D.E. 2005. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochemistry*. 44(5): 1719-1730.

Mohamed, M.A., Mohamed, T.M., Mohamed, S.A. y Fahmy, A.S. 2000. Distribution of lipases in the Gramineae. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technology*. 73(3): 227-234.

Mojsov, K. 2011. Application of enzymes in the textile industry: a review. II International Congress. Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry. 230-239.

Nagarajan, S. 2012. New tools for exploring "old friends—microbial lipases". *Applied biochemistry and biotechnology*. 168(5), 1163-1196.

Narwal, S. K., Saun, N. K., Dogra, P., Chauhan, G. y Gupta, R. 2015. Production and characterization of biodiesel using nonedible castor oil by immobilized lipase from *Bacillus aerius*. *BioMed research international*.

Navarro-González, I. y Periago M.J. 2012. Enzimas lipolíticas bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales. 28:45-65.

NIIR Board. 2004. Cultivation of fruits, vegetables and floriculture. National Institute of Industrial Research Board.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). 1992. Published in Enzyme Nomenclature Academic Press, San Diego, California, ISBN 0-12-227164-5. Disponible en <http://www.chem.gmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (revisado el 01 de agosto del 2016).

Panesar, P. S., Marwaha, S. S., y Chopra, H. K. 2010. Enzymes in Food Processing: Fundamentals and Potential Applications, I K International Publishing House.

Pant, R., y Chaturvedi, K. 1989. 4-hydroxyundecyl docosanoate and cycloartenone in *Artocarpus integra* latex. *Phytochemistry*. 28 (8), 2197-2199.

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

Parawira, W. 2009. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: a Review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 29:82-93.

Pardal, A. C. D. V. 2012. Obtención de biodiesel por transesterificación de aceites vegetales: nuevos métodos de síntesis. Tesis de doctorado. Universidad de Extremadura Facultad de Ciencias Departamento de Ingeniería Química y Química Física.

Pencreac'h, G. y Baratti, J. 1996. Hydrolysis of p-nitrophenylpalmitate in n-heptane by the *Pseudomonas Cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*. 18: 417-422.

Peña-Montes, C. y González-Saravia, A.F. 2008. Evolución Dirigida en la generación de biocatalizadores: Biocatalizadores hechos a medida. *Biotecnología*. 12(2): 5-23.

Polizelli, P.P., Tiera, M.J. y Bonilla, G.O. 2008. Effect of Surfactants and Polyethylene Glycol on the Activity and Stability of a Lipase from Oilseeds of *Pachira aquatica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 85(8): 749-753.

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

Raiendran, A., Palanisamy, A. y Thanqavelu, V. 2009. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian archives of biology and technology*. 52(1), 207-219.

Ramirez, L. E., Vela, N. A. y Rincón, J. J. 2012. Biodiesel, un combustible renovable. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. (55), 62-70.

Ribeiro, L., Silva, A., Silva, M. y G. Almeida, R. 2014. A Study on Ethanolysis and Methanolysis of Coconut Oil for Enzymatically Catalyzed Production of Biodiesel. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*. 4, 215-224.

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

Rivera, I. y Sandoval, G. 2014. Caracterización de diversas fracciones del látex Carica papaya como biocatalizadores en la hidrólisis de triglicéridos. *Grasas y Aceites*. 65(1): e003.

Ro, H. S., Hong, H. P., Kho, B. H., Kim, S. y Chung, B. H. 2004. Genome-wide cloning and characterization of microbial esterases. *FEMS microbiology letters*. 233(1), 97-105.

Robles-Medina, A., González-Moreno, P.A., Esteban-Cerdan, L. y Molina-Grima, E. 2009. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*. 27, 398-408.

Rojas-González, A. y Girón-Gallego, E. 2011. Variables de operación en el proceso de transesterificación de grasas animales: una revisión. *Ingeniería y Universidad*. 15(1), 197-218.

Romero, W. R. y Barrera, F. J. S. 2013. Estudio del proceso de transesterificación para la obtención de biodiesel a partir del aceite de palma en un reactor por lotes. *Producción + Limpia*. 8(1), 119-135.

Saad, E. B. 2005. Etanolise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos. Tesis Maestría, Universidade Federal do Paraná.

Salihu, A., Alam, M., Abdulkarim, M., Salleh, H. 2012. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resourconserv recycling*. 58 (0): 36 - 44.

Salihu, A., Alam, M., Abdulkarim, M. y Salleh H. 2012. Characterization of *Candida cylindracea* lipase produced from Palm oil mill effluent based medium. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*. (2): 24-31.

Sanghi, R. y Singh, V. 2012. *Green Chemistry for Environmental Remediation*. John Wiley y Sons, New Jersey.

Séverac, E., Galv, O., Turon, F., Monsan, P. y Marty, A. 2011. Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil. *Bioresource technology*. 102(8), 4954-4961.

Sharma, S. y Kanwar, S. S. 2014. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. *The Scientific World Journal*.

Sim, J. H., Kamaruddin, A. H. y Bhatia, S. 2010. Biodiesel (FAME) productivity, catalytic efficiency and thermal stability of lipozyme TL im for crude palm oil transesterification with methanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87(9), 1027-1034.

Siritapetawee, J., Thammasirirak, S. y Samosornsuk, W. 2012. Antimicrobial activity of a 48-kDa protease (AMP48) from *Artocarpus heterophyllus* latex. *European review for medical and pharmacological sciences*. 16 (1): 132-137.

Su, E. y Wei, D. 2014. Production of fatty acid butyl esters using the low cost naturally immobilized *Carica papaya* lipase. Journal of agricultural and food chemistry. 62(27), 6375-6381.

Torossi, F. 2006. Reacciones en contexto: la transesterificación en la producción de biodiesel a partir de aceite de fritura usado. Revista Anales de la Real Sociedad Española de Química. 102 (3): 43-49.

Torres, S. y Castro, G.R. 2004. Non-aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems. Food Technology and Biotechnology. 42(4): 271-277.

Torres-Sáez, R. G. 2014. Modificación Química en Fase Sólida de Lipasa B de *Candida antarctica* para mejorar sus propiedades de actividad, estabilidad y enantioselectividad. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 38, 181-204.

Toscano, P.L., Estarrón, E.M., Stilianova, S.M. y Cervantes, D.L. 2014. Reacciones de hidrólisis y metanólisis de aceite de olivo por catalisis enzimática para la síntesis de Metil Ésteres. Revista Ingenierías. Misantla, Veracruz.

Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M. y Oliveira, J. V. 2010. A review on microbial lipases production. Food and bioprocess technology. 3(2), 182-196.

Véras, I. C., Silva, F. A., Ferrão-González, A. D. y Moreau, V. H. 2011. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. Bioresource technology. 102(20), 9653-9658.

Voet, D. y Voet, J. G. 2008. Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. 3ra edición. Ed. Médica panamericana, Madrid, España.

Vyas, A. P., Verma, J. L. y Subrahmanyam, N. (2011). Effects of molar ratio, alkali catalyst concentration and temperature on transesterification of *Jatropha* oil with methanol under ultrasonic irradiation. Advances in Chemical Engineering and Science. 1(02), 45.

Wang, Y., Liu, J., Gerken, H., Zhang, C., Hu, Q. y Li, Y. 2014. Highly-efficient enzymatic conversion of crude algal oils into biodiesel. Bioresource technology. 172, 143-149.

Wei, B.L., Weng, J.R., Chiu, P.H., Hung, C.F., Wang, J.P., Lin, C.N., 2005. Antiinflammatory -flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus communis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 3867-3871.

Yang, J., Zhang, B. y Yan, Y. 2009. Cloning and expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 lipase gene in *Pichia pastoris* and characterizing for transesterification. Applied biochemistry and biotechnology. 159:355-65.

Yang, K., Sohn, J. y Kim H. 2009. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. *Journal of bioscience and bioengineering*. 107 (6): 599-604.

**ANEXOS**

---

## ANEXO A

### SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SDS-PAGE:

Solución	Composición
<b>Buffer de carga-muestra</b>	<p style="text-align: center;"><b>PARA 5mL</b></p> <p>Tris- base 12 M ; 0.076 g            SDS 0.12 M ; 0.1 g  <b>AJUSTAR pH a 6.8</b>            Glicerol 2 M ; 1 mL            500 µL de solución azul de bromofenol            500 µL de 2-mercaptoetanol</p>
<b>Buffer para el gel concentrador Tris-HCl-SDS 0.5 M pH 6.8.</b>	<p style="text-align: center;"><b>PARA 100 mL</b></p> <p>Tris- base: 6.05 g            agua destilada: 100 mL  <b>AJUSTAR a pH 6.8</b> con HCl concentrado            SDS 0.4 % ; 0.4 g</p>
<b>Buffer para el gel concentrador Tris-HCl-SDS 1.5 M pH 8.8.</b>	<p style="text-align: center;"><b>PARA 100 mL</b></p> <p>Tris-base: 18.17 g            agua destilada: 100 mL  <b>AJUSTAR a pH 8.8</b> con HCl concentrado            SDS 0.4 % ; 0.4 g</p>
<b>solución amortiguadora de electroforesis 10x</b>	<p style="text-align: center;"><b>PARA 500 mL</b></p> <p>Tris-base; 15.12 g            Glicina; 72.06 g            SDS ; 5g  <b>AJUSTAR a pH 8</b> con HCl concentrado</p>
<b>Solución decolorante</b>	<p style="text-align: center;"><b>PARA 500 mL</b></p> <p>Ácido acético; 50 mL            Metanol; 250 mL            Agua destilada; 200 mL</p>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAHÍA



SISTEMA DE BIBLIOTECA

### SOLUCIÓN DE PERSULFATO DE AMONIO (PSA) AL 10%

Disolver 40 mg de PSA en 400  $\mu$ L de agua destilada (almacenar por una semana).

### Gel separador al 12% en buffer Tris-HCl pH 8.8

Gel separador al 12%	
	Aproximadamente 5 mL
Agua destilada	1.6 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2 mL
Tris-HCl-SDS pH 8.8	1.3 mL
PSA	0.05 mL
TEMED	0.005 mL

### Gel concentrador en buffer Tris-HCl pH 6.8

Gel concentrador	
	Aproximadamente 3 mL
Agua destilada	2.1 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	0.5 mL
Tris-HCl-SDS pH 6.8	0.38 mL
PSA	0.03 mL
TEMED	0.003 mL

### SOLUCIÓN AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS 1X Tris-Glicina pH 8

Solución amortiguadora de electroforesis 1x Tris-Glicina pH 8.	
	1 Litro
Solución concentrada 10X	100 mL
Agua destilada	Hasta un litro.

### AZUL DE BROMOFENOL

0.01 g en 1000  $\mu$ L de agua destilada.

**BUFFER DE TINCIÓN AZUL DE COOMASSIE**

	500 mL
Azul de Coomassie R-250	0.5 g
Acido acético	50 mL
Metanol	250 mL
Agua destilada	200 mL

**ACRILAMIDA AL 30%**

	100 mL
Acrilamida	29.2 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Agua destilada	Hasta 100 mL

Disolver la acrilamida en 50 mL de agua destilada. Agregar la bis-acrilamida y aforar a 100 mL. Filtrar, proteger de la luz y almacenar a 4 °C.

## ANEXO B

Para estimar la relación molar alcohol-aceite a utilizar en las pruebas de transesterificación se partió de datos conocidos del alcohol, es decir, cuando metanol fue utilizado como alcohol, al establecer que se utilizaría la cantidad 2.5 mL, se determinaron los gramos equivalentes a ese volumen.

$$D = m/v \rightarrow m = d \cdot v$$

Por lo que:  $(0.792 \text{ g/mL}) (2.5 \text{ mL}) = 1.98 \text{ g}$

Se determinó la cantidad de moles de metanol;  $n = g/PM$

$$1.98 \text{ g} / 32.04 \text{ g. mol} = 0.0617 \text{ mol de metanol}$$

Una vez que se determinó el equivalente en moles del metanol se realizó una división entre 6 (relación 1:6 aceite alcohol);  $0.0617/6 = 0.0103 \text{ mol}$

Se requieren 0.0103 mol de aceite.

Con el dato del peso neto del aceite de soya, que fue de 9.07 g, se estimó el peso molecular promedio de ácidos grasos del mismo:

$$PM = g/mol \text{ por tanto, } 9.07/0.0103 = 873.78 \text{ g/mol del aceite.}$$

Un triglicérido está formado por 3 ácidos grasos libres, estos se enlazan mediante  $\text{CH}_2$  o  $\text{CH}$  según corresponda. En ese sentido, el peso molecular obtenido se divide entre 3, así mismo se resta el peso molecular de los átomos de carbono e hidrógeno correspondientes.

$$873.78/3 = 291.26$$

La cantidad obtenida, menos 3 átomos de carbono y 2 de hidrógenos que hacen el remplazo del hidrógeno expuesto de cada ácido graso.

$$291.26 - 38 = 253.26 \text{ g/mol peso molecular promedio de ácidos grasos del aceite}$$

A partir de los datos generados, se tiene que 253.26 g/mol es el peso molecular promedio de ácidos grasos del aceite de soya por lo que;

$$253.26 \text{ g} \text{-----} 1000 \text{ Mm}$$

$$? \text{ -----} 2 \text{ Mm} = 0.5065 \text{ g aceite de soya}$$

$$D = m/v$$

$$V=m/d \rightarrow 0.5065\text{g}/0.907 \text{ g. mL} = 0.5584 \text{ mL} \rightarrow 559 \mu\text{L aceite}$$

Para una relación 1:5 aceite alcohol;

$$n=g/p_m \rightarrow 0.5065/253.26 = 0.0019 \text{ moles de aceite}$$

$$0.0019 \cdot 5 = 0.0095 \text{ mol de metanol}$$

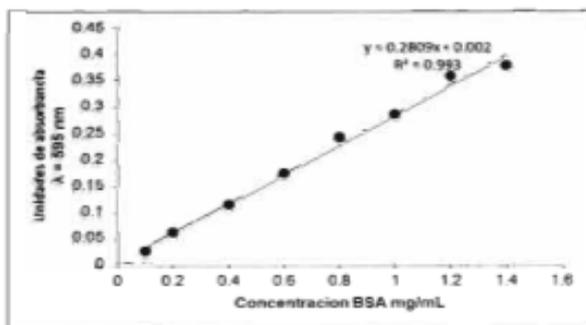
$$g_r = 0.0095 \text{ mol} \cdot 32.04 \text{ g. mol} = 0.3043 \text{ g}$$

$$d=m/v \rightarrow V = (0.3043/0.792 \text{ g. ml}) = 0.384 \text{ ml } 0.384 \mu\text{L de metanol.}$$

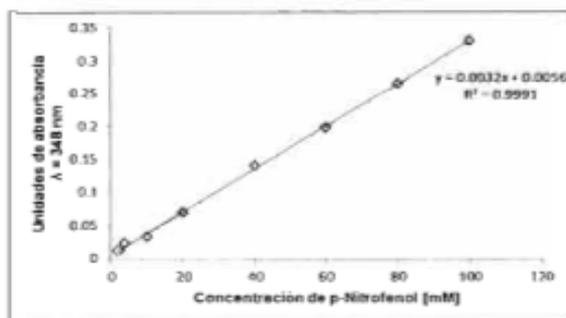
Se desarrolló el mismo procedimiento para los demás aceites probados

## ANEXO C

### Curvas de calibración.



C-1. Curva de concentración de BSA. Unidades de absorbancia v/s concentración de BSA (mg/mL).



C-2. Curva de calibración concentración de p-Nitrofenol. Unidades de absorbancia a 348 nm v/s p-Nitrofenol (mM).

EVALUATION OF THE ACTIVITY OF LIPOLYTIC COMPLEX IDENTIFIED IN LATEX JACA, *Artocarpus heterophyllus* L.

(Evaluación de la actividad del complejo lipolítico identificado en el látex de jaca, *Artocarpus heterophyllus* L.)

Victoria Martínez Acebedo<sup>1\*</sup>, Leticia Mónica Sánchez-Herrera<sup>2</sup>, María Teresa Sumbaya-Martínez<sup>2</sup>, Edgar Irujo Jiménez-Ruiz<sup>2</sup>, Leticia Guerrero Rosales<sup>2</sup>, Mónica Elizabeth Martínez González<sup>2</sup>, Rosendo Balboa-Norales<sup>2</sup>, Yolotzin Apatzingan Palomino-Hermosillo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias (CBAP) de la Universidad Autónoma de Nayarit. Unidad de Tecnología de Alimentos-UAN.

\* Autor que presentó el trabajo

\* Autor para correspondencia: vicky\_16900@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT

The research of hydrolytic enzymes present in the latex jackfruit of *Artocarpus heterophyllus*, of the family Moraceae, showed the presence of an enzyme complex proteolytic and lipolytic activity. The characterization of lipases from plant source can lead to the possibility of use as potential catalyst in the different processes of transformation; these have advantages over chemical catalysts, exhibit high substrate specificity, enables the use of milder reaction conditions and have low cost. The aim of this study is to evaluate the lipolytic activity of the enzyme complex. For the characterization, was obtained the extract crude from latex, the separation of proteins was performed by gel chromatography using as matrix Sefinose Fast Flow, the identification of the lipase activity was carried out using agar plates with tributyrin (0.5 %) and tween 20 (0.1 %) as substrate, bromocresol purple as an indicator. The confirmatory tests were conducted using olive oil to the 1% and rhodamine B as an indicator. The quantification of the lipase activity was determined by measurement of the increase in absorbance at 400 nm produced by the release of p-Nitrophenol as a result of hydrolysis of the ester 1 mM p-Nitrophenyl palmitate in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8 at 28 °C for 10 min. The results obtained in the tests of hydrolysis in plate with bromocresol purple as indicator, showed a change in color from purple to yellow due to the hydrolysis of the tributyrin. In the plates of oil-rhodamine B, fluorescent halos were observed due to the formation of free fatty acids. The results of the activity of the complex on the p-Nitrophenyl palmitate, assessing the amount of p-Nitrophenol released in the course of the time, showed an initial speed of 2.87  $\mu\text{mol} / \text{ml} \cdot \text{min}$ , where a concentration of 1 mM p-Nitrophenyl palmitate is used.

Keywords: *Artocarpus heterophyllus*; lipases, latex, enzyme complex

RESUMEN

La investigación de enzimas hidrolíticas presentes en el látex de *Artocarpus heterophyllus*, de la familia Moraceae, mostraron la presencia de un complejo enzimático con actividad proteolítica y lipolítica. La caracterización de lipasas de origen vegetal puede conducir a la posibilidad de utilizarse como catalizador potencial en los diferentes procesos de transformación, estos ofrecen ventajas sobre los

catalizadores químicos, presentan alta especificidad por sustrato, permiten utilizar condiciones de reacción más suaves y tienen menor costo. El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad lipotica del complejo enzimático. Para la caracterización se obtuvo el extracto crudo a partir del látex, la separación de las proteínas se realizó por cromatografía en gel utilizando como matriz Sefinose Fast Flow, la identificación de la actividad lipasa se realizó utilizando placas de agar con tributirina (0.5%) y tween 20 (0.1%) como sustrato, púrpura de bromocresol como indicador. Las pruebas confirmatorias se realizaron utilizando aceite de oliva al 1% y rodamina B como indicador. La cuantificación de la actividad lipasa se determinó por medición del incremento de la absorbancia a 410 nm producido por la liberación de p-Nitrofenol como resultado de la hidrólisis de 1 mM del p-Nitrofenil palmitato en solución Tris-HCl 25 mM pH 8.8 a 28 °C por 10 min. Los resultados obtenidos en los ensayos de hidrólisis en placa con púrpura de bromocresol como indicador, mostraron un cambio de la coloración de púrpura a amarillo desde a la hidrólisis de la tributirina. En las placas de aceite-rodamina B, se observaron halos fluorescentes debido a la formación de ácidos grasos libres. Los resultados obtenidos de la actividad del complejo sobre el p-Nitrofenil palmitato evaluando la cantidad de p-Nitrofenol liberado en el transcurso del tiempo, mostraron una velocidad inicial de 2.87  $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$ , cuando una concentración de 1 mM de p-Nitrofenil palmitato es utilizada.

**Palabras clave:** *Artocarpus heterophyllus*, lipasas, látex, complejo enzimático

## INTRODUCCIÓN

Las lipasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en microorganismos, animales y plantas, catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos. Actúan en la interfase agua-lípido, por lo que no requieren sustratos especialmente solubles en agua, poseen alta especificidad y actúan en condiciones de reacción moderada a pH entre 7 y 8 resultando ser una alternativa a los procesos químicos, debido a su eficiencia y que son amigables con el medio ambiente [1, 2, 3]. Con respecto a su estructura todas las enzimas lipolíticas presentan el plegamiento tipo de las  $\alpha/\beta$  hidrolasa y la estructura comúnmente contiene una pequeña hélice  $\alpha$  conocida como tapa, la cual cubre al sitio activo. Esta conformación es llamada la conformación cerrada. Cuando la lipasa es adsorbida a una interfase, la tapa es desplazada para que el sitio activo se vuelva accesible al sustrato. Esta conformación es llamada la conformación abierta, la actividad funcional está dada por en la cada de aminoácidos serina nucleofílica, un ácido aspártico/glutámico y una histidina [4].

Las lipasas más comúnmente utilizadas en la industria son las producidas a partir de microorganismo tales como hongos, levaduras y bacterias. Las lipasas de origen vegetal han sido poco estudiadas y constituyen un punto de partida en la generación de nuevo conocimiento en relación a sus propiedades catalíticas, lo que conduce a la posibilidad de utilizarse como catalizador potencial en la aplicación como aditivo en alimentos (modificación de los sabores), síntesis química (obtención de ésteres), detergentes (hidrólisis de grasas), pre-tratamiento de aguas residuales (descomposición y remoción de sustancias oleosas), en la industria cosmética y farmacéutica. Adicionalmente, las lipasas tienen importante aplicación en el campo de la bioenergía, especialmente en la producción de biodiesel, el cual es un sector en expansión como resultado de la creciente demanda mundial del uso de energías renovables

[5].

La jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) pertenece a la familia Moraceae, se cultiva ampliamente en regiones con clima tropical y produce látex en todas sus partes. La investigación de enzimas hidrolíticas en el látex, ha reportado la presencia de proteasas de interés en el área de la salud [5, 7]. La investigación realizada por el grupo de investigadores de la Universidad Autónoma de Nayarit, identificó la presencia de un complejo enzimático con actividad de proteasa y lipasa [8]. Por lo que el objetivo del presente es evaluar la actividad del complejo lipolítico identificado en el látex de la jaca, *Artocarpus heterophyllus* L.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar la evaluación bioquímica del complejo lipolítico se efectuaron una serie de procedimientos que incluyen la obtención del extracto crudo a partir del látex descartando los materiales insolubles.

### Extracto crudo

El látex se obtuvo a partir del pedúnculo de los frutos de jaca, *Artocarpus heterophyllus* L. Se recuperó en tubos de centrifuga que contenían buffer de fosfato 0.2 M, ácido cítrico 0.1 M, EDTA 5 mM y cisteína 5 mM, pH 6.4. La suspensión fue sometida a centrifugación en frío (4°C) a 9000 rpm por 20 minutos (HERMLE, Z 324 K, rotor 221.18), se descartaron los materiales insolubles obteniendo así el extracto crudo.

La separación de las proteínas se realizó por medio de cromatografía en columna (Econo-Column Bio-Rad) empacada con Sephrose Fast Flow SF06-GF (Bio Lask Inc.), la elución de proteínas se realizó con buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8.8. La velocidad de flujo utilizada fue de 1ml/min.

### Cuantificación de proteína soluble en el extracto crudo.

La cuantificación de proteína en el extracto crudo se realizó empleando el método de Bradford [9]. Utilizando el reactivo de Bradford (sigma-aldrich N° Cat. B6916), se construyó una curva estándar BSA (albúmina de suero bovino) en una concentración de 1mg/ml.

### Caracterización de la actividad lipolítica.

La caracterización de la actividad lipolítica se realizó utilizando placas con agar al 1.5%, púrpura (p-bromocresol como indicador, tributirina al 0.5% y tween 20 al 0.1% como sustrato, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (28 °C). Cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna fue utilizada para identificar la presencia de actividad lipolítica.

Se realizó una prueba confirmatoria utilizando aceite de oliva al 1% y rodamina B como indicador [10]. El aceite se preparó al 1% en buffer Tris-HCl pH 8.8, al cual se le añadió 0.1% de goma arábiga, agar (1.5%) y 0.01% de rodamina B, la actividad lipolítica fue probada en placa utilizando cada una de las fracciones obtenidas por columna. Las placas fueron colocadas a temperatura ambiente (28 °C). La actividad lipolítica se monitoreó irradiando las placas con luz UV, tomando como positivas aquellas fracciones en las que se observó la presencia de halos fluorescentes de color naranja.

Se realizaron pruebas de hidrólisis utilizando p-Nitrofenil palmitato como sustrato [11]. Se preparó una solución de p-Nitrofenil palmitato 10 mM en 2-propanol, de ésta solución un volumen se diluyó con 9 volúmenes de una solución amortiguadora de Tris-HCl 25 mM pH 8.8, la cual contenía 0.4% de tritón X-100. Se depositó 100  $\mu$ L de la solución de sustrato en una microplaca de 96 pozos, se pre-incubó a 27  $^{\circ}$ C por 5 min. Para comenzar la reacción se añadió 100  $\mu$ L del complejo enzimático (0.1mg/mL proteína, Tris-HCl 25 mM de pH 8.8 ), la absorbancia se midió a 410 nm cada minuto durante 10 min. La actividad se determinó midiendo la velocidad inicial de hidrólisis de p-Nitrofenil palmitato.

## RESULTADOS

### Contenido de proteínas totales

El contenido proteico en el extracto crudo obtenido a partir del látex de la jaca *Artocarpus heterophyllus* L. fue de 3.3 mg/mL.

### Determinación de la actividad lipolítica

Los resultados obtenidos en los ensayos de hidrólisis en placa con púrpura de bromocresol como indicador, mostraron un cambio de la coloración de púrpura a amarillo, lo que permitió identificar las fracciones que presentaban la actividad lipolítica (Fig. 1 A). En las pruebas en las que se utilizó aceite de oliva y rodamina B como indicador se detectó la actividad de hidrólisis por la presencia de halos fluorescentes (Fig. 1 B).



A)



B)

Fig. 1A. Actividad de hidrólisis de tributirina: cambio de púrpura a amarillo. Fig.1B. Actividad de hidrólisis de triglicéridos presentes en el aceite de oliva, presencia de halos fluorescentes.

### Método p-Nitrofenil palmitato

La actividad enzimática medida en  $\mu$ moles (Tabla. N<sup>o</sup>1) se determinó a partir de la construcción de una curva estándar de p-Nitrofenol. Los datos obtenidos muestran que la velocidad inicial ( $V_0$ ) es de 2.87  $\mu$ mol/ml-min cuando se utiliza una concentración de 1mM del sustrato p-Nitrofenil palmitato.

Tabla. N<sup>o</sup> 1  $\mu$ mol/min p-Nitrofenol liberado por el complejo enzimático

tiempo (min)	$\mu$ mol p-Nitrofenol
1	24.8835
2	25.2718

3	25.6002
4	26.2427
5	26.6311
6	27.0194
7	27.6019
8	27.8932
9	28.3785
10	28.7670

## DISCUSIÓN

El método en placa es ampliamente utilizado por la rapidez con la que se puede identificar la presencia de actividad lipolítica. Como resultado se observó que en el método en placa utilizando púrpura de bromocresol como indicador, a las 4 h presentó cambio de color de púrpura a amarillo debido a la alteración del pH del medio cuando ocurre la hidrólisis del sustrato tributirina, Fig. 1A. En el método donde rodamina B fue utilizado como indicador y aceite de oliva como sustratos, se observaron halos fluorescentes de color naranja en zonas donde ocurrió la liberación de ácidos grasos según lo describen Kouker y Jaeger [10] (Fig.1B), esto sugiere la posibilidad de que el complejo lipolítico sea capaz de actuar sobre ácidos grasos de cadena larga presentes en el aceite [12, 13]. Son diversos los métodos aplicados en el estudio de la actividad lipasa, incluso para determinar la especificidad por sustrato se han probado diferentes ésteres de p-Nitrofenol de cadena corta-media y larga; p-Nitrofenil acetato, p-Nitrofenil butirato, p-Nitrofenil r-iriprato, p-Nitrofenil laurato, p-Nitrofenil miristato y p-Nitrofenil palmitato [14]. Las lipasas son principalmente activas sobre sustratos insolubles en agua, tales como triglicéridos compuestos por ácidos grasos de cadena larga, mientras que las esterasas hidrolizan preferentemente ésteres simples y por lo general solo triglicéridos compuestos de ácidos grasos de cadena corta. Las lipasas se pueden distinguir de las esterasas por la gama de sustrato hacia la cual presentan especificidad, tal es el caso del uso de p-Nitrofenil palmitato (lipasas) frente a p-Nitrofenil butirato hidrolizado por esterasas, tal como lo menciona Bornscheuer [15]. En contraste, de acuerdo a los resultados obtenidos respecto a la capacidad del complejo lipolítico del látex de la jaca para hidrolizar triglicéridos presentes en el aceite de oliva, en conjunto con los resultados obtenidos en el método donde p-Nitrofenil palmitato fue utilizado como sustrato (Vo 2.87  $\mu\text{mol}/\text{mi}\cdot\text{min}$ ), conducen a la posibilidad de encontrarnos con una autentica lipasa (no solo actividad esterasa). En un estudio en donde se reporta una lipasa del latex de *Aroujio sericifera*, no se detectó actividad de hidrólisis cuando p-Nitrofenil palmitato fue utilizado como sustrato, no obstante, cuando se utilizaron otros ésteres de p-Nitrofenol de menor tamaño (número de carbonos) como el p-Nitrofenil butirato y p-Nitrofenil laurato se encontró actividad de hidrólisis, obtuvieron la mayor actividad con p-Nitrofenil butirato para lo cual describen que cuanto mayor sea el tamaño del éster, mayor será el impedimento estérico, es decir, habrá mayor dificultad para que el sitio activo de la lipasa tenga acceso al sustrato, según lo demuestra Di Santo [16]. Por otra parte, en otro estudio realizado reportan una lipasa de *Thermomyces ionuginosus* que mostró una velocidad inicial de hidrólisis de p-Nitrofenil palmitato mayor a 6  $\mu\text{mol}/\text{min}$  cuando una concentración de 0.1 mg de enzima comercial es utilizada [17]. En nuestro estudio se ha utilizado una concentración de 0.1 mg de enzima purificada a homogeneidad, por tanto la actividad estará dada por las condiciones de reacción, tipo de enzima que se utiliza y tipo de sustratos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Laboratorio de Análisis Especiales de la Unidad de Tecnología de Alimentos, por las facilidades proporcionadas para realizar los experimentos.

## REFERENCIAS

- [1] Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*. 19(8), 627-662.
- [2] Lehninger, A. L. (2009). *Principios de Bioquímica*. Barcelona, España. Omega. 1296 p.
- [3] Domínguez M. B., Tuin, G., Bargeman, A., Van Der M, R., Van G, J. (2006). *Biotechnol.* 126, 140-151.
- [4] Mogensen, J.E., Sehgal, P., Otzen, D.E. (2005). Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochemistry*. 44(5): 1719-1730.
- [5] Salihi, A., Alam, M. Z., Abdul Karim, M. I., Salleh, H. M. (2012). Characterization of *Candida cylindracea* lipase produced from palm oil mill effluent based medium ICB5. 2(2012):24-31
- [6] Prasad, K., Virupaksha, T. (1990). Purification and characterization of a protease from jackfruit latex. *Phytochem.* 29:1763-1766.
- [7] Siritapetawee, J., Thammasirirak, S., Samsornisuk, W. (2012). Antimicrobial activity of a 48-kDa protease (AMP48) from *Artocarpus heterophyllus* latex. *Eur. Rev. Med. 426 Pharmacol. Sci.* 16:132-137.
- [8] Martínez G, M. E., (2013). Identificación y caracterización de las proteínas con actividad de proteasa y lipasa del látex de Jaca (*Artocarpus Heterophyllus L.*) Tesis de Maestría en Ciencias Agrícolas, CBAP-UAN.
- [9] Bradford, 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.
- [10] Kouker, G. y Jaeger, K.( 1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and environmental microbiology*. 53(1), 211-213.
- [11] Winkler UK, Stuckmann M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 138:663-70.
- [12] Carissimi, M, Stopiglia, C, Souza, T, Corbellini, V, Scroferneker, M. (2007). Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil-rhodamine B and tween 80. *Tecno-Lógica*, 11, 33-36.
- [13] Samad, M, Razak, C, N, Salleh, A, Yunus, W, Ampon, K., Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*. 9(1), 51-56.

- [14] Bendikienė, V., Juodka, B., Surinėnaite, B., Dienys, G. (2008). Lipases in conversion of oils: Experimental screening of enzymes and substrates for biodiesel production. *biologija*, 4, 247-252.
- [15] Bornscheuer, U. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, n. 1, p. 73-81. PMID: 12007643
- [16] Di Santo, P., Fait, M.E., Foresti, M. L., Morcelle, S. R. (2014). Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in *Araujia sericifera* Brot.(Apocynaceae) latex. *Catalysis Science Technology*, 4(5), 1386-1394.
- [17] Cruz, B. R., Ríos, L. J., García, Y. G., Antonio, J., de la Garza, R., Rodríguez, J. (2011). Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase in PVA-alginate Beads. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55(3), 176-180.

ISBN: 978-607-719-005-9