

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	5
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. El fruto de <i>Vasconcella pubescens</i> como modelo de estudio.....	7
FIGURA N°1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA PAPAYA	8
FIGURA N°2. PLANTACIÓN DE PAPAYA <i>VASCONCELLEA PUBESCENS</i>	9
3.1.1. Propiedades de la papaya	9
3.1.2. Industrialización, Mercado nacional e internacional.....	11
3.2. Calidad de los frutos	12
3.2.1. Proceso de maduración de <i>V. pubscens</i>	13
FIGURA N° 4: ETAPAS DE MADURACIÓN DE PAPAYA <i>VASCONCELLEA</i> <i>PUBESCENS</i> , <i>DÍAS POST COSECHA</i>	14
3.2.2 Producción del aroma durante la maduración de <i>V. pubscens</i>	15
3.2.3. Biosíntesis de compuestos volátiles (ésteres): acción catalica de alcohol acil transferasa (VpAAT1).....	17
FIGURA N°5. FORMULA CATALITICA DE AAT CON SUS SUSTRATOS ACOCHOL Y ACIL-COAS.	17
3.2.4. Estudio estructural de la enzima Alcohol Acil Transferasa VpAAT1	18
FIGURA N° 6: ESTRUCTURA DE LA ENZIMA VPAAT1.....	18
3.3. Importancia del residuo D170 para la actividad de las enzimas AATs	19
4. HIPOTESIS.....	22
5. OBJETIVOS	23
5.1. Objetivo general.....	23
5.2. Objetivos específicos.	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1. Sobre-expresión, Extracción, purificación y análisis de la actividad de la proteína VpAAT1 nativa recombinante.	24
6.1.1. Sobre-expresión del gen <i>VpAAT1</i> recombinante.....	24
FIGURA 7. SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN <i>VpAAT1</i>	25

FIGURA 8. SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN VpAAT1. ETAPA DE INDUCCIÓN DE LA ENZIMA VpAAT1.	27
6.1.2. Extracción de la proteína VpAAT1 nativa recombinante.	27
6.1.3. Purificación de la proteína VpAAT1 recombinante.	28
FIGURA 9: PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA VpAAT1.	28
6.1.4. Ensayos de la actividad de la proteína VpAAT1 recombinante.	29
FIGURA N° 10: ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA VpAAT1.	29
6.2. Estudio de las propiedades cinéticas de la enzima VpAAT1 de <i>V. pubescens</i>	30
6.3. Mutagénesis sitio-dirigida del residuo D170 de la enzima VpAAT1	31
Tabla N° 2. Secuencia de los partidores utilizados para lograr la mutante VpAAT1D170E.	31
7. RESULTADOS.	34
7.1. Expresión heteróloga del gen <i>VpAAT1</i>	34
7.2. Extracción, purificación y análisis de la actividad de la proteína recombinante.	35
7.2.1. Extracción y purificación de la enzima VpAAT1.	35
FIGURA N° 12: EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA VpAAT1.	35
7.2.2. Ensayos de actividad <i>in vitro</i>	36
FIGURA N° 13. CROMATOGRAMA DE ENSAYO DE ACTIVIDAD DE VpAAT1 IN VITRO.	36
7.3. Estudio de las propiedades cinéticas de la enzima VpAAT1 de <i>V. pubescens</i>	37
7.4. Mutagénesis sitio-dirigida del residuo D170 de la enzima VpAAT1	38
FIGURA N° 14: CROMATOGRAMA DE ENSAYO DE ACTIVIDAD DE VpAAT1-D170E.	39
8. DISCUSION	40
9. CONCLUSIÓN.	45
10. BIBLIOGRAFÍA	46
11. ANEXOS.	49