
EXTRACCIÓN DE ENZIMAS PÉCTICAS DEL EPICARPIO DE LULO (*Solanum quitoense* Lam) INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE ABLANDAMIENTO

Extraction of Pectic Enzymes from of Lulo (*Solanum quitoense* Lam) Involved in Softening

JEIMMY MARCELA RODRÍGUEZ NIETO¹, M.Sc en Ciencias Química;
LUZ PATRICIA RESTREPO SÁNCHEZ¹, M.Sc.

¹ Departamento de Química, Sede Bogotá. Universidad Nacional de
Colombia. jmrodriguez@unal.edu.co lprestreposs@unal.edu.co
Grupo de investigación estudio de los cambios químicos y bioquímicos
de alimentos frescos y procesados.

Presentado 29 de octubre de 2008, aceptado 17 de febrero de 2009, correcciones 14 de febrero de 2011.

RESUMEN

Durante el periodo de poscosecha el principal problema de deterioro del lulo (*Solanum quitoense* Lam) es el ablandamiento que es generado principalmente por actividad de enzimas pécticas que atacan la red estructural de la pared celular. Esta investigación se basó en la búsqueda de las mejores condiciones de extracción y medida de actividad de las enzimas pectinesterasa, poligalacturonasa y pectato liasa; herramientas necesarias para estudiar posteriormente el rol de estas enzimas en el deterioro por ablandamiento sufrido por el fruto debido a diversos cambios metabólicos. Se encontró que las dos primeras enzimas pueden ser extraídas simultáneamente con *buffer* fosfatos 20 mM pH 7,0 + NaCl 0,06 M y 60 min de extracción, relación 1:2 (material vegetal: *buffer* de extracción), a su vez, pectato liasa se extrajo con *buffer* fosfatos 20 mM pH 7,0 + cisteína 20 mM y 30 min de extracción, relación 1:3. Para la cuantificación de la actividad pectinesterasa es necesario incubar 15 min a 42 °C 2.500 µL de extracto enzimático crudo (EE) en *buffer* fosfatos 20 mM pH 7,0 + NaCl 0,15 M y 1,6% de pectina cítrica como sustrato, con valores de K_m aparente de 3,78% de PC y V_{max} 17,95 µmolH⁺/min*mg prot. Para la cuantificación de la actividad poligalacturonasa es necesario incubar 15 min a 37 °C 30 µL (EE) en *buffer* acetatos 200 mM pH 4,5 + NaCl 0,25 M y 1,0% de APG como sustrato, con valores de K_m aparente 0,141% de APG y V_{max} 28,46 nKat/s*mg prot. Para la cuantificación de la actividad pectato liasa es necesario incubar 2 min a 17 °C 100 µL (EE) en *buffer* TRIS:HCl 50 Mm pH 8,5 + CaCl₂ 4 mM y 0,1% de APG como sustrato, con valores de K_m aparente 0,0865% de APG y V_{max} 82,75 g/s*mg prot.

Palabras clave: lulo (*Solanum quitoense* Lam), ablandamiento, pectinesterasa, poligalacturonasa, pectato liasa.

ABSTRACT

The main problem of post-harvest deterioration of lulo (*Solanum quitoense* Lam) is the softening is the main problem of post-harvest deterioration of Lulo, that is generated mainly by the activity of pectic enzymes, which attack the structural network of the cell wall. This research was based on finding the best conditions structural cell wall network for extraction and measurement of enzyme activity pectinesterase (PE), polygalacturonase (PG) and pectato liasa (PL); tools needed to study the further role of these enzymes in the deterioration of pectatelyase fruit softening, due to various metabolic changes.

It was found that the first two enzymes can be extracted simultaneously with 20 mM phosphate *buffer* pH 7.0, 0.06 M NaCl and 60 minutes of extraction, ratio 1:2 (plant material: extraction *buffer*), pectatelyase extracted with 20 mM phosphate *buffer* pH 7.0, 20 mM cysteine and 30 minutes of extraction, ratio 1:3. For quantification of pectinesterase activity is necessary to incubate 15 minutes at 42 ° C, 2500 µL of crude enzyme extract (EE) in 20 mM phosphate *buffer* pH 7.0, to 0.15 M NaCl and 1.6% citrus pectin as (CP) substrate with apparent K_m values of 3.78% CP and V_{max} 17.95 mol H^+ /min * mg prot. For the quantification of pectinesterase activity is necessary to incubate 15 minutes to 42 ° C 2500 µL of crude enzyme extract (EE) in 20 mM phosphate *buffer* pH 7.0, 0.15 M NaCl and 1.6% citrus pectin as substrate with apparent K_m values of 3.78% CP and 17.95 µ V_{max} mol H^+ /min*mg prot. For the quantification of polygalacturonase activity is necessary to incubate 15 minutes to 37 ° C 30 µL (EE) in 200 mM Acetate *buffer* pH 4.5, 0.25 M NaCl and 1.0% of APG as substrate, with apparent K_m values 0.141% of APG and V_{max} 28.46 nKat/s*mg prot. For the quantification of the pectatelyase activity is necessary to incubate 2 minutes to 17 ° C, 100 µL (EE) in *buffer* TRIS: HCl pH 8.5, 50 mM 4 mM $CaCl_2$ and 0.1% PGA as substrate, with apparent K_m values 0.0865% of APG and V_{max} 82.75 µg/s*mg prot.

Key words: Lulo (*Solanum quitoense* Lam), softening, pectinesterase, polygalacturonase, pectatelyase.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de lulo (*Solanum quitoense* Lam) representa 1,7% de la producción anual de frutas en Colombia. Por ser un fruto climatérico es recolectado al 40% de madurez sensorial o estado pintón; durante la poscosecha, cuando inicia el proceso de maduración, se presentan cambios producidos por enzimas pécticas que actúan sobre diferentes sustratos en el tejido vegetal, inicialmente en el epicarpio (corteza) y posteriormente en el mesocarpio (pulpa). Estas enzimas, en la etapa de la poscosecha cuando no se almacenan y transportan los frutos de lulo correctamente, hacen que estos pierdan sus características propias de turgencia, entrando prematuramente al periodo de senescencia y como resultado sean rechazados por el consumidor final.

Las enzimas pécticas responsables de la alteración fisiológica del tejido celular vegetal, que trae como consecuencia ablandamiento del fruto y pérdida de características fisicoquímicas y sensoriales, son pectinesterasa (PE) E.C. 3.1.1.11, poligalacturonasa (PG) E.C. 3.2.1.67 y pectato liasa (PL) E.C. 4.2.2.2 las que son de gran importancia porque hacen

parte de la estructura de la pared celular. La acción conjunta de estas enzimas en la maduración provoca que las pectinas se degraden y el fruto adquiera una textura más adecuada para el consumidor, por otra parte, excesiva actividad enzimática causa ablandamiento notorio, pérdida de textura y propicia condiciones ideales para ataque microbiano. El ablandamiento es controlado fisiológicamente por la planta si el fruto es no climatérico y por las condiciones de almacenamiento poscosecha si el fruto es climatérico.

Pectinesterasa (PE) es una enzima que al hidrolizar enlaces éster metílico de los grupos carboxilo esterificados, libera metanol (erróneamente asociado con la fermentación del fruto), y transforma la pectina en pectina de bajo metoxilo, e incluso ácido poligalacturónico, se encuentra ampliamente distribuida en plantas y microorganismos. PE se ha extraído y caracterizado como parte del comportamiento que se presenta en el complejo proceso de maduración de la fracción comestible de chalote (Wu *et al.*, 2004), pera (Zhou, 2000), arracacha (Pires *et al.*, 2005), tomate (Warrilow *et al.*, 1994), papa (Puri *et al.*, 1982), papaya (Fayyaz *et al.*, 1995), guayaba (Abu-bark *et al.*, 2003) y pitaya (Carabalí, 2005) encontrándose que si se logra controlar la acción enzimática se controlará el proceso de ablandamiento, y la comercialización de los frutos aumentaría su rentabilidad.

Poligalacturonasa (PG) es la enzima que rompe el enlace glicosídico $\alpha(1-4)$ del ácido galacturónico de pectinas; puede ser en el interior del polímero (endo), produciendo disminución rápida en la viscosidad, o en los extremos del polímero (exo) produciendo moléculas libres de ácido poligalacturónico; este tipo de enzimas se encuentran naturalmente en los frutos, son activas en presencia de Na^+ y algunas por Ca^{2+} . Se ha reportado a PG como responsable del ablandamiento en la maduración de frutos climatéricos y no climatéricos y se ha evidenciado que su control está directamente relacionado con alargamiento en el tiempo de vida de anaquel en frutos como pera (Pressey *et al.*, 1976), tomate (Tucker *et al.*, 1980, Goodenough *et al.*, 1982, Grierson *et al.*, 1983), fresa (Nogata *et al.*, 1993), guayaba (Abu-bark *et al.*, 2003), kiwi (Bonghi *et al.*, 1996), pimentón (Prya *et al.*, 1996), banana (Pathak *et al.*, 2000; Srivastava *et al.*, 2000), frutos silvestres de Zimbabwean (Muchuweti *et al.*, 2005), mango (Prasanna *et al.*, 2006), y también en arracacha (Pires *et al.*, 2005).

Pectato Liasa (PL) es la enzima que se encarga de romper enlaces glicosídicos próximos a un grupo metil éster; su acción produce dobles enlaces entre los carbonos 4 y 5 de la molécula de ácido D-galacturónico, como consecuencia se rompe el enlace glicosídico por β -eliminación, principalmente en las pectinas de alto metoxilo. PL se ha extraído en banana (Payasi *et al.*, 2003; Payasi *et al.*, 2006) y en fresa (Jiménez *et al.*, 2002; Sesmero *et al.*, 2007) en donde se demostró la disminución de la expresión de los genes de PL en plantas de fresa transgénicas, encontrando mejor retención y firmeza en frutos transformados. En otro estudio en frutos de fresa (revisado por González-Aguilar *et al.*, 2005), se aisló la secuencia de cADN de alta homología con genes de PL que se expresaron durante la maduración de la fruta, (especialmente cuando esta cambió su color blanco a rojo) y se encontró que estos genes no se expresaron en otras partes de la planta, los investigadores proponen que la expresión de este gen podría estar relacionada con la degradación de la pared celular, contribuyendo al ablandamiento de los frutos.

En el presente estudio se pusieron a punto los métodos de extracción y medida de actividad de las enzimas pécticas del epicarpio del lulo con el fin de iniciar la caracterización de dichas enzimas y determinar en estudios posteriores su efecto en el deterioro metabólico durante el proceso de la poscosecha del fruto.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se emplearon lulos provenientes de Campohermoso (Boyacá, Colombia), ubicado a 1.300 msnm, temperatura promedio de 21 °C, maduros sensorialmente (100% amarillos en la corteza según NTC 5093) sin pardeamiento, olores extraños y sin defectos producidos por daño mecánico como golpes o magulladuras. Los frutos fueron lavados con agua para retirar vellosidades, desinfectados por inmersión en hipoclorito de sodio 100 ppm durante cinco minutos, enjuagados con abundante agua y finalmente secados con un paño de tela limpio. El epicarpio del fruto se separó mecánicamente, liberando la mayor cantidad de corteza la que posteriormente fue macerada con nitrógeno líquido hasta obtener una muestra homogénea en tamaño. Se realizó el método de polvos de acetona (Cortés, 2005), para interferentes como clorofilas o carotenos, a cada gramo de muestra macerada fueron adicionados 3 mL de acetona a 4 °C, luego se agitó en *vortex* a 2.600 rpm durante 30 seg, y finalmente una centrifugación a 9.907 gravedades durante 10 min a 4 °C, el procedimiento se realizó tres veces descartando cada vez el sobrenadante.

EXTRACCIÓN

Una vez obtenidos los polvos de acetona el precipitado fue resuspendido en *buffer* de extracción enfriado a 4 °C, las extracciones se realizaron en agitador recíprocante a 180 rpm y 4 °C, finalizado el tiempo de extracción se centrifugó a 9.907 gravedades y 4 °C durante 20 min, el sobrenadante se transformó en el extracto enzimático crudo y fue empleado para realizar las determinaciones de actividad y cuantificación de proteína en cada una de las enzimas de estudio.

PARÁMETROS EVALUADOS EN LA EXTRACCIÓN Y MEDIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Sabiendo que las enzimas de ablandamiento tienen su actividad en la pared celular, por medio de un diseño escalonado multivariable, en donde el *buffer* de extracción y la concentración de este se mantuvieron constantes, se evaluó para PG, PE y PL el efecto de los parámetros presentados en las tablas 1, 2 y 3 sobre la eficiencia de la extracción y la medida de actividad enzimática. El primer parámetro evaluado fue el efecto de la presencia de aditivo sobre el *buffer* de extracción; se determinó el efecto de la fuerza iónica generado por el cloruro de sodio y el efecto detergente generado por Tritón® X-100 sobre la eficiencia de la extracción de las enzimas PE y PG, el efecto del poder reductor de la cisteína y la combinación del efecto reductor de cisteína y la acción detergente de Tritón® X-100 en la extracción de la enzima PL. Una vez evaluado el efecto de los aditivos sobre la eficiencia del proceso de extracción, se determinó el tiempo necesario para extraer la enzima con mayor actividad.

Obtenidas las cuantificaciones de mayor eficiencia en cantidad de extracto enzimático, se determinaron los mejores parámetros que permiten obtener la óptima medida de actividad, como se muestra en la segunda parte de las tablas 1, 2 y 3. Los parámetros que se evaluaron fueron: concentración de cofactor (NaCl para PG y PE y CaCl₂ para PL) necesario para que la enzima actúe totalmente, tiempo de incubación, temperatura de incubación a la cual la enzima presenta actividad máxima, pH óptimo para actividad

de la enzima, cantidad de extracto enzimático que puede degradar completamente el sustrato y cantidad de sustrato necesaria para que la enzima alcance su velocidad máxima, que a su vez permitió evaluar el comportamiento cinético de la enzima y la afinidad enzima-sustrato.

	Parámetro	PG	Valores evaluados
Extracción	Buffer	Fosfatos 20 mM pH 7,0	
	Aditivo	NaCl y Triton X-100	NaCl 0,0, 0,06 y 0,12 M y Triton® X-100 0,01, 0,02 y 0,06%
Medida de actividad	Tiempo de extracción	1-24 horas	0,5, 1, 3, 6, 12 y 24 h
	Tiempo de incubación	2-75 min	2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 30, 45, 60 y 75 min
	Concentración de cofactor	NaCl 0,0 - 0,420 M	0,0, 0,098, 0,174, 0,250, 0,326 y 0,420 M
	Temperatura de incubación	20-70 °C	20, 30, 37, 42, 50, 60 y 70 °C
	Cantidad de extracto enzimático	15-60 µL	15, 20, 30, 40 y 60 µL
	pH del buffer	3,0-6,0	3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0
	Concentración de sustrato	0,1- 2,25 % APG	0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00, 2,25, %APG

Tabla 1. Parámetros evaluados en la extracción y medida de actividad de poligalacturonasa de pericarpio de lulo (*Solanum quitoense* Lam) maduro.

	Parámetro	PE	Valores evaluados
Extracción	Buffer	Fosfatos 20 mM pH 7,0	
	Aditivo	NaCl y Triton X-100	NaCl 0,0, 0,06 y 0,12M y Triton® X- 100 0,01, 0,02 y 0,06 %
Medida de actividad	Tiempo de extracción	1-24 horas	0,5, 1, 3, 6, 12 y 24 h
	Tiempo de incubación	5-30 min	5, 10, 15, 20, 25 y 30 min
	Concentración de cofactor	NaCl 0,05 - 0,55 M	0,050, 0,150, 0,250, 0,350, 0,450 y 0,550 M
	Temperatura de incubación	20-80 °C	20, 30, 37, 42, 50, 60, 70 y 80 °C
	Cantidad de extracto enzimático	500-5000 µ L	500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 y 5000 L
	pH del buffer	5.5 - 8.5	5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 y 8,5
	Concentración de sustrato	0,20 - 1,80% Pectina cítrica	0,20, 0,40, 0,60, 0,80, 1,00, 1,20, 1,40, 1,60, 1,80 % PC

Tabla 2. Parámetros evaluados en la extracción y medida de actividad de pectinesterasa del pericarpio del lulo (*Solanum quitoense* Lam) maduro.

	Parámetro	PL	Valores evaluados
Extracción	Buffer	Fosfatos 20 mM pH 7,0	
	Epicarpio: buffer	1g : 10 mL	1:2, 1:3, 1:5 y 1g:10 mL
	Aditivo	Cisteína 20 mM y cisteína 20 mM + Triton X-100%	Cisteína 20 mM y cisteína 20 mM + Triton® X-100 0,05 y 0,10%
Medida de actividad	Tiempo de extracción	1-60 min	1, 5, 15, 30, 45 y 60 min
	Tiempo de incubación	0,5-5 min	0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 min
	Concentración de cofactor	CaCl ₂ 1,00 - 25,0 mM	1,00, 4,00, 5,00, 6,00, 7,00, 8,00, 10,00, 15,00, 20,00, y 25,00 mM
	Temperatura de incubación	10-60 °C	10, 17, 20, 30, 40, 50 y 60 °C
	Cantidad de extracto enzimático	25-150 µL	25, 50, 75, 100, 125 y 150 µL
	pH del buffer	6,0-9,0	6,0, 7,5, 8,0, 8,5, y 9,0
	Concentración de sustrato	0,0100 - 2,00% APG	0,0100, 0,0500, 0,0700, 0,100, 0,130, 0,150, 0,200 % APG

Tabla 3. Parámetros evaluados en la extracción y medida de actividad de pectato liasa del pericarpio de lulo (*Solanum quitoense* Lam) maduro.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

En cada uno de los extractos enzimáticos obtenidos se cuantificó proteína por el método de Bradford según Zor y Sellinger, 1996, leyendo absorbancia a 450 y 590 nm, empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La medida de actividad PG fue determinada por medida espectrofotométrica a 500 nm de los azúcares reductores generados tras la acción de la enzima sobre el sustrato ácido poligalacturónico (APG) por el método de (Nelson y Somogyi, 1944). Una unidad de actividad de poligalacturonasa (UPG) fue definida como nmol de azúcares reductores generados/segundo* mg proteína (nanoKatal/s; Abu-Bark *et al.*, 2003; Muchuweti *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2005; Rodríguez, 2005; Prasanna *et al.*, 2006)

La medida de actividad PE se realizó por medio de una valoración ácido base, del grupo carboxilo y los protones generados tras la acción enzimática, por medio de titulación con hidróxido de sodio 0,0200 M, hasta pH 7,0, empleando como sustrato pectina cítrica 7,1% de metoxilo (Sigma®). Una unidad de actividad de PE (UPE) fue definida como moles de protones generados/minuto* mg de proteína (Fayyaz *et al.*, 1994; Carabalí 2005).

La medida de actividad PL se evaluó a través de los productos de hidrólisis del ácido poligalacturónico (APG), por lectura directa, cuantificando galacturonido insaturado en los carbonos 4 y 5 que absorbe a 232 µnm, empleando como coeficiente de absorptividad molar 5.200 (Pissavin *et al.*, 1998; Steven *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2002; Payasi *et al.*, 2003; Payasi *et al.*, 2006). Una unidad de actividad pectato liasa (UPL) fue definida como µg de ácido poligalacturónico insaturado/segundo* mg de proteína.

En los estudios de extracción y medida de actividad de las tres enzimas PG, PE y PL las determinaciones se realizaron por triplicado. El comportamiento cinético de las enzimas fue evaluado mediante la ecuación de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes-Woolf del modelo cinético de Michaelis-Menten.

ANÁLISIS DE DATOS

Las cuantificaciones de actividad enzimática y de contenido de proteína de cada una de las enzimas de estudio fueron determinadas por triplicado, se empleó el promedio como medida de centralización y la desviación estándar como medida de dispersión. Se aplicó análisis de varianza de un factor (ANOVA) con nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para la determinación de diferencias significativas entre los valores de cada uno de los parámetros de extracción y medida de actividad de las enzimas. Para evaluar las diferencias específicas entre los valores de cada uno los parámetros de extracción y medida de actividad de las enzimas se usó la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de K_m y V_{max} fueron calculados mediante los métodos gráficos conocidos; Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk y Eadie-Hofstee, cada uno de estos se realizó por triplicado y el valor reportado, en cada caso, es el promedio.

MÉTODO DE POLVOS DE ACETONA

El método de polvos de acetona demostró ser un paso importante y significativo en la extracción de las proteínas procedentes de epicarpio de lulo (*Solanum quitoense* Lam), al mismo tiempo, resultó ser efectivo en la eliminación de compuestos interferentes, como fenoles y clorofilas que podrían afectar las cuantificaciones espectrofotométricas de la actividad enzimática PG y PL.

PARÁMETROS EVALUADOS EN LA EXTRACCIÓN

Al evaluar el tipo de aditivo de extracción se encontró que al emplear NaCl se obtenía una mayor eficiencia en la extracción de PG y PE lo que indica que, las enzimas se encuentran unidas a la pared celular de forma iónica y NaCl es un aditivo que permite la extracción para proteínas con interacciones electrostáticas por competencia con las mismas. Se encontró que el empleo de Na^+ como aditivo de extracción para PE en epicarpio de lulo concuerda con las investigaciones en otros frutos tropicales climatéricos como las realizadas por Carabalí, 2005, en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), Fayyaz *et al.*, 1995 en papaya (*Carica papaya* L.var.exotica) y Warrilow *et al.*, 1994, en tomate variedad Ailsa Craig. Los resultados obtenidos con Na^+ y la concentración de este, como aditivo de extracción de PG, encontrados en este trabajo coinciden con los resultados de Rodríguez, 2005, en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) y los de Muchuweti *et al.*, 2005, en cuatro diferentes frutos silvestres de simbabwean (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus indica* y *Berchemia discolor* fruits), así como los reportados por Pathak *et al.*, 2000, en banana, Abu-bark A *et al.*, 2003, en guayaba (*Psidium guajava* L.) en donde se establece como necesaria la presencia de Na^+ en el *buffer* de extracción para obtener mayor

eficiencia; en este último trabajo se logra extraer PE y PG de forma simultánea al igual que en la presente investigación.

Por otra parte, en la extracción de PL se evaluaron dos condiciones de aditivo de extracción cisteína y cisteína + Tritón®X-100, y se encontró que la extracción de la enzima fue más eficiente cuando se empleó cisteína sola, posiblemente porque el poder reductor de ésta estabiliza puentes disulfuro del sitio activo de la enzima, a su vez la enzima es desnaturalizada por acción de Tritón®X-100.

Los resultados obtenidos al emplear cisteína en la extracción de PL de epicarpio de lulo concuerda con el trabajo de Payasi *et al.*, 2006, en frutos de banano (*Musa acuminata*). Es importante aclarar que para que la extracción se lleve a cabo de manera exitosa el *buffer* debe prepararse inmediatamente antes de ser usado.

Se comprobó que el tiempo necesario para extraer, de epicarpio del lulo (*Solanum quitoense* Lam) las enzimas PG y PE es 60 min, el mismo empleado para extraer PE en los trabajos de Assis *et al.*, 2002, en frutos de acerola (*Malpighia glabra* L.), Wegrzyn *et al.*, 1992, en kiwi (*Actinidia deliciosa*), Javeri *et al.*, 1991, en durazno, D'Innocenzo *et al.*, 2001, en papaya. Por otro lado, el tiempo hallado para extraer PL es de 30 min, al emplear mayores tiempos de extracción la actividad decae posiblemente por desnaturalización.

El pH del *buffer* de extracción empleado en este trabajo (7,00) es el mismo encontrado para extraer PG y PE en las investigaciones de Pathak *et al.*, 2000 en banano, Ocampo *et al.*, 2003, en zapote (*Pouteria sapota*) y en el trabajo de Körner *et al.*, 1980 para extraer PE de naranja. Se encontró en este trabajo que el mismo valor de pH en el *buffer* para la extracción PL.

PARÁMETROS EVALUADOS EN LA MEDIDA DE ACTIVIDAD

Para buscar las mejores condiciones de medida de actividad en las enzimas PG y PE se empleó como cofactor Na^+ y se encontró que es necesario emplearlo en concentración de 0,25 M para PG y para PE de 0,1 5M de NaCl, así mismo, se evaluó el Ca^{++} como cofactor para PL y se encontró que es preciso emplearlo en concentración de 4 mM de CaCl_2 . Se puede sugerir que estas concentraciones son necesarias para que la enzima alcance su máxima velocidad, probablemente, por saturación con el cofactor.

Se encontró que el empleo de Na^+ como cofactor para mejorar la eficiencia en la medida de actividad PE, en epicarpio de lulo, concuerda con la investigación de Carabali, 2005, en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) en donde la concentración óptima de cofactor es la misma que la encontrada en este trabajo; y en otras como las realizadas por Fayyaz *et al.*, 1995, en papaya (*Carica papaya* L. var. exotica) y por Warrilow *et al.*, 1994, en tomate variedad Ailsa Craig, en donde se observa que la presencia de Na^+ afecta de forma significativa la cuantificación de la actividad PE.

En este trabajo el comportamiento de los resultados sobre la actividad PG es similar al encontrado por Muchuweti *et al.*, 2005, en cuatro frutos silvestres diferentes de Simbabwean (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus indica* y *Berchemia discolor* fruits) y en el trabajo de Pathak *et al.*, 1998, en las isoformas de PG en banano; en las dos investigaciones se observa como se produce un efecto favorable por la sal monovalente sobre la actividad PG; sin embargo, los resultados de la aplicación de NaCl como cofactor en frutos de lulo difieren de los presentados en el trabajo de Rodríguez, 2005, en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) porque en este, la variación en la concentración

de Na⁺ como cofactor no demuestra que afecte de forma significativa el valor de actividad enzimática PG.

Los resultados obtenidos al usar Ca²⁺ como cofactor en la medida de actividad PL de lulo son similares a los reportados en los trabajos de Payasi *et al.*, 2006, en frutos de banano (*Musa acuminata*), Jiménez *et al.*, 2002, en fresa, y, Pissavinn *et al.*, 1998, demostrando que la presencia del cofactor es determinante en la medida de actividad PL, pues sin este es posible que no haya activación de la enzima; sin embargo, la concentración de cofactor depende del tipo de fruto.

En todas las enzimas evaluadas es posible que la presencia del cofactor induzca a la enzima a una conformación espacial para que la unión con el sustrato sea efectiva, por otro lado, es posible que un exceso en la concentración de cofactor tenga un efecto inhibitorio en dicha unión.

El tiempo de incubación óptimo hallado para PG y PE fue 15 min; que es la mitad del empleado por Muchuweti *et al.*, 2005 en cuatro frutos silvestres diferentes de simbabwean, para cuantificar la actividad PG, la misma observación es válida en la investigación de Abu-bark A *et al.*, 2003, en guayaba (*Psidium guajava* L.); por otro lado, la actividad PL se evaluó en 2 min. Al evaluar la actividad después del tiempo óptimo de incubación se encontró que la actividad enzimática disminuyó debido, posiblemente, a que al aumentar el tiempo se favoreció la inactivación de la enzima; ya sea por la poca estabilidad térmica o por la generación de productos que inhiben la acción enzimática.

La temperatura de incubación encontrada para lograr la mayor eficiencia en la medida de actividad PG extraída de epicarpio del lulo (*Solanum quitoense* Lam) fue 37 °C, que es la misma reportada por Muchuweti *et al.*, 2005, en cuatro frutos silvestres diferentes de simbabwean (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus indica* y *Berchemia discolor* fruits), y por Abu-bark A *et al.*, 2003, en guayaba (*Psidium guajava* L.).

Los pH óptimos encontrados para las enzimas de estudio fueron para PE 7,0, el mismo hallado por Abu-bark A *et al.*, 2003, en guayaba (*Psidium guajava* L.); para PG 4,5, que coincide con reportes previos realizados por Muchuweti *et al.*, 2005, en cuatro frutos silvestres diferentes de simbabwean (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus indica* y *Berchemia discolor* fruits), en donde la actividad PG se encuentra entre 4 y 4,5 para los frutos evaluados; y para PL el pH fue 8,5 el cual fue el mismo obtenido por Payasi *et al.*, 2006, en frutos de banano (*Musa acuminata*), y por Pissavin *et al.*, 1998, en estudios realizados sobre las isoformas de PL en enterobacteria *E. chrysanthemi*. En los demás valores de pH evaluados para las enzimas de estudio, la actividad no se favorece probablemente por la modificación del sitio activo.

Los valores encontrados para KM fueron; 1,41 mg/mL APG para PG, 37,8 mg/mL pectina cítrica para PE y 0,0865 mg/mL de APG para PL; lo que indica que, en las enzimas extraídas de epicarpio de lulo (*Solanum quitoense* Lam), el orden de afinidad por el sustrato es PL > PG > PE.

Los resultados expuestos por Rodríguez, 2005, en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) son KM 2,9 mg/mL y V_{max} 0,076 nmol/s, que en comparación con PG de lulo KM = 1,41 mg/mL y V_{max} 0,745 nmol/s, la PG en pitaya tiene aproximadamente la mitad de la afinidad por APG, esto también se ve reflejado en la velocidad, puesto que es 10 veces menor que la de lulo; en otra investigación en frutos de durazno se reporta KM = 0,12% APG y V_{max} = 31,4 nKat/s, se podría decir que en ambos frutos la afinidad enzima

sustrato es prácticamente la misma. En cuanto PE, encontramos que Fayyaz *et al.*, 1995 en papaya (*Carica papaya* L.) reportan para PE KM = 0,22mg/mL y $V_{max} = 730 \text{ mol/min} \cdot \text{mg}$. Estas características cinéticas aparentes permitirían explicar porqué lulo presenta un deterioro alto por ablandamiento.

En esta investigación se logró extraer y medir la actividad enzimática PG, PE y PL de manera exitosa, lo que proporciona los cimientos para poder estudiar cual será el comportamiento de este tipo de enzimas durante el proceso de la maduración de los frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam) bajo diferentes tipos de almacenamiento, y de esta forma contribuir con un tratamiento poscosecha en donde la expresión de las enzimas pueda ser controlada.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo económico brindado a través de la DIB para el desarrollo de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

ABU-BARK A, ABU-GOUKH T, BASHIR-HIND A. Changes In Pectin Enzymes And Cellulose Activity During Guava Fruit Ripening. *Food Chem.* 2003;(83):213-218.

ASSIS S, MARTINS A, GUAGLIANONI D, FARIA DE OLIVEIRA. Partial Purification And Characterization Of Pectin Methylsterase From Acerola (*Malpighia glabra* L.). *Agr Food Chem* 2002;(50):4103-4107.

BONGHI C, PAGNI S, VIDRIH R, RAMINA A, TONUTTI P. Cell Wall Hydrolases And Amylase In Kiwi Fruit Softening. *Postharvest Biol Tec* 1996;(9):19-29.

CARABALÍ I. Extracción y medida de actividad de pectin metilesterasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), enzima relacionada con el ablandamiento [trabajo de grado Química]. Bogotá: Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2005.

CORTÉS R. Efecto del choque térmico y la refrigeración sobre algunos indicadores de actividad antioxidante en Lulo *Solanum quitoense* Lam [tesis de Maestría en Ciencias Química]. Bogotá: Departamento de Química Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2005.

D'INNOCENZO M, LAJOLO F. Effect Of Gamma Irradiation On Softening Changes And Enzyme Activities During Ripening Of Papaya Fruit. *J Food Biochem.* 2001;(25):425-438.

FAYYAZ A, SABIH B, GHAZALI H, CHE MAN Y, JINAP S. Stability Studies Of Papaya Pectinesterasa. *Food Chem.* 1995;(53):391-396.

GONZÁLEZ-AGUILAR G, GARDEA A, CUAMEA-NAVARRO F. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. CIAD, A.C. Sonora México; 2005. p. 198-214.

GOODENOUGH P. Changes In Color, Polygalacturonase Monosaccharides And Organic Acids During Storage Of Tomatoes. *Phytochemistry.* 1982;(21):281-184.

GRIERSON D. TUCKER A. Timing Of Ethylene And Polygalacturonase Synthesis In Relation To The Control Of Tomato Fruit Ripening. *Planta.* 1983;(157):174-179.

-
- JAVERI H, WICKER L. Partial Purification And Characterization Of Peach Pectinesterase. *J Food Biochem.* 1991;(15):241-252.
- JIMÉNEZ S, REDONDO J, MUNOZ J, CABALLERO J. Manipulation Of Strawberry Fruit Softening By Antisense Expression Of A Pectate Lyase Gene. *Plant Physiol.* 2002;(128):751-759.
- KÖRNER B, ZIMMERMANN G, BERK K. Orange Pectinesterase: Purification, Properties And Effect On Cloud Stability. *J Food Sci.* 1980;(45):1203-1206.
- MUCHUWETI M, MOYO E, MUSHIPE S. Some Properties Of The Polygalacturonase From Four Zimbabwean Wild Fruits (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus indica* and *Berchemia discolor* fruits). *Food Chem.* 2005;(90):655-661.
- NELSON N. A Photometric Adaptation Of The Somogyi Method For Determination Of Glucose. *J Biol Chem.* 1944;(153):378-380.
- NOGATA Y, OHTA H, VORAGEN A. Polygalacturonase In Strawberry Fruit. *Phytochemistry.* 1993;(34):617-620.
- NTC 5093 - Frutas frescas. Lulo de Castilla. Especificaciones. Fecha de ratificación 30 de octubre 2002.
- OCAMPO M, LOZANO S, ERRASQUIN R, APARICIO A, ORTÍZ G. Softening And Biochemical Changes Of Sapote Mamey Fruit (*Pouteria sapota*) At Different Development And Ripening Stages. *J Food Biochem.* 2003;(27):91-107.
- PATHAK N, SANWAL G. Multiple Forms Of Poligalacturonase From Banana Fruit. *Phytochemistry.* 1998;(48):249-255.
- PATHAK N, MISHRA S, SANWAL G. Purification And Characterization Of Poligalacturonase From Banana Fruit. *Phytochemistry.* 2000;(54):147-152.
- PAYASI A, SANWAL G. Pectate Lyase Activity During Ripening Of Banana Fruit. *Phytochemistry.* 2003;(63):243-248.
- PAYASI A, MISRA P, SANWAL G. Purification And Characterization Of Pectate Lyase From Banana (*Musa acuminata*) Fruits. *Phytochemistry.* 2006;(67):861-869.
- PIRES R, FINARDI-FILHO F. Extraction And Assay Of Pectin Enzymes From Peruvian Carrot (*Arracacia xanthorrhiza* B.). *Food Chem.* 2005;(89):85-92.
- PISSAVINN C, ROBERT-BAUDOY J, COTTE- PATTAT N. Biochemical Characterization Of The Pectate Lyase From *Erwinia Chrysanthemi* 3937. *Biochim Biophys Acta.* 1998;(1383):188-196
- PRASANNA V, PRABHA T, THARAHATHAN R. Multiple Forms Of Polygalacturonase From Mango (*Mangifera indica* l. cv Alphonso) Fruit. *Food Chem.* 2006;(95):30-36.
- PRESSEY R, AVANT J. Pear Poligalacturonase. *Phytochemistry.* 1976;(15):1349-1351.
- PRIYA S, PRABHA T, THARANATHAN R. Post-Harvest Biochemical Changes Associated With The Softening Phenomenon in *Capsicum annum* Fruits. *Phytochemistry.* 1996;(42):961-966.
- PURI A, SOLOMOST, KRAMER A. Partial Purification And Characterization Of Potato Pectinesterase. *Food Chem.* 1982;(8):203-213.
- RODRÍGUEZ J. Estudio la actividad enzimática de poligalacturonasa en la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) [trabajo de grado en Química]. Bogotá: Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2005.

SESMERO R, QUESADA J, MERCADO J. Antisense Inhibition Of Pectate Lyase Gene Expression In Strawberry Fruit: Characteristics Of Fruits Processed Into Jam. J Food Eng. 2007;(79):194-199.

STEVEN R, HERRON J, BENEN R, JAAP V, FRANCES J. Structure And Function Of Pectic Enzymes. Virulence Factors Of Plant Pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(16):8762-8769.

SRIVASTAVA K, MANOJ K, UPENDRA N. Delayed Ripening Of Banana Fruit Salicylic Acid. Plant Sci. 2000;(158):87-96.

TUCKER G, ROBERTSON N, GRIERSON D. Changes In Poligalacturonase Isoenzymes During The Ripening Of Normal And Mutant Tomato Fruit. Eur J Biochem. 1980;(112):119-124.

WARRILOW A, JONES M. Different Forms Of Tomato Pectinesterase Have Different Kinetic Properties. Phytochemistry. 1994;(39):277-282.

WEGRZYN TF, MACRAE E. Pectinesterase, Polygalacturonase And B-Galactosidase During Softening Of Ethylene-Treated Kiwifruit. HortScience. 1992;27(8):900-902.

WU M, CHEN Y, HWANG J. Transacylation Of Citrus Pectin As Catalyzed By Pectinesterase From Tendril Shoots Of Chayote (*Sechium edule S*). Food Res Int. 2004;(37):759-765.

ZHOU H. Pectinesterase, Polygalacturonase And Gel Formation In Peach Pectin Fractions. Phytochemistry. 2000;(55):191-195.

ZOR T, SELLINGER Z. Linearization Of The Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical And Experimental Studie. Anal Biochem. 1996;(236):302-308.

ANEXO

http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.67

http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=4.2.2.2