

INTRODUCCIÓN

El níspero (*Manilkara zapota*) es un fruto muy apetecido por su aroma y agradable sabor, siendo muy utilizado para la elaboración de jugos, merengadas y jaleas. En Venezuela la producción del níspero está limitada a pequeños y medianos productores con valores de rendimiento registrados para el año 1988 de 2035 Kg/ha y una superficie de siembra de 2037 ha (MAC, 2000). Tales valores no han variado mucho en el transcurso de los años, la causa que más ha afectado la falta de incremento de la producción y la oferta de este rubro en el mercado es su acelerado proceso de maduración y el inadecuado manejo postcosecha.

El níspero, de acuerdo a su fisiología es un fruto catalogado como altamente climatérico, es decir, que al alcanzar la madurez fisiológica se incrementa rápidamente su tasa respiratoria, aumentando la degradación de sustancias (almidón, fructosa, carbohidratos de la pared y pigmentos) y, por ende, la sobremaduración y descomposición, que ocurren a los pocos días de la cosecha. Esto se ha convertido en una limitante para la comercialización del fruto, tanto para consumo fresco como industrial, ya que es poca la durabilidad del fruto bajo condiciones de almacenamiento, ocasionando grandes pérdidas y haciendo poco rentable el cultivo del níspero (Laborem y col., 1981).

Uno de los parámetros de calidad comercial considerado, tanto en frutos como en hortalizas, es su firmeza o consistencia. De acuerdo al rubro, variedad o especie que se esté comercializando, se tienen escalas, ya sean cualitativas o cuantitativas, para evaluar la calidad en la firmeza y, sobre la base de esta evaluación, se fijan los precios. Además, la firmeza del fruto es un atributo importante que determina su almacenamiento y vida útil post cosecha (Gil y Velaverde, 1980).

El proceso de maduración de los frutos es catalizado por diferentes enzimas. Las enzimas son moléculas proteicas que actúan como catalizadores en determinadas reacciones químicas. Ciertas enzimas existen bajo formas moleculares ligeramente distintas, es decir, existen variantes de una misma enzima que realizan la misma acción catalítica, pero presentan diferentes formas moleculares. A estas se les denominan isoenzimas (Herrera, 1996; Junqueira y Carneiro, 1997).

En un estudio realizado en frutos de níspero de la variedad prolifera, Bedoya (2002) purificó parcialmente la PME y determinó que la actividad de la enzima es muy alta en el estado de madurez fisiológica, constituyéndose ésta en un índice bioquímico para ese estado de desarrollo. Además, se evidenció la presencia de dos isoenzimas de la PME altamente termorresistentes, manteniendo entre un 77 y un 98 % de la actividad a 90 y 100 °C respectivamente, dicho estudio es la base de esta investigación para comprobar la presencia de estas isoenzimas y además realizar la purificación y la caracterización cinética de dichas las mismas.

El comportamiento de la PME y de sus isoenzimas es diferencial, dependiendo de la especie y/o variedad que se trate. Este estudio representa un aporte al conocimiento agrícola, especialmente a la fisiología y manejo postcosecha de frutos ya que permite diseñar, manipular y mejorar las condiciones de cosecha y de almacenamiento, lo cual permite controlar la acción, en forma directa o indirecta, de la PME; en el campo industrial ha sido de gran ayuda para estabilizar y clarificar bebidas, para gelificar mermeladas y jaleas (Cabrera, 1995) y otras aplicaciones que se han logrado, principalmente, gracias a los avances en el análisis del comportamiento de la PME, así como de sus sustratos de naturaleza péctica (Cabrera y col., 1995). Adicionalmente los nuevos avances científico-tecnológicos permiten utilizar éstos conocimientos para las aplicaciones biotecnológicas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar las isoenzimas de la PME en frutos de níspero (*Manilkara zapota* var. prolifíc)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar un protocolo eficiente para la extracción de las isoenzimas de la PME, a partir de frutos de níspero.
- Establecer un protocolo de purificación de las isoenzimas de la PME a partir de extractos proteicos de frutos.
- Caracterizar, molecular y cinéticamente, las isoenzimas de la PME.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DEL NISPERO

1.1. Taxonomía

El nombre vulgar en inglés, Sapodilla, es un derivado del nombre español Zapotillo. El níspero también llamado en otras regiones chico, chicozapote, níspero o chiku (Ruehle, 1987; Samson, 1991) pertenece a la Familia Sapotaceae, la cual se caracteriza por la presencia de látex en todas las partes vegetativas y aún en los frutos antes de madurar (Leal y Grazia, 1986). Pertenece al Orden Ebenales, y su Nombre Científico es *Manilkara zapota* var. Prolific.

1.2. Características Botánicas de la variedad prolífic

Es un árbol de tamaño variable, de 5 a 20 metros de altura. La floración ocurre en diferentes épocas, por lo general aparecen poco a poco durante un largo período, lo que da como resultado que hay producción durante casi todo el año, con los mayores índices entre Mayo y Septiembre. El nombre de la variedad se debe a sus altos índices de rendimiento, siendo ésta considerada como la mejor variedad para siembras comerciales (Ruehle, 1987).

El fruto es una baya, de pulpa jugosa y dulce, amarillenta o café rojiza de aroma muy agradable (Rivas y De Martos, 1979). Estos frutos se caracterizan por ser de forma esférica u ovoide, con un peso promedio entre 100 y 120 g, ocupando el tercer lugar en peso dentro de todas las variedades existentes; la pulpa es de color marrón claro sin ningún tipo de matiz. Al comparar la dulzura de la pulpa con el resto de las variedades se dice que es de dulzor intermedio. En cuanto a la producción

en Kg/planta ocupa el tercer lugar en rendimiento anual entre las variedades de níspero (Figuroa, 1978; Laborem y col, 1981).

1.3. Origen y Distribución

Esta especie es nativa de América tropical; se le considera originaria de México (Hoyos, 1994; Avilán y col., 1980; Berlijn y Van Haeff, 1994). Se ha extendido desde los trópicos americanos hasta África y Oceanía. Los árboles de Níspero de la variedad Prolific utilizados en este trabajo experimental son originarios de los Estados Unidos (Estación Experimental Subtropical de la Universidad de la Florida, Homestead) y fueron introducidos al país por Freddy Leal Pinto a principios de los años 60 (Figuroa, 1978).

1.4. Características del Desarrollo de Frutos de Níspero

En un estudio realizado por Bedoya (2009) se determinó el proceso del desarrollo de los frutos de níspero. Se detectó una primera fase (FASE I) en la que ocurre la formación de las yemas florales (YF), esta fase dura aproximadamente entre 16 y 20 días, desde el inicio de la diferenciación de la yema floral hasta antes de la antesis.

Una característica muy importante durante la formación de la yema floral es la exserción del estilo, lo cual es un indicativo de que la flor ya está completamente desarrollada y que ocurrirá la antesis en las siguientes 24 horas (Figuras 1B y 1C). Durante la formación de la yema floral predomina el crecimiento en longitud sobre el crecimiento a lo ancho lo cual determina que la forma sea elipsoidal (Ver Figura 1 A).

La antesis ocurre entre los días 21 y 23, manteniéndose la flor en antesis hasta 10 días después (días después de la antesis=dda), durante los cuales ocurre la fecundación o la abscisión. Cuando ocurre la fecundación se observa un

oscurecimiento de la corola y del ovario, posteriormente ocurre un cierre de la flor, dejando oculto al ovario dando paso a la FASE II “Fructificación” (Ver Figura 1 C).

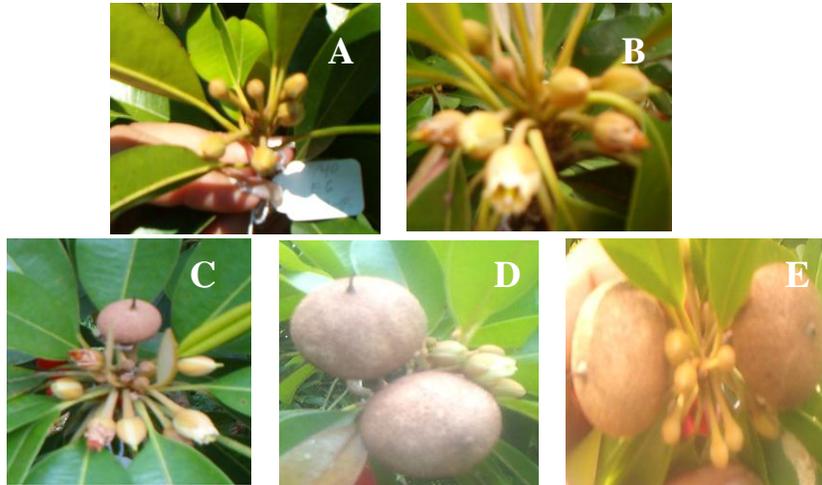


Figura 1. Fases del desarrollo de la flor y del fruto. A y B FASE I: formación de yemas y antesis. C, D y E FASE II: fructificación. En las figuras C, D y E se observa como en una misma rama hay yemas, flores y frutos.

Se determinó que durante la etapa de inmadurez (verde) se incrementa el tamaño de los frutos desde 7,3 x 8,9 mm hasta 51,6x58,5 mm. Esta fase de crecimiento tiene una duración de 210 dda. Otra característica muy importante de los frutos inmaduros es la alta excreción de látex al causarles una herida o al extraerlos de la planta.

La siguiente etapa de desarrollo del fruto es la de madurez fisiológica (240 dda) y está determinada por el cese del aumento de tamaño con valores de 51,6x58,5 mm y por la disminución de excreción de látex. En esta fase ya se detiene el crecimiento y comienzan a ocurrir una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que en consecuencia promoverán la maduración del fruto, etapa en la cual los frutos adquieren una serie de características organolépticas típicas de la especie, además ya no hay la presencia del látex lo cual los hace comestibles (Bedoya, 2009).

1.5. Maduración de los frutos de Níspero

El níspero (*Manilkara zapota*), de acuerdo a su fisiología de maduración, es un fruto catalogado como altamente climatérico, es decir, que al alcanzar la madurez fisiológica se incrementa rápidamente su tasa respiratoria, lo cual aumenta la tasa de degradación de sustancias (almidón, fructosa, sacarosa, carbohidratos de la pared celular, pigmentos, etc) y, por ende, la sobremaduración y descomposición ocurren a los pocos días de la cosecha.

Durante el proceso de maduración de los frutos de níspero uno de los cambios más evidentes es el cambio de textura o pérdida de firmeza, este ablandamiento ocurre muy rápido y es desuniforme, encontrándose en un mismo fruto áreas muy firmes y otras áreas con mucha pérdida de firmeza. Esto se ha convertido en una limitante para la comercialización del fruto tanto para consumo fresco como industrial, ya que es poca la durabilidad del fruto bajo condiciones de almacenamiento, ocasionando grandes pérdidas y haciendo poco rentable el cultivo del níspero (Laborem y col., 1981).

2. ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE LA PARED CELULAR DURANTE LA MADURACIÓN DE FRUTOS

La pared celular es un compartimiento dinámico, continuamente modificado durante el crecimiento, la diferenciación celular y la maduración de los frutos (Pérez-Almeida y Carpita, 2006). El cambio más significativo durante la maduración es en la concentración de las sustancias pécticas solubles en agua, las cuales aumentan, paralelamente ocurre un descenso de los polisacáridos de la pared (celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas), debido a la solubilización de las pectinas de la pared celular, proceso atribuido generalmente a la acción de enzimas hidrolíticas (Díaz-Sobac y col., 1997, Pérez-Almeida y Carpita, 2006).

Los polisacáridos que sufren mayores daños y/o modificaciones durante el ablandamiento de los frutos son los derivados poligalacturónicos, es decir, las sustancias pécticas. En la mayoría de los casos está estrechamente relacionado con la aparición de algunas enzimas entre las que se encuentra la pectina metilesterasa (PME) (Díaz-Sobac y col., 1997, Pérez-Almeida y Carpita, 2006).

Las pectinas metilesterasas tienen por función, durante la maduración de los frutos, la desesterificación del grupo carboxilo de los restos de ácido poligalacturónico y como consecuencia incrementar la susceptibilidad de las pectinas al ataque de las poligalacturonasas (Díaz-Sobac y col., 1997). En síntesis, la hidrólisis de las sustancias pécticas constitutivas de la pared celular de los frutos, es la causa fundamental de su ablandamiento de éstos durante la maduración (Abu-Sarra y Abu-Goukh, 1992).

2.1. La pectina metilesterasa (PME)

La pectina metilesterasa (E.C. 3.1.1.11.) está ampliamente distribuida en las plantas superiores pero también está presente en hongos y bacterias. Las enzimas de la pared celular se encuentran entre las más estables conocidas y suelen presentar pH ácidos óptimos (Cutillas, 1993).

Desde los inicios de las investigaciones sobre la PME se evidenciaba que su función *in vivo* estaba solamente relacionada con la extensión de la pared celular durante el crecimiento celular y el ablandamiento durante la maduración de frutos (Marquis y Bucheli, 1994) hoy en día se han descubierto una serie de nuevas funciones que serán discutidas más adelante.

La acción de la pectinmetilesterasa fue dada a conocer por primera vez por Fermi en 1840, cuando observó que al agregar jugo de zanahoria a una solución de pectina ocasionaba la formación de un gel, esto fue explicado años más tarde sobre la

base de que al producirse la desesterificación enzimática del sustrato se formaba pectato de calcio insoluble (Hill, 1977).

Se ha reportado la presencia de esta enzima en muchas plantas superiores, pero su actividad se ha detectado especialmente en los frutos. Los efectos atribuidos a la PME durante la maduración de frutos son:

- Por su acción desesterificante sobre las pectinas las hace más susceptibles al ataque de la poligalacturonasa, permitiendo así la degradación de la pared celular durante la maduración de los frutos y la pérdida de firmeza (Lester y Dunlap, 1985; Andrews y Shulin, 1995).
- Produce la formación de grupos carboxílicos libres ($^{-}\text{COO}^{\ominus}$) ; esto facilita la formación de nuevos enlaces en la pared celular (Núñez y col., 1992; Alexandre, y col., 1997)

2.1.1. Síntesis de la PME

En los últimos años las investigaciones han demostrado que las diferentes isoformas de la PME detectadas en las paredes celulares están codificadas por una familia multigénica (Micheli, 2001).

Recientemente, la secuenciación sistemática del genoma de Arabidopsis ha contribuido notablemente con la identificación de los 67 genes de esta especie relacionados con la PME. Estos genes codifican pre-pro-proteínas que tienen péptidos considerados como la “señal identificadora” de las PME. La región pre o péptido señal se requieren para la señalización de proteínas en el retículo endoplásmico. La pre-PME es secretada al apoplasto vía las cisternas cis, medial y trans de Golgi y la red trans de Golgi y solo la parte madura de la PME (sin la región pro) se encuentra en la pared celular (Micheli, 2001).

Datos recientes obtenidos de la secuenciación del genoma de *Arabidopsis*, han determinado que los genes de la PME pueden dividirse en dos clases. Los genes de la primera clase contienen solo dos o tres intrones y una región pro larga y los genes de la otra clase contienen cinco o seis intrones y una región pro corta o no existente. Estas dos clases han sido llamadas Tipo I y Tipo II, respectivamente. Las secuencias del Tipo II tienen una estructura cercana a la de las PME identificadas en organismos fitopatógenos (bacterias, hongos) y están involucradas en la penetración de la pared celular durante la infección de la planta. Estos datos nos llevan a considerar la función y el desarrollo de la región pro de la PME. (Micheli, 2001)

De acuerdo a lo reportado por Micheli (2001) se ha observado que las PME extraídas de la pared celular no tienen una región pro (Fig. 2c), la unión de la región pro de la PME madura puede ocurrir bien sea a comienzos, antes de la excreción de la PME madura hacia el apoplasto (Fig. 2a) o después (Fig. 2b).

En el primer caso, la región pro puede ser degradada (Fig. 2d) o cumple una función bien sea dentro de la célula (Fig. 2e) o en el apoplasto (Fig. 2f). Aunque la función de la región pro no se conoce, hay varias hipótesis posibles, las cuales son:

- 1) Influye en la función biológica de las PME,
- 2) Actúa en la señalización de las PME hacia la pared celular,
- 3) Actúa como una chaperona intramolecular, permitiendo el plegamiento conformacional de la parte madura de la PME o
- 4) Actúa como un inhibidor de la actividad enzimática desarrollada por la PME madura.

Sin embargo, hasta el presente no hay evidencia de que la región pro esté correlacionada con las funciones sugeridas en los puntos 2 y 4.

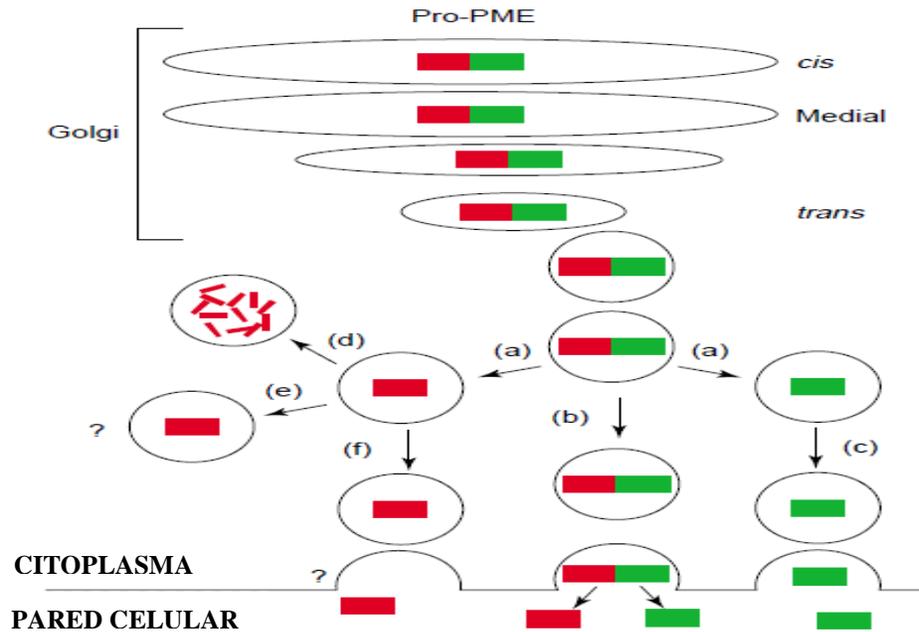


Figura 2. Hipótesis para la excreción de la PME hacia el apoplasta y maduración de la proteína. La separación de la región pro (en rojo) de la PME madura (en verde) ocurrió bien sea temprano, antes de la excreción de la PME madura en el apoplasta (a,c) o después de eso (b). En el primer caso, la región pro puede ser degradada (d) o jugar un papel bien en el interior de la célula (e) o en el apoplasta (f). (Figura tomada de Micheli, 2001).

Además, se puede hipotetizar que la región pro puede inhibir la parte madura durante su secreción al apoplasta para prevenir la demetilesterificación prematura de las pectinas antes de su inserción en la pared celular (Ver figura Fig. 2). Este punto es particularmente interesante debido a que las isoformas involucradas en la microsporogénesis y en el crecimiento del tubo polínico son PME Tipo II relacionadas con las PME bacterianas. La comparación de los patrones de acción de las PME entre el polen, durante el crecimiento del tubo polínico, y las bacterias fitopatógenas, durante la infección de la planta, muestra que ambas PME estuvieron involucradas en la penetración de la pared celular de la planta. Este patrón de acción durante la “invasión” puede caracterizar a las PME que no tienen una región pro. En las bacterias esto ocurre ya que al ser organismos procariontes no poseen retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que la

inhibición de la actividad de la PME no era necesaria durante la excreción de proteína por la bacteria debido a que ellas no segregan pectinas (Ver Figura 3) (Micheli, 2001).

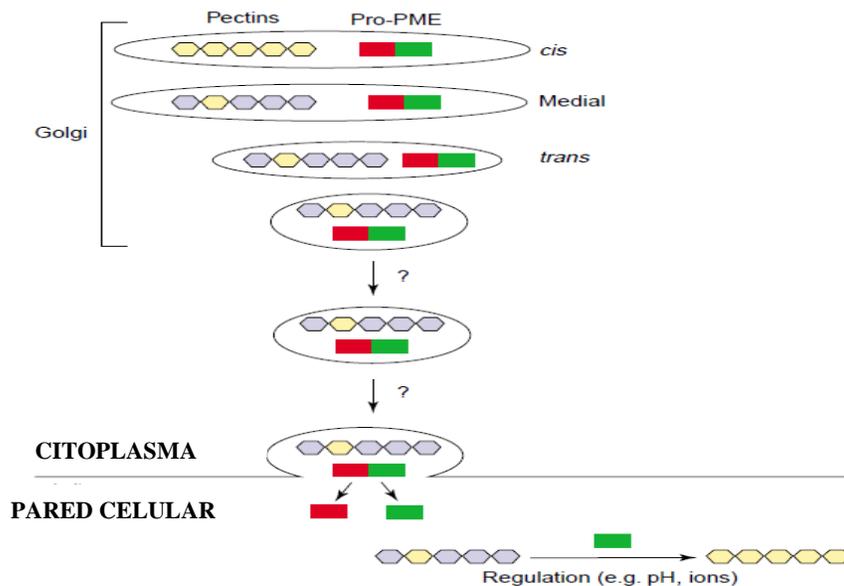


Figura 3. Hipótesis de la co-secreción de las pectinas y de la pectina metilesterasa (PME) en el apoplasto. En este esquema, la región pro (rojo) puede inhibir la parte madura (verde) durante su secreción al apoplasto para evitar la demetilesterificación prematura de las pectinas antes de su inserción en la pared celular. Los ácidos galacturónicos metilesterificados están representados en azul y los demetilesterificados en amarillo. (Figura tomada de Micheli, 2001).

2.1.2. Función biológica y Modo de Acción de la PME

La acción básica de las pectinesterasas es hidrolizar los enlaces metil-éster de las sustancias pécticas (Alexandre y col., 1997). La más conocida es la pectina metilesterasa (PME), la cual puede ser producida en plantas, hongos y bacterias. La PME ejerce su efecto sobre las pectinas (sustrato), modificando las propiedades de estos compuestos, como por ejemplo aumentando su acidez, posibilitando la formación de puentes de calcio o bien favoreciendo la acción de la endo- α (1,4) poligalacturonasa, que necesita al menos dos restos contiguos de ácido galacturónico, para poder actuar. (Ver Figura 4) (Alexandre y col., 1997).

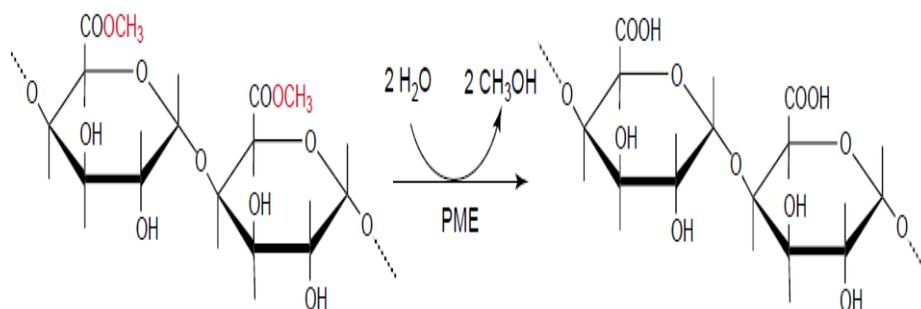


Figura 4. Forma de acción de la PME sobre las sustancias pécticas. (Figura tomada de Micheli, 2001).

De acuerdo a Johansson y col., (2002) las PME de las plantas se presentan como enzimas multigénicas y se propone que ellas remueven los esteres metílicos en un mecanismo de cadena simple dando origen a residuos continuos de ácido galacturónico desesterificados. En contraste, el modo de acción de las PME fúngicas (*Aspergillus sp.*) es aleatoria, llamado mecanismo de cadenas múltiples, ya que actúa al azar sobre cualquier residuo de ácido galacturónico, mientras que la PME fúngica de *Trichoderma reesei* desesterifica la pectina en bloques y la PME de bacteria *Erwinia chrysantemi* es similar a la PME de las plantas. Por lo tanto, parece que el modo de desesterificación de la PME es independiente del origen (microbiano o vegetal), encontrándose diferencias, entre ellas determinadas por las propiedades de las enzimas, caracterizadas por el punto isoeléctrico (pI) y el pH óptimo (Micheli, 2001; Johansson y col., 2002).

Lo antes expuesto brinda una visión general de lo que se conocía anteriormente sobre las PME, sin embargo nuevas investigaciones han aportado nueva y esclarecedora información sobre el modo de acción de las PME, permitiendo dilucidar aspectos sobre los efectos a nivel fisiológico, los cuales son planteados en el siguiente apartado.

De acuerdo a lo reportado por Micheli (2001) las PME pueden tener diferentes modos de acción y por más de 20 años, la hipótesis comúnmente aceptada relativa al

modo de acción de las PME sobre los homogalacturonanos es que ellas pueden actuar bien sea aleatoriamente (como en los hongos) o linealmente (como en las plantas) a lo largo de la cadena de pectinas.

Cuando las PME actúan aleatoriamente sobre los homogalacturonanos, la demetilesterificación libera protones que promueven la acción de endopoligalacturonasas y contribuyen al ablandamiento de la pared celular. Cuando las PME actúan linealmente dan origen a bloques de homogalacturonanos con grupos carboxilos libres que pueden interactuar con el ión Ca^{+2} , formando un gel de pectato. Debido a que la acción de las endopoligalacturonasas en dicho gel es limitada, este patrón de acción de las PME contribuye a la rigidez de la pared celular óptimo (Micheli, 2001).

Anteriormente se pensaba que las PME ácidas estaban esencialmente combinadas a los hongos, por lo tanto, la hipótesis más simple era que la demetilesterificación aleatoria dependía de las PME ácidas mientras que la demetilesterificación linear dependía de PME alcalinas.

Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la actividad de la PME también depende del pH y del grado inicial de metilesterificación de las pectinas (Micheli, 2001). Algunas isoformas de la PME pueden actuar aleatoriamente a pH ácido pero lo hacen linearmente a un pH alcalino y a un pH determinado algunas isoformas son más efectivas que otras sobre pectinas altamente metilesterificadas. Además, la actividad de la PME es impulsada por cationes (los trivalentes son más efectivos que los divalentes y éstos son más efectivos que los monovalentes). Dependiendo de su concentración, los cationes también pueden modificar la afinidad de las PME por su sustrato. En conclusión, el patrón de acción de la PME madura en la pared celular está regulado por numerosos factores que revelan la complejidad de las enzimas y contrasta con la hipótesis simplista que

divide las PME en dos grupos: “alcalino”, demetilesterificación lineal y “ácido”, demetilesterificación aleatoria. (Ver Figura. 5) (Micheli, 2001).

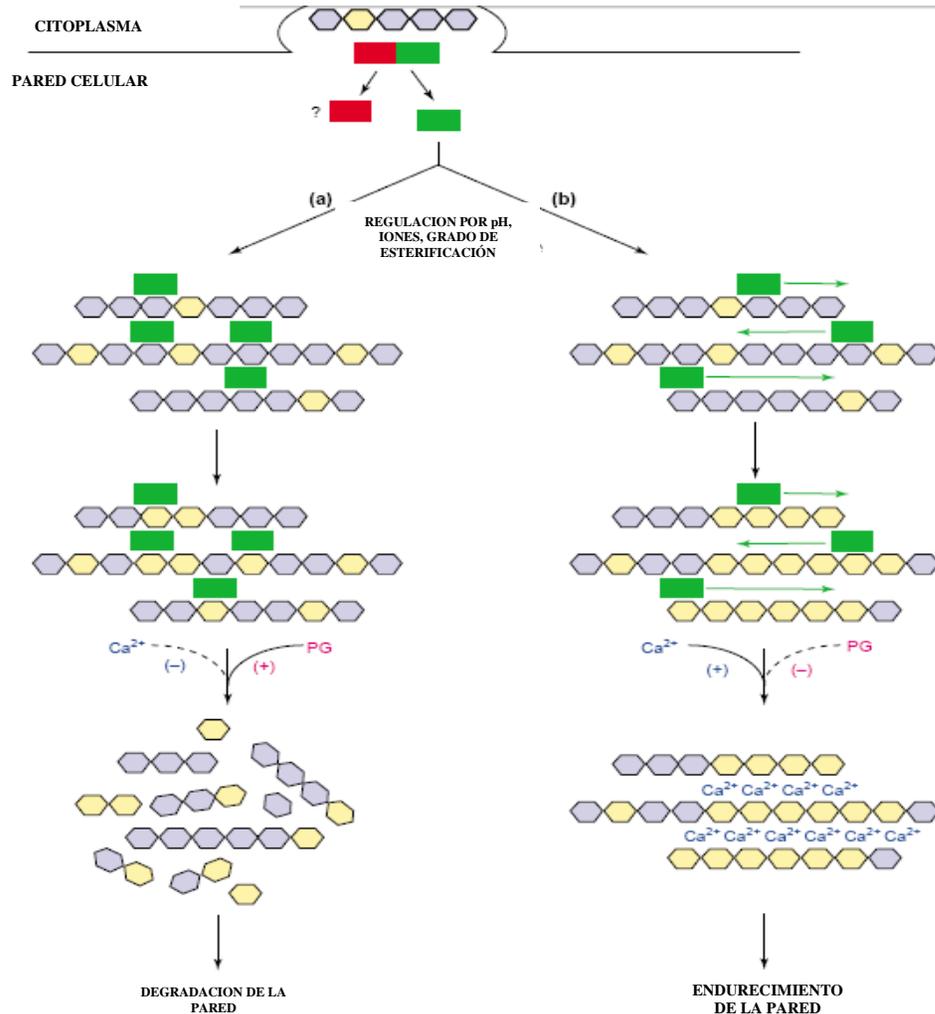


Figura 5. Modos de acción de las Pectina metilesterasas (PME). Dependiendo de las propiedades de la pared celular, las PME maduras (verde) pueden actuar aleatoriamente (a), promoviendo la acción de las hidrolasas de la pared celular dependientes del pH, como las endopoligalacturonas (PG), contribuyendo al ablandamiento de la pared celular, o pueden actuar linealmente (b), dando origen a bloques de grupos carboxilo libres que interactúan con iones bivalentes (Ca^{2+}), dando rigidez a la pared celular. Los ácidos galacturónicos metilesterificados se representan en azul y los demetilesterificados en amarillo. (Figura tomada de Micheli, 2001).

Además, del posible papel de la región pro como un inhibidor de la actividad de la PME durante la ruta secretora, y a la regulación de la demetilesterificación de la

pectina en la pared celular, se ha demostrado que hay inhibidores de la actividad de la PME en la pared celular, siendo también regulada por hormonas, ya que la actividad de la PME inducida por Auxinas incrementa la extensión de la pared celular y, como resultado, la absorción de agua por la célula. Se han obtenido algunos resultados contradictorios en la acción del ácido abscísico (ABA) sobre la regulación de la PME. Por ejemplo, aunque el ABA estimuló la actividad de la PME en semillas de tomate, inhibió su actividad durante la germinación de las semillas en cedro amarillo (*Chamae cyparis nootkatensis*), siendo en estas semillas, el ácido giberélico (AG₃) el que tuvo un efecto estimulante sobre la actividad de la PME (Micheli, 2001).

2.1.3. Las PME y su rol en otros procesos fisiológicos

Varios estudios han demostrado una fuerte correlación entre la actividad de la PME o su expresión génica y procesos fisiológicos como la maduración de los frutos, microsporogénesis y crecimiento del tubo polínico, diferenciación celular cambial, germinación de semillas y elongación del hipocótilo. Estudios recientes han demostrado inequívocamente que una PME es receptora para una proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco (TMV). (Micheli, 2001). La interacción entre la proteína del movimiento del virus y la PME se requiere para el movimiento del virus de célula a célula a través de los plasmodesmos. Una hipótesis propuesta es que la unión de la proteína de movimiento del TMV interfiere con la actividad de la PME, alterando el balance iónico de la pared celular e induciendo cambios en la permeabilidad de los plasmodesmos. Además, los estudios utilizando mutantes permiten una caracterización más específica de los efectos fisiológicos de las PME en el desarrollo de las plantas (Micheli, 2001).

También se ha reportado una estrecha correlación entre la actividad de la PME y los niveles de metanol en tejidos de frutos de tomate de tipo silvestre y un mutante antisentido de la PME, indicando que la PME está en la ruta biosintética primaria para la producción de metanol en frutos de tomate. Debido a que la oxidación de

metanol a CO₂ puede resultar en la incorporación de carbono en los metabolitos finales del Ciclo de Calvin-Benson, las PME pueden jugar un apreciable papel, aunque indirecto, en el metabolismo fotosintético de la planta (Micheli, 2001).

Durante la separación de las células externas de la caliptra en plantas de Guisante, la actividad de la PME se incrementa y se correlaciona con un aumento en la cantidad de pectina ácida y un descenso en el pH de la pared celular. Este estudio se llevó a cabo utilizando una planta transgénica antisentido transformada con un gen PME (*rcpme1*) obtenido mediante screening de una biblioteca de ADN complementario (ADNc) de la raíz. El análisis de las plantas transgénicas demostró que la expresión del *rcpme1* se requiere para el mantenimiento del pH extracelular, para la elongación de las células dentro del ápice radical y para la degradación de la pared celular que conduce a la separación de las células externas de la caliptra (Micheli, 2001).

2.1.4. Estructura de la PME

Hasta el momento solo se han determinado dos estructuras tridimensionales de la PME, proveniente de la bacteria *Erwinia chrysantemi* y de la zanahoria (*Daucus carota*). En los trabajos de Jenkins y col. citados por Johansson y col., (2002) se determinó que la PME en la bacteria *Erwinia chrysantemi* PemA (P07863), tiene una hélice β paralela a mano derecha como se ha detectado en todas las enzimas pecticas de origen fúngico y bacteriano (pectatoliasas, pectinaliasas, poligacturonasas y ramnogalacturonasas). La estructura de la PME bacteriana de *Erwinia chrysantemi* demostró convincentemente que la PME es un nuevo tipo de hidrolasa que no contiene un pliegue de hidrolasa α/β ni una triada catalítica Ser-His-Asp. En su lugar las PME parecen ser hidrolasas carboxiladas con dos residuos de ácido aspártico en el sitio activo (Ver Figura 6).

Ya en estudios previos se había excluido que la PME pudiese ser una esterasa de la serina y también se había demostrado que no hay residuos conservados de histidina o serina como residuos catalíticos potenciales en la estructura de la PME. Además la modificación de los residuos de histidina en las PME de tomate y de *Aspergillus niger* demostró que estos residuos no tienen función de sitio activo pero contribuyen a la estabilidad estructural general. (Johansson y col., 2002).

La estructura cristalina de la PME de la zanahoria fue descrita en los trabajos de Johansson y col., (2002). De acuerdo a estos trabajos se determinó que la PME pertenece a la familia de las proteínas con una hélice β paralela. La organización beta prisma de estas ha sido descrita como consistente con las tres laminas β paralelas, PB1, PB2 y PB3, mientras que el giro o la vuelta entre las bandas en PB1-PB2, PB2-PB3 y PB3-PB1 se llaman T1, T2 y T3 respectivamente (Figura 6 B). La PME de la zanahoria tiene 8 giros de hélice β regulares con bandas en todas las tres láminas. Además la PB1 contiene una banda extra paralela en el lado terminal N de la lámina y dos en el lado terminal C. Mientras que la PB2 tiene una banda extra en el lado terminal C de la hélice β , para este caso se denominan las bandas en las láminas como β A1, β B2 etc., mientras que 1-3 se refiere a la lámina β y A-K se refiere a la capa de la hélice beta (Figura 6 A) (Johansson y col., 2002).

Los giros se denominan como TC3, y así sucesivamente, en una forma equivalente para cada uno. PB1 es la lámina más larga y más regular en la estructura. La lámina paralela tiene 11 bandas ligeramente curvas, siendo la primera y última banda perpendiculares unas a otras. Similarmente la PB2 es una lámina Beta con diez bandas suavemente curvas donde solamente la banda del terminal C está torcida al final con un giro β . La PB3 está sistemáticamente torcida por curvas β en las bandas β D3 – β H3 donde los residuos 116, 137, 158, 185 y 223 tuercen la lámina y doblan localmente el patrón de enlace con hidrógeno paralelo. Los 7 residuos de terminal N antes de la primera banda β no tienen estructura secundaria. Entre las primeras bandas de PB1 hay una banda corta antiparalela, β 1 en el borde del largo de la hélice β y una

hélice α que se llama α 1 en el borde PB1. Los últimos 30 residuos del extremo C terminal forma una serie de hélices cortas desordenadas y una cola de residuos 312-319 sin estructura secundaria en el lado exterior de la PB1 (Johansson y col., 2002).

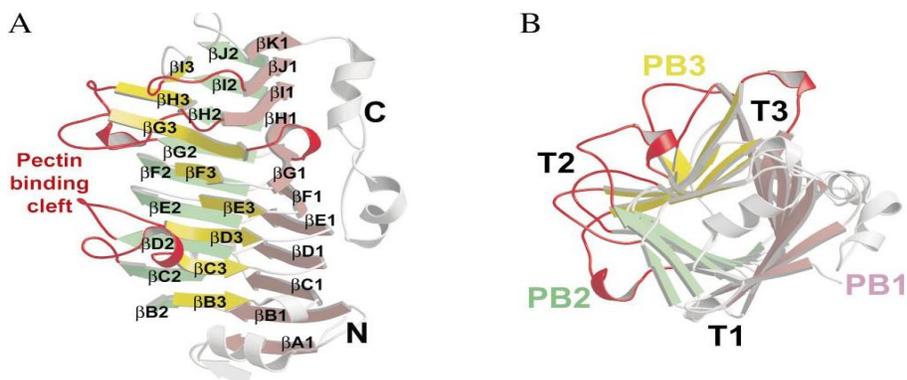


Figura 6. Estructura de la PME de zanahoria. 6A: Las láminas PB1, PB2 y PB3 están coloreadas en verde, marrón y amarillo respectivamente. Las bandas son numeradas desde β A1 hasta β K-1 en la lámina PB1, de β B2 a β J2 para la lamina PB2 y β B3 hasta β I3 para la lamina PB3. Los bucles que forman la hendidura de enlace de unión de la pectina están en rojo; las partes que participan en las láminas β están en blanco. 6B: Estructura rotada 90° alrededor del eje “X” mirando hacia abajo desde el lado terminal N, la coloración es la misma como se dijo en A. Se indican la ubicación de PB1, PB2 y PB3, así como los bucles entre las láminas, llamados T1, T2 y T3. (Figura tomada de Johansson y col., 2002).

2.1.5. Sitio de unión enzima-sustrato

De acuerdo al trabajo de Johansson y col., (2002) la PME tiene una larga hendidura poco profunda a través de la estructura, ésta tiene todas las propiedades esperadas para el sitio de unión de las pectinas en la parte central de esta hendidura: está bordeada por varios residuos aromáticos, algo característico para los sitios de unión de los carbohidratos, estos incluyen Phe 84, Thy 139, Phe 160, Tyr 222, Trp 227, Phe 250 y Trp 252. Un modelo de una molécula de pectina en una fuerte configuración de hélice 2_1 puede ser acomodada en esta hendidura, con los grupos carboximetil señalando en diferentes direcciones en los sucesivos residuos de carbohidratos (Ver Figura 7).

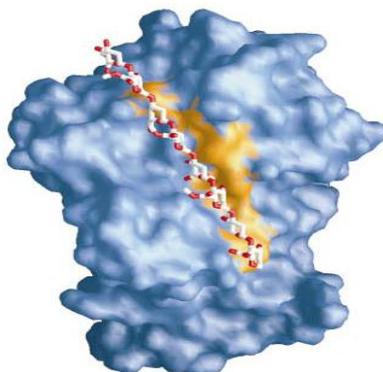


Figura 7. Representación de la superficie de la hendidura de unión de la pectina con la enzima, los bucles de T2 y T3 forman las paredes de una hendidura que corre a través de la molécula. Los residuos aromáticos en color naranja están bordeando la hendidura. (Figura tomada de Johansson y col., 2002).

2.1.6. Sitio activo de la PME

El sitio activo de la PME de la zanahoria está localizado en la larga hendidura superficial, con los dos residuos carboxilados en el centro, Asp 136, Asp 157, ambos residuos están localizados como el segundo residuo en una banda PB3 y hay casi 4.5 Å entre los grupos carboxilados de estos residuos. Asp 157 es un residuo con enlaces de hidrógeno unidos a ambas cadenas laterales de oxígeno con el Arg 225. La Asp 136 no tiene cadenas laterales con enlaces de hidrógeno unido a ningún átomo de la proteína. Hay una molécula no proteica en el sitio activo que puede ser un ión cacodilato de la solución de cristalización, este ion se pone en contacto en el sitio activo con ambos residuos de aspartato y dos cadenas laterales de glutamina Gln 113 y Gln 135 y dos residuos aromáticos The 160 y Trp 227 (Ver Figura 8) (Johansson y col., 2002).

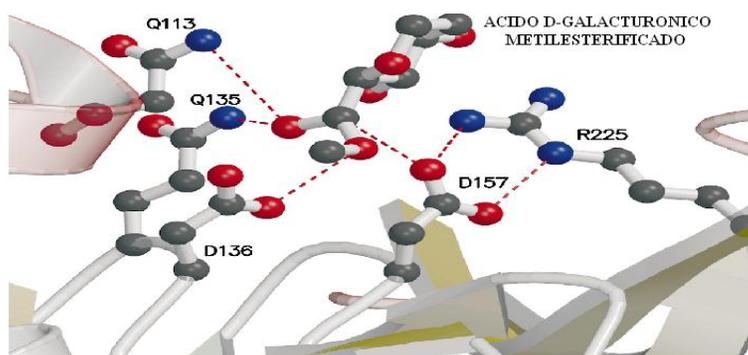


Figura 8. Sitio activo de la PME de zanahoria. El sustrato, una unidad de ácido D-galacturónico metilesterificado se modela en el sitio activo. La Arg 225 está unida con enlaces de hidrógeno a la Asp 157, la cual está adecuadamente posicionada para el ataque nucleofílico sobre el extremo carboximetil, mientras que la Asp 136 actuaría como un ácido base durante la catálisis. Los dos residuos de glutamina, la Gln 113 y la Gln 135 pueden formar un hueco de anión para la estabilización del intermedio tetraédrico cargado negativamente (Figura tomada de Johansson y col., 2002)

2.1.7. Isoenzimas de la pectina metilesterasa

En frutos, la PME ocasionalmente existe en una o más isoformas, cada una comprende una cadena simple de polipéptidos con pesos moleculares entre 10 kDa y 60 kDa (Giovane y col., 1990) y puntos isoelectrónicos entre 7 y 11. Generalmente difieren en el pH óptimo, estabilidad térmica y otras características físico-químicas (Versteeg y col., 1980; Castaldo y col., 1989; Javeri y Wicker, 1991; Lin y col., 1989; Seymour y col., 1991).

Diversos estudios realizados sobre la PME han demostrado la presencia de diferentes isoenzimas en frutos y en otros tejidos vegetativos. Por ejemplo, en manzanas (*Malus communis*) (Castaldo y col., 1989) existen dos isoenzimas que difieren en sus cargas eléctricas y pesos moleculares, pero no en sus parámetros cinéticos.

Dentro del fruto se ha encontrado la presencia de diferentes isoenzimas distribuidas en diferentes partes del tejido, tal es el caso en el limón, donde

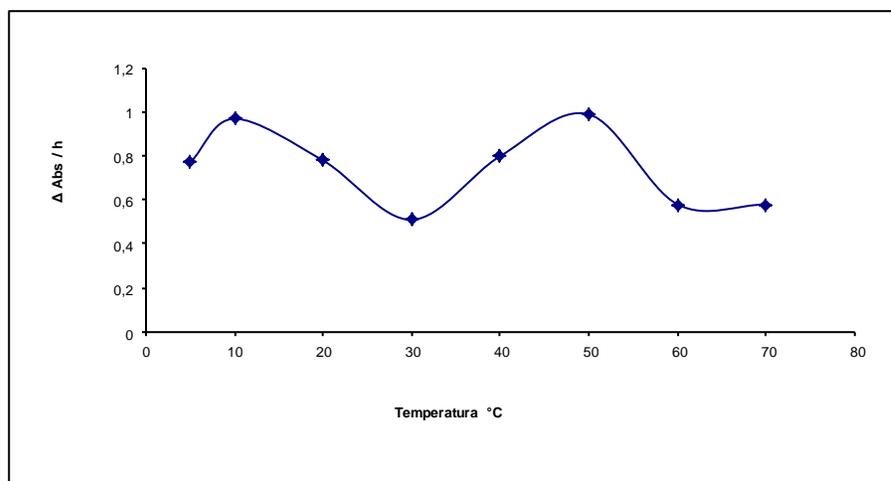
Macdonald y col., (1993) purificaron dos isoenzimas de la PME, una localizada en la piel y la otra en el endocarpo del limón y observaron que ambas poseen pesos moleculares similares (35 kDa y 33 kDa) y altos puntos isoeléctricos, mayores a 11 y 9, respectivamente. La temperatura óptima para la PME del endocarpo es de 70 °C, reteniendo 33 % de actividad, mientras que la PME de la piel tiene una temperatura óptima de 67 °C reteniendo un 81 % de actividad, siendo ésta última la más termorresistente.

Alonso y col., (1997), utilizando técnicas de cromatografía, encontraron dos isoenzimas en frutos de kaki (*Diospyros kaki*), que fueron llamadas PMEI y PMEII. Ambas isoenzimas presentan diferentes pesos moleculares (51 kDa y la 30 kDa) y puntos isoeléctricos (8,4 y 6,9 respectivamente). La K_m obtenida para ambas demuestra que la PMEII de kaki es más afín al sustrato, ($31 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) que la PMEI (K_m de $54 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Son termoestables al calor, la PMEII retiene un 80 % de la actividad residual después de 5 minutos, a 80 °C, mientras que la PMEI es termoestable a 70°C y retiene el 80% de su actividad, ambas son inactivadas a 90 °C durante 5 minutos de incubación. La PMEII tiene un pH óptimo de 7,4 y la PMEI de 7,8.

2.1.8. PME en frutos de níspero

En un estudio realizado en frutos de níspero *Manilkara zapota var. Prolific* por Bedoya (2002) se encontró que una de las enzimas hidrolíticas de la pared que juega un rol muy importante en el ablandamiento del níspero es la PME, determinándose que la máxima actividad de la PME es en el estado de madurez fisiológica, siendo este de $0,16 \Delta\text{Abs}/\text{h}$. También se realizó la caracterización cinética de la PME, encontrándose una K_m aparente de $0,04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y una $V_{\text{máx}}$ aparente de $0,8235 \Delta \text{ Abs}/\text{h}$.

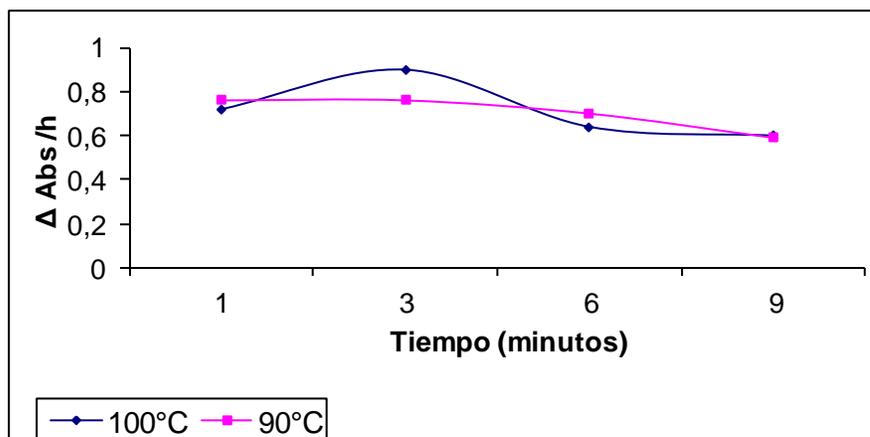
El pH óptimo fue estimado entre 3 y 4, con unos valores de actividad de 0,73 y 0,74 Δ Abs/h, respectivamente. Al realizar los ensayos sobre la temperatura óptima de reacción de la PME de nísperos se determinaron dos picos de máxima actividad, uno a 10 °C, con un valor de 0,97 Δ Abs/h y otro a 50 °C, con valor de Absorbancia de 0,99. De acuerdo a estos resultados, se presume la presencia de dos isoenzimas de la PME, aunque no se puede afirmar pues todos los ensayos fueron realizados con los extractos crudos de la pulpa del fruto (Ver Grafica 1).



Grafica 1. Efecto de los cambios de temperatura en la actividad de la PME en frutos de níspero (Tomado de Bedoya, 2002).

La tendencia general para la actividad residual de la PME es la de ser termorresistente, es decir, su actividad no es inhibida por el calor, sólo se reduce en poca proporción.

En el ensayo de estabilidad al calor se detectó que a 100 °C la PME tiene sólo 83,72% y a 90 °C tiene 98,7% (Ver Grafica 2). Lo cual demuestra que es altamente resistente al calor.



Grafica 2. Estabilidad al calor de la PME en frutos de níspero en estado de madurez fisiológica (Bedoya, 2002).

3. IMPORTANCIA Y UTILIDAD DE LAS PME

La PME juega un papel muy importante en el procesamiento industrial de frutos y vegetales. En el procesamiento de pulpa de tomates, naranjas, y otros rubros, así como en la clarificación de jugos y bebidas, se debe aplicar un calentamiento rápido para inactivar la PME o se aplican inhibidores enzimáticos para así mejorar la calidad organoléptica del producto (Marquis y Bucheli, 1994).

3.1. Aplicaciones de la PME en la Industria

Como estabilizadores de turbidez de jugos o néctares de frutos cítricos suele agregarse a la pectinasa y una proteasa vegetal (papaína, bromelina), la cual contribuye al desdoblamiento del pectato de calcio (Bajard y col. 2006)

Clarificante de jugos y néctares, la adición de preparados de pectina metilesterasa, generalmente en conjunto con celulasas (0,05-0,5 g/l), conocidas como "enzimas filtrantes o clarificantes", degradan las sustancias pécticas, permitiendo realizar filtraciones rápidas para obtener jugos claros, sin obstruir los poros del filtro, evitando cambios en los jugos por fenómenos de oxidación que ocurren en las

filtraciones lentas. Este proceso de clarificación se realiza generalmente en diversas fases: a) reducción de la viscosidad, pero sin cambio de opalescencia; b) floculación o decantación y disminución de la opalescencia, y c) eliminación de la pectina y obtención rápida de un filtrado claro (Bajard y col. 2006).

Incremento en la extracción de jugos, se aplica la PME con el objeto de lograr un mayor rendimiento en jugo a partir de algunas frutas que no se pueden prensar con facilidad, quedando retenida una cantidad apreciable de jugo. Así sucede en las uvas para obtener el mosto, lo que trae, además, como ventaja, que los vinos resultantes adquieren mejor aroma, al haberse degradado las sustancias pécticas; también aumenta la extracción del colorante de la uva (Bajard y col. 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN Y MUESTRA

1.1. Material Vegetal

Se utilizaron plantas de níspero (*Manilkara zapota* var. *prolific*) procedentes del Banco de Germoplasma del Campo Experimental del CENIAP-INIA de Maracay. Esta variedad fue desarrollada por el Centro de Educación e Investigación Agrícola (*Agricultural Research and Education Center*), Homestead, Florida, Estados Unidos de Norte América, en 1941, propagadas por injerto constituyéndose genéticamente en un clon, por lo se consideran plantas de constitución genética homogénea. La población consistió en tres plantas de níspero (*Manilkara zapota* var. *prolific*) de la Colección activa del Campo Experimental del CENIAP-INIA de Maracay, estado Aragua.

Los frutos se colectaron en estados de madurez fisiológica (MF). Una vez colectados los frutos se trasladaron al Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética FAGRO-UCV-Maracay, en donde se procedió a lavarlos y almacenarlos bajo congelación a una temperatura aproximada de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para luego utilizarlos en los ensayos respectivos.

1.2. Evaluación del Desarrollo de Frutos de Níspero. Selección y colecta de los frutos

Para la caracterización se siguió la metodología de Bedoya (2009). Cada planta se dividió en cuatro zonas basadas en los puntos cardinales: Norte, Sur, Este y Oeste. Se realizaron las mediciones y observaciones con un intervalo de 15 a 20 días, desde el inicio de la formación de la yema floral hasta el crecimiento y diferenciación de los frutos.

Las mediciones se realizaron con un vernier rectilíneo, desde la inserción del pedicelo hasta el extremo distal (largo) y en el plano ecuatorial (ancho), considerándose la medida para determinar crecimiento: el largo x ancho (lxa).

El análisis del desarrollo de los frutos se dividió en dos Fases: **Fase I:** Fase Floral que comprende la formación de yemas florales (YF), la antesis y la fecundación. **Fase II:** Fructificación, crecimiento y diferenciación de los frutos. Se seleccionaron los frutos que estuviesen sanos (sin heridas, magulladuras o atacados por plagas) y se colectaron los frutos en estado de madurez fisiológica.

2. EXTRACCIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE LA PME A PARTIR DE FRUTOS DE NÍSPERO

Debido a que existen diversas técnicas que permiten extraer la PME a partir de la pulpa de los frutos, se evaluaron las diferencias existentes entre los métodos utilizados en diferentes investigaciones (Ver Cuadro 1). Sin embargo, algunas de estas técnicas requieren de varias etapas para extraer las proteínas, siendo su tiempo de ejecución muy largo, entre 6 y 24 horas; además de requerir de una gran variedad y cantidad de reactivos, que las hace costosas. Otro aspecto importante de estas técnicas es que son aplicadas a frutos que no tienen látex (Drayen y Van Cutsem, 2008; Vovk y Simonovska, 2007; Rodrigo y col., 2006; Bedoya, 2002) (Cuadro 1).

Por lo antes expuesto se planteó la necesidad de diseñar otro método de extracción, que permitiera no solamente reducir los costos y el tiempo, sino también evitar la interferencia que ocasiona la presencia de látex en los frutos de níspero.

Cuadro 1. Resumen de las diferentes metodologías de extracción de la PME y sus isoenzimas. En el cuadro se presentan los pasos y los reactivos utilizados por cada grupo de autores.

AUTORES METODOLOGÍA	Drayen y Van Cutsem (2008)	Vovk y Simonovska (2007)	Rodrigo y col., (2006)	Bedoya (2002)
EXTRACCIÓN DE LA PME Y SUS ISOENZIMAS	<ol style="list-style-type: none"> Las muestras de fresa se maceraron con N₂ líquido. Se resuspendió en buffer A (76mM K₂HPO₄; 27mM KH₂PO₄; 25mM (EDTA); 1mM cisteína; 50 g/l (PVPP); 1mM (PMSF) pH 7.3). Se agitó en vortex durante 30 minutos, el sobrenadante se centrifugó a 3000g. Se descartó el pellet y se agitó nuevamente en vortex en 4 volúmenes buffer B (76mM K₂HPO₄; 27mM KH₂PO₄; 25mM EDTA; 2M NaCl; 1mM cisteína; 50 g/L PVPP; 1mM PMSF; pH 7.3). SE agito por 60 minutos y luego se centrifugó 30 minutos a 3000 g. El sobrenadante se centrifugó 30 minutos a 14000 g. Luego las muestras fueron dializadas durante toda la noche. Se almacenó la muestra dializada. Tiempo aproximado de procesamiento : 16-24 horas. 	<ol style="list-style-type: none"> Se utilizaron frutos de tomate. Se homogeneizaron 500 g de pulpa (sin piel) con 500 mL de agua fría. Se ajustó a pH 3 con 1M de HCl. El pellet obtenido fue centrifugado 20 minutos a 8000 rpm. El pellet obtenido fue disuelto en 750 mL de NaCl 1.2 M (pH 6). La solución se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos. El pellet obtenido se disolvió en 500 mL de NaCl 1.2M (pH 6) Se agitó durante 3 horas. Luego se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue filtrado en papel y luego a través de una membrana Millex-HV polihidrofílica (PVDF 0.45µm). El filtrado obtenido se almacenó. Tiempo aproximado de procesamiento 6-8 horas. 	<ol style="list-style-type: none"> Se utilizaron frutos de tomate. Se homogeneizaron 500 g de pulpa con 750 mL de agua destilada fría, durante 2 minutos. Se ajustó a pH 3 con HCl 0.1 M. se agitó durante 15 minutos. Se enfrío durante 20 minutos a 8000 g. El pellet fue resuspendido en agua destilada. Se ajustó a pH 3 con HCl 0.1 M. Se centrifugó a 8500 g durante 20 min. El pellet se disolvió en Na Cl 1.2 M, en proporción 1:1. Se ajustó a pH 6 con NaOH 0.1 M. Se agitó durante 3 h. Luego se centrifugó a 10.000 rpm por 20 min. Se recuperó el sobrenadante el cual contenía a la PME. Tiempo aproximado de procesamiento 6-8 horas. 	<ol style="list-style-type: none"> Se utilizaron frutos de níspero. Se les quito el exocarpo. Se homogeneizaron durante 1 minuto en solución de NaCl 10%. Se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se sometió a diálisis durante toda la noche. Se almacenó la muestra. Tiempo aproximado de procesamiento de 16-24 horas.

2.1. Diseño de metodologías para extracción de la PME

El primer paso para la purificación y el posterior análisis cinético de las enzimas, es su extracción, del tejido en el cual se encuentran, con técnicas que permitan mantener su integridad, estabilidad estructural y actividad catalítica. Para esto se diseñaron cinco métodos de extracción diferentes, para determinar cuál era más eficiente en los aspectos antes mencionados. Los métodos diseñados se denominaron A, B, C, D y E.

Para medir la actividad de la PME en los extractos obtenidos por los diferentes métodos se siguió la Metodología establecida por Hagerman y Austin (1986),

también se midió el contenido de proteína extraído a través de la técnica de Bradford (1976).

Inicialmente a todos los frutos se les retiró el exocarpo y las semillas y fueron lavados para su posterior procesamiento. A continuación se explican cada uno de los métodos diseñados.

“Método A”: Se pesaron 20 g de pulpa del fruto; se maceró la pulpa con un mortero con buffer Tris-HCl (0,1M, pH 8) en relación 1:1 y se centrifugó a 10000 rpm x 30', se obtuvo un volumen de sobrenadante de 20 mL. El sobrenadante obtenido se filtró con lana de vidrio y fue almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

“Método B”: Se pesaron 20 g de pulpa de níspero y se maceró con un mortero con 20 mL de PBS (Buffer fosfato monohidratado: K_2HPO_4 20mM pH 7,4 y Buffer fosfato bihidratado: KH_2PO_4 20mM pH 7,4; NaCl 0,45 M) (relación 1:1), el macerado obtenido se centrifugó a 10000 rpm x 30'. El sobrenadante obtenido (17,5 mL) se filtró con lana de vidrio y fue almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

“Método C”: Se tomaron 20 g de la pulpa del fruto, se le añadió nitrógeno líquido y se pulverizó la pulpa en un mortero, luego se resuspendió en 20 mL de Tris-HCl (0,1M-pH 8) y se centrifugó a 10000 rpm x 30'. El sobrenadante obtenido (20 mL) se filtró con lana de vidrio y fue almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

“Método D”: Se maceraron 20 g de pulpa en mortero con 20 mL de Tris-HCl (0,1M-pH 8) (relación 1:1), se separó la fase acuosa de la sólida; a la fase sólida se le agregó nitrógeno líquido, se maceró nuevamente y se centrifugó a 10000 rpm x 30'.

El sobrenadante obtenido (21 mL) fue se filtró con lana de vidrio y almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

“**Método E**”: Se homogeneizaron 20 g de la pulpa en 20 mL de NaCl 10% (relación 1:1) y se centrifugó a 10000 rpm x 30'. El sobrenadante obtenido (17,5 mL) se filtró con lana de vidrio y fue almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

En el esquema elaborado (Figura 9) se resumen los pasos que se realizaron para probar cada uno de los métodos antes descritos.

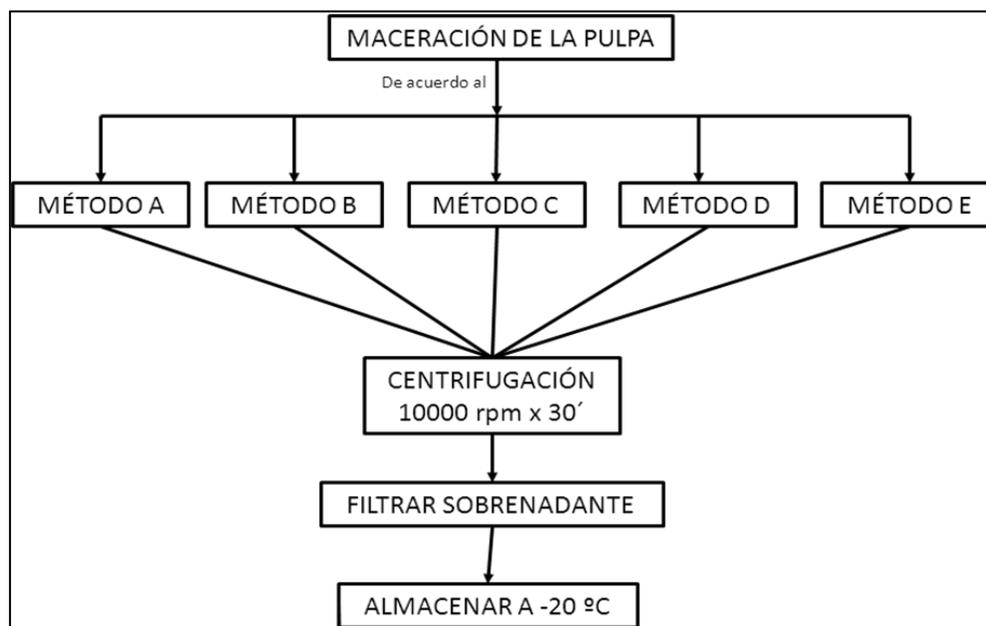


Figura 9. Esquema de la secuencia y las técnicas utilizadas para realizar la extracción de la PME a partir de frutos de níspero.

2.2. Determinación de la actividad de la pectina metilesterasa (PME).

Para determinar la actividad de la enzima PME en los diferentes extractos y muestras se utilizó la metodología de Hagerman y Austin (1986), la cual se fundamenta, en un ensayo colorimétrico haciendo uso de un espectrofotómetro.

La metodología consiste en realizar una mezcla de reacción con la enzima PME, el sustrato (pectina) y 20 μL de azul de bromofenol. Cuando la PME demetila la cadena de ácido poligalacturónico se acidifica el medio, este cambio en el pH genera un cambio en la coloración del azul de bromofenol, de azul a amarillo. Este cambio es captado por el espectrofotómetro y se mide la actividad de forma indirecta como un cambio en la absorbancia a 620 nm.

Las cantidades fueron ajustadas a la capacidad de un tubo vial de 1,5 mL (Ver Figura 10) y se procedió a realizar el ensayo de la siguiente manera:

1. Se prepararon las siguientes soluciones: sustrato: pectina cítrica (PC) al 1% en agua destilada, azul de bromofenol (AB) al 0,1% y el extracto del fruto de acuerdo a la metodología establecida.
2. Se mezclan en un tubo vial de 1,5 mL los siguientes reactivos: 938 μL de pectina cítrica (sustrato), 282 μL de extracto enzimático (enzima PME) (EE) y 20 μL de azul de bromofenol (AB) al 0,1 %.
3. Incubar en baño térmico a 30 °C durante 1 hora.
4. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a sacar los tubos y enfriar en una mezcla de agua con hielo.
5. Se procede a medir la absorbancia a 620 nm, utilizando un espectrofotómetro, Marca GENESYS 20.

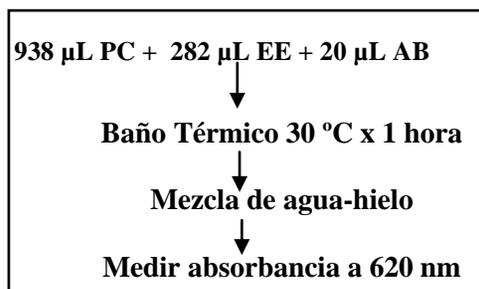
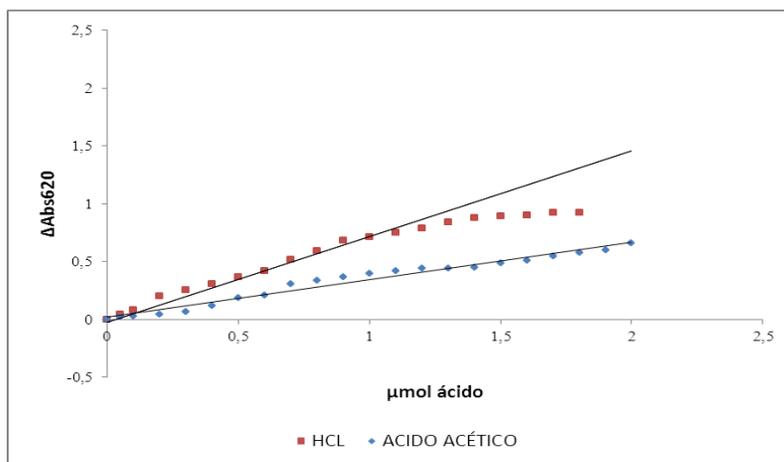


Figura 10. Esquema general para medir la actividad de la PME de acuerdo al método espectrofotométrico de Hagerman y Austin (1986)

Al obtener los valores de la absorbancia, éstos fueron llevados a la curva de calibración, elaborada de acuerdo a la metodología propuesta por Hagerman y Austin (1986) (Ver Gráfica 3) donde los valores absorbancia fueron llevados a μmol ácido galacturónico/min. Se prepararon una serie de soluciones de diferentes concentraciones, para el HCl desde 0,5 mM hasta 2 mM y para el ácido acético desde 0,87 mM hasta 2 mM. Se utilizó un ácido fuerte y uno débil para detectar el cambio máximo y mínimo. El sistema de análisis con el azul de bromofenol se realiza con ácidos fuertes y ácidos débiles (Hagerman y Austin, 1986).

El ácido fuerte está completamente ionizado, y cada mol de ácido produce un mol de ion hidrógeno para reaccionar con el azul de bromofenol, pero el ácido débil está parcialmente ionizados y por lo tanto producen menos moles de iones de hidrógeno por mol de ácido. La parte lineal de la curva de calibración se utilizó para convertir lo observado para la PME a micromoles de ácido producido/minuto durante la reacción enzimática. Se utilizó como blanco una mezcla sin ácido y se midió la absorbancia a 620 nm ya que es la absorbancia máxima para detectar los cambios de actividad (Hagerman y Austin, 1986)



Gráfica 3. Curva de calibración para el ensayo espectrofotométrico de acuerdo a la metodología propuesta por Hagerman y Austin (1986). HCl (cuadros rojos), ácido acético (rombos azules). Los valores mostrados son el resultado de las medias de tres repeticiones.

Debido a que la proteína obtenida estaba muy diluida en comparación con la muestra inicial y con el extracto crudo, se aplicó la fórmula (1) denominada Corrección para la Dilución:

$$\frac{\text{Actividad PME x FD}}{\text{Actividad del E.C.}} \times 100\% \quad (1)$$

Actividad PME= Actividad de la PME purificada

FD= Factor de Dilución, valor que representa el número de veces que fue diluida la proteína. Este valor se obtuvo dividiendo el volumen del Buffer entre el volumen de la proteína.

Actividad del E.C.= Actividad del PME en el Extracto Crudo

3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS

Para este análisis se utilizó el método de Bradford (1976), que consiste en tomar 0,1 ml de la muestra del extracto al cual se le añadirá 5 ml del reactivo de Bradford; la mezcla se dejará en reposo durante 10 minutos; pasado este tiempo se procedió a medir la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro Marca GENESYS 20; se utilizó como blanco 0,1 ml de agua con 5 ml de reactivo de Bradford, luego se llevó a una curva patrón, elaborada con albúmina bovina (BSA), para determinar el contenido de proteínas.

4. PURIFICACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE LA PME A PARTIR DE EXTRACTOS PROTEICOS DE FRUTOS

4.1. Precipitación de las proteínas con sulfato de amonio

Se realizó la precipitación con sulfato de amonio de acuerdo a la metodología planteada por Guadarrama y Rivas (1990) con algunas modificaciones.

La precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es un método de purificación de la proteína que altera la solubilidad de ésta. El sulfato de amonio

induce a que el agua compita entre la disolución de esta sal o de la proteína causando que precipite la proteína.

El sulfato de amonio induce a un aumento de la fuerza iónica del medio y también provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan (Cooper, 1984).

El sulfato de amonio, es muy soluble en agua y no tiene ningún efecto nocivo sobre la actividad enzimática. Se utiliza en forma sólida agregándose directamente a la solución de proteína o como solución acuosa saturada al 100% que luego se añade hasta obtener la concentración requerida.

Se probaron dos metodologías para lograr determinar cuál era la más eficiente y que se explican a continuación (Cooper, 1984).

4.1.1. Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido:

Para precipitar la proteína con el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se utilizó la metodología de Guadarrama y Rivas (1990) y se procedió de la siguiente manera (Ver Figura 11):

1. Se utilizaron 25 mL de solución de proteína para cada tratamiento.
2. Se procedió a determinar los gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que debían agregarse a la proteína, de acuerdo al Nomograma de Cooper (1984).
3. Se agregó, a los 25 mL de solución de proteína, la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ respectiva de acuerdo al siguiente cuadro:

Cuadro 2. Cantidad de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que debe agregarse para precipitar las proteínas a diferentes concentraciones.

CONCENTRACIÓN PARA PRECIPITAR (EXPRESADA en %)	VOLUMEN DE PROTEÍNA (Expresada en mL)	CANTIDAD DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Expresada en g)
5	25	0,7
10	25	1,4
20	25	2,85
25	25	3,6
30	25	4,4
35	25	5,23
45	25	6,93
55	25	8,78
65	25	10,75
75	25	12,9
80	25	14,02

4. Se mezcló el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con la proteína, se agitó suavemente y se dejó en reposo por 30 minutos a 4 °C.
5. Se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos. Se separó el sobrenadante del pellet. Se almacenó el sobrenadante y se lavó el pellet agregando 1000 μL de Buffer Tris 0,1 M; se centrifugó a 10000 rpm x 10 minutos.
6. Se recuperó el pellet y se resuspendió en 5 mL de Buffer PBS 0,1 M. El pellet y el sobrenadante fueron almacenados a -20°C para posteriormente medir la actividad de la PME.
7. Se determina la actividad de la PME en cada fracción, las muestras que tengan actividad de la PME serán procesadas para la desalinización.

4.1.2. Precipitación con solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

También se probó la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en solución. Para la realización de este procedimiento lo primero que se hizo fue preparar la solución de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturada, es decir al 100%. Se procedió de la siguiente manera (Ver Figura 11) (Cooper, 1984):

1. Se preparó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 100% : se mezclan 7,67 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con agua destilada hasta completar un volumen de 10 mL de solución; se agita

fuertemente (guardar la solución en un frasco color ambar). Esta solución se prepara a temperatura ambiente.

- Luego de preparar la solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturada se procedió a preparar las diferentes soluciones para precipitar a diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$V_a = \frac{C_o V_o - C_i V_o}{C_i - C_a}$$

V_a = volumen de la disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que debe agregarse

V_o = volumen inicial de la solución que contiene la proteína

C_a =concentración de la disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que debe añadirse, expresada en porcentaje

C_o = concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ inicial

C_i = concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a la que se desea precipitar

- Estos cálculos permitieron determinar las cantidades de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que debían añadirse para realizar las precipitaciones a diferentes concentraciones. Dichos resultados se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Cantidad de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) líquido que debe agregarse para precipitar la PME.

CONCENTRACIÓN A LA QUE SE VA A PRECIPITAR (%)	VOLUMEN DE PROTEÍNA (mL)	VOLUMEN DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (μL)
5	1	53
10	1	111
15	1	176
20	1	250
25	1	333
30	1	429
35	1	538
45	1	810
55	1	1220
65	1	1860
75	1	3000
80	1	4000

- Se prepararon las soluciones para precipitar, de acuerdo al cuadro anterior y se dejaron en reposo durante 30 minutos a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo de reposo se procedió a centrifugar a 10000 rpm durante 30 minutos. Se separó el pellet del sobrenadante. Se almacenó el sobrenadante a -20°C.
- Se lavó el pellet agregando 1000 μL de Buffer Tris 0,1 M, se centrifugó a 10000 rpm x 10 minutos. Se recuperó el pellet y se resuspendió en 5 mL

Buffer PBS 0,1 M. El pellet y el sobrenadante fueron almacenados a -20°C para posteriormente probar la actividad de la PME.

- Se determinó la fracción que tenía actividad de la PME y se almacenaron para luego proceder a la desalinización.

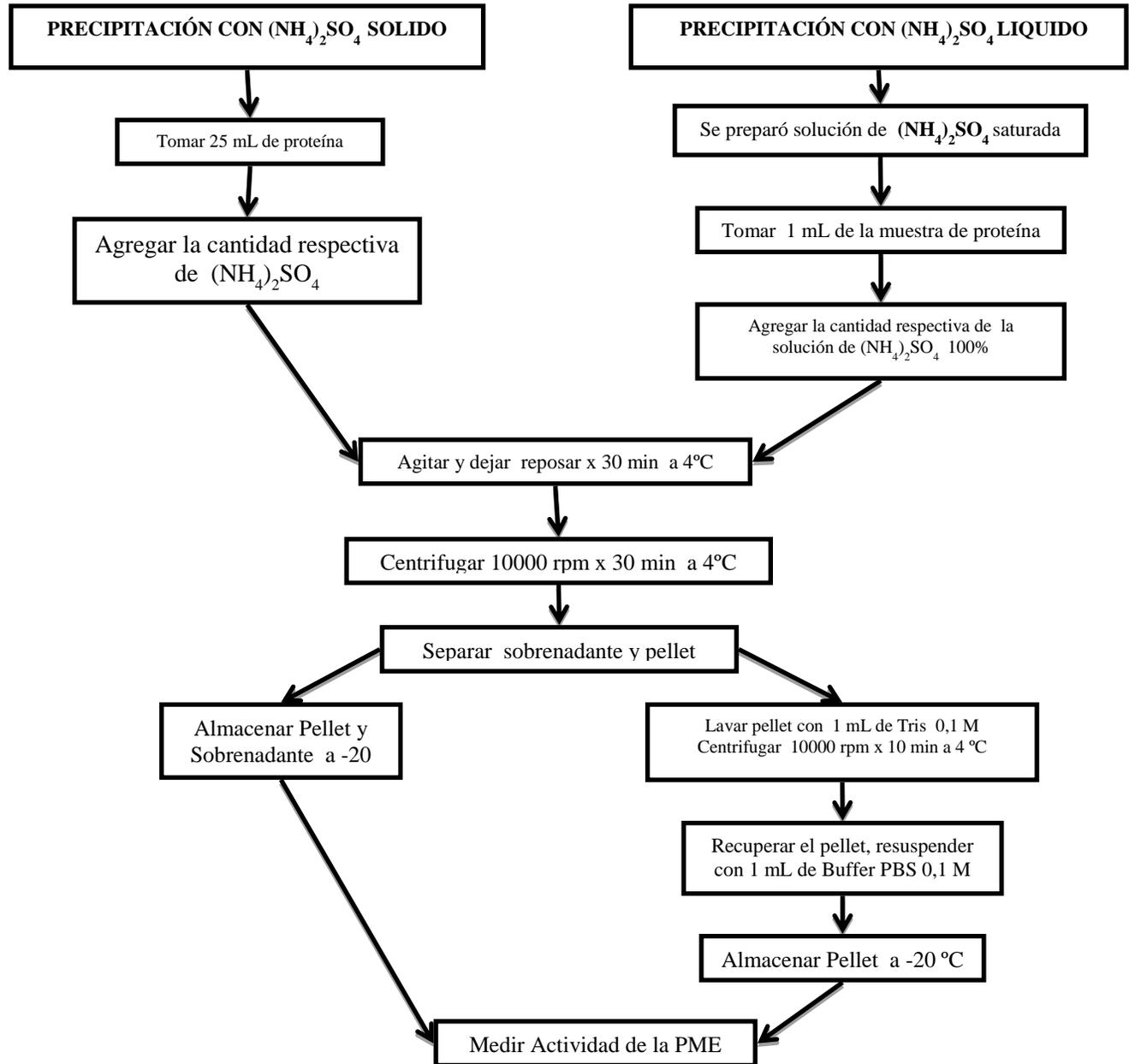


Figura 11. Esquema del procedimiento realizado para la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

4.2. Cromatografía en Gel Sephadex G-50

La técnica de cromatografía por filtración permite hacer una separación de las muestras de acuerdo a su peso molecular y además brinda la oportunidad de remover el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la muestra de proteínas. Se procedió a realizar la cromatografía a las muestras que mostraron picos de actividad de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se probaron dos técnicas de cromatografía con gel Sephadex G-50 para la desalinización, las cuales son: cromatografía por fraccionamiento y cromatografía bacht.

4.2.1. Cromatografía por Fraccionamiento en Gel Sephadex G-50:

Para la realización de la desalinización se procedió de acuerdo a la metodología de Guadarrama y Rivas (1990) con algunas modificaciones:

1. Se midió un volumen de 8 mL de gel Sephadex G-50 y 2 mL de la muestra, en una relación gel/muestra de 4:1.
2. Se hidrató el gel en Buffer PBS 0,1 M durante 5 horas a 4 °C. Una vez hidratado el gel se procedió a verterlo en una columna de 20 cc de capacidad y se esperó a que se estabilizara la resina.
3. Se lavó la columna con 500 mL del Buffer PBS 0,1M y se conectó la columna a la fuente de elución con la solución de Buffer PBS 0,1 M y se probó la velocidad de flujo, 3 mL por minuto.
4. Se añadió la muestra al gel.
5. Inicialmente se colectaron 3 fracciones de 15 mL cada una. Luego se colectaron 97 fracciones de 5 mL cada una.
6. Se probó la actividad de la PME en las fracciones colectadas.
7. Se almacenaron las muestras que mostraron actividad de la enzima para hacer geles SDS-PAGE y determinar el contenido de proteína.

4.2.2. Cromatografía sin fraccionamiento ('Bacht') en Gel Sephadex G-50:

Para la realización de la cromatografía 'bacht' se procedió de la siguiente forma:

1. Se determinó un volumen de 5 mL de gel Sephadex G-50 y 1 mL de la muestra, en una relación gel/muestra de 5:1.
2. Se hidrató el gel en Buffer PBS 0,1 M durante 5 horas a 4 °C. Una vez hidratado el gel se procedió a verterlo en una columna de 20 cc de capacidad y se esperó a que se estabilizara la resina.
3. Se lavó la columna con 500 mL del Buffer PBS 0,1M.
4. Se añadió 1mL de la muestra al gel y se agregaron 3 mL de Buffer PBS 0,1 M y se selló la columna con un tapón de goma y papel film.
5. Se montó la columna en el Rotamix, a una velocidad de 8 rpm x 1 hora. Transcurrido el tiempo se procedió a detener la rotación y se dejó reposar durante una hora y se destapó la columna para proceder a coleccionar la muestra. Se añadieron 5 mL de Buffer PBS 0,1M a la columna y se coleccionó la solución que fluyó, esto se repitió 2 veces más, hasta obtener un total de 4 muestras.
6. Se almacenaron las muestras que mostraron actividad de la enzima para hacer geles SDS-PAGE y determinar el contenido de proteína.

5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CINÉTICA DE LAS ISOENZIMAS DE LA PME

5.1. Caracterización Molecular

5.1.1. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (PAGE) "Proteína nativa"

Para determinar la condición nativa de la enzima PME se procedió de la siguiente manera:

1. Se lavaron las láminas de vidrio, se dejaron secar y se limpiaron con etanol. Se armaron los vidrios para verter la solución en ellos.

2. Se procedió a preparar el gel inferior al 10%: se colocó en un beaker 3,33 mL de solución al acrilamida:biscacrilamida (30%:0,08%), 1,67 mL de 2,256M Tris HCl pH 8,8; 1,17 mL de Glicerol al 85%, 3,83 mL de agua destilada, 50 μ L de PSA 10% (persulfato de amonio), 20 μ L de TEMED.
3. Una vez polimerizado el gel inferior se procedió a preparar el gel superior al 6%; Para esto se agregó 1 mL de solución acrilamida:biscacrilamida (30%:0,08%), 840 μ L de 0,7432M Tris HCl pH 6,8; 3,17 mL de de agua, 10 μ L de TEMED y 30 μ L de PSA 10%.
4. Cuando están listos los geles se procede a instalarlos en las cámaras de electroforesis vertical. Se utiliza buffer 25mM Tris, 192mM Glicina pH 8, para la corrida.
5. Se prepararon las muestras de proteína purificada, para lo cual se tomaron 100 μ L de la solución de PME + 10 μ L de glicerol 85% con azul de bromofenol.
6. Se agregan 20 μ L de la muestra al pozo y se procede a realizar la electroforesis durante 120 minutos. Al inicio la fuente de poder se gradúa a 70 voltios y una vez que las muestras pasaron al gel inferior se aumentó a 90 v.
7. Una vez finalizada la corrida se procedió a revelar los geles con nitrato de plata de acuerdo a la metodología establecida por el Laboratorio de Genética Molecular (Arnao, 2003).

5.1.2. Peso molecular

Electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE

Se realizó según la metodología de Laemmli (1970) estandarizada por el Laboratorio de Genética Molecular de la UCV. Las enzimas purificadas fueron sometidas a electroforesis en vertical en geles discontinuos de poliacrilamida en un aparato Marca Pharmacia- LKB. La visualización de las proteínas se logró a través de la tinción con nitrato de plata (Arnao, 2003).

La electroforesis es una técnica de separación de una muestra en un campo eléctrico y su movilidad y desplazamiento van a depender de su tamaño y de su carga

eléctrica. Esta técnica nos permitió determinar el peso molecular de la proteína y la estructura de la misma. Para aplicar esta técnica en primer lugar se prepararon los geles siguiendo la metodología estandarizada en el Laboratorio de Genética Molecular de la UCV (Arnao, 2003), de la siguiente forma:

Geles discontinuos de poliacrilamida:

1. Se lavaron las láminas de vidrio, se dejaron secar y de limpiaron con etanol. Se armaron los vidrios para verter la solución en ellos.
2. Se procedió a preparar el gel inferior al 15%: se colocó en un beaker 2 mL de tampón 1,67 mL de 2,256M Tris HCl pH 8,8, conteniendo 0,4% de SDS (sodio dodesilsulfato); 1,17 mL de Glicerol al 85%, 4 mL de solución acrilamida:biscacrilamida (30%:0,08%), 2 mL de agua destilada, 80 μ L de una solución al 10% de PSA (persulfato de amonio), 40 μ L de TEMED.
3. La mezcla preparada en el paso anterior se vertió en los vidrios y se esperó a que gelificara. Una vez gelificado el gel inferior se procedió a preparar el gel superior: se colocó en un beaker 0,66 mL de tampón 0,7432M Tris HCl pH 6,8, 0,4 mL de solución acrilamida:biscacrilamida (30%:0,08%), 1,6 mL de agua destilada, 30 μ L de 10% PSA y 15 μ L de TEMED.
4. La mezcla anterior fue vertida sobre el gel inferior y se esperó a que polimerizara. Una vez gelificados se procedió a realizar la corrida electroforética.

Corrida electroforética

1. Los geles fueron instalados en la cámara. Se llenó la cámara con buffer SDS-PAGE (25mM Tris, 192mM Glicina pH 8, 0,1% SDS)
2. Las muestras de la enzima fueron preparadas tomadas 50 μ L de la muestra y 50 μ L de DB 2X (40 mM Tris-HCL pH 6.8, glicerol 20%, 2% sodio dodecil sulfato (SDS), β -mercaptoetanol 0.2%, 5 μ L de azul de bromofenol).
3. Se colocaron 20 μ L de la muestra en cada uno de los pozos. Se utilizó un marcador de peso molecular que va desde 66 hasta 14.2 kDa (BSA 66 kDa, Gliceraldehído 3-fosfato 36 kDa, Albúmina de huevo 25 kDa, Anhidrasa carbónica 29 kDa, Tripsinogeno 24kDa y α -lacto-albúmina 14.2 kDa)

4. Se encendió la cámara y se procedió a realizar la corrida en buffer de corrida (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, SDS 0.1 %), de acuerdo a los siguientes parámetros: 10 mA por cada gel durante 15 minutos y después se aumentó 20 mA por cada gel. La corrida tuvo una duración de 90 minutos.
5. Se extrajeron los geles de los vidrios y se procedió a hacer el revelado.

Revelado con plata de los geles de proteínas totales

El revelado de los geles o también llamado tinción de los geles es una técnica que permite observar las bandas de las proteínas presentes en cada una de las muestras. Este proceso se realizó con Nitrato de plata, ya que es una técnica más sensible y permite ver bandas con poca concentración de proteína. Una vez culminada la electroforesis de los geles de poliacrilamida para proteínas totales se procedió a revelar los geles de acuerdo a la metodología del Laboratorio de Genética Molecular de la UCV (Arnao, 2003) de la siguiente manera:

1. Se colocó el gel en la solución de fijación durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo se lavó el gel en etanol al 50% tres veces, durante 20 segundos cada vez.
2. Se incubó el gel en la solución de tiosulfato de sodio 0,01%, durante un (01) minuto.
3. Luego se enjuagó el gel 3 veces con agua destilada, 20 segundos cada vez.
4. Se incubó el gel en la solución de nitrato de plata durante 20 segundos.
5. Se enjuagó el gel 2 veces con agua destilada, 20 segundos cada vez.
6. El gel fue colocado en solución de carbonato de sodio para hacer el revelado, se agitó suavemente, se dejó allí hasta observar las bandas. Una vez que se observaron las bandas en el gel se eliminó la solución de revelado y se agregó la solución de parada.
7. Por último se lavó el gel con agua destilada y se secó el gel sobre papel para secar geles (PROMEGA).

8. Se determinó el peso de las isoenzimas de la PME mediante un método semi-logarítmico utilizando a la Peroxidasa (44 kDa) y a la Ribo-nucleasa B (15 kDa) como marcadores de peso molecular.

Cuadro 4. Soluciones utilizadas para el revelado en plata de los geles de poliacrilamida

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
FIJACIÓN	Metanol 50% Ácido Acético 12% Formaldehído 0,5 mL/L
TIOSULFATO DE SODIO	2 mL Tiosulfato de sodio 2% H ₂ Od 198 mL
NITRATO DE PLATA	4 mL Nitrato de plata 10% Formaldehído 150 µL Completar con H ₂ Od hasta 200 mL
REVELADO	40 mL Carbonato de sodio 6% Formaldehído 20 µL 8 µL Tiosulfato de sodio 2%

5.1.3. Detección de la Glicosilación

5.1.3.1. Western Blotting

Para determinar si las isoenzimas de la PME son glicosiladas se procedió a realizar un Western Blotting. Se utilizó la afinodetección con la ConA y la inmunodetección con la Peroxidasa para el revelado.

Para iniciar la técnica de Western Blotting se procedió de la siguiente forma:

1. Se prepararon 2 geles discontinuos de poliacrilamida para proteínas totales SDS-PAGE.
2. Se realizó una corrida electroforética en Geles SDS-PAGE con las muestras de FNR, FR, Marcador de Peso Molecular y se utilizó como blanco para la afinodetección la Ribonucleasa B y para la inmunodetección la Peroxidasa.

3. Una vez culminada la electroforesis se procedió a desmontar los vidrios y extraer los geles.
4. Se realizó la transferencia de las proteínas del gel SDS a la membrana de nitrocelulosa para Western. Para esto se sobrepuso cada gel sobre la membrana y se llevó a una electroforesis horizontal de transferencia por un tiempo de 2 ½ horas aproximadamente.
5. Se extrajeron los geles y la membrana. Se procedió a revelar las bandas de proteínas sumergiendo la membrana en un solución al 0,5% de Rojo de Ponceau.

5.1.3.2. Cromatografía de Afinidad con la ConA-Sepharosa

Para determinar si las isoenzimas de la PME de frutos de nisperos son glicosiladas se aplicó la Cromatografía de afinidad con la ConA-Sepharosa. Se aplicó la siguiente metodología:

Lavado de la Columna de Sepharosa:

1. Se agregó a la columna 4 mL de la ConA Sepharosa.
2. Se lavó tres lavados con Buffer PBS 3X (Buffer fosfato monohidratado y bihidratado: KH_2PO_4 60mM pH 7,4; K_2HPO_4 60mM pH 7,4; NaCl 0,45 M).
3. Lavado con tampón glicina pH 2.3-2.4 (0,75 g de glicina disueltos en 200 mL de agua y calibrar pH a 2.3-2.4).
4. Hacer tres lavados con PBS 3X.
5. Hacer dos lavados con PBS 1X + CaCl_2 1mM + MgCl_2 1mM.

Cromatografía de afinidad:

Después de preparada la columna se procedió a realizar la cromatografía, como se describe a continuación:

1. A la columna se le agregaron 500 μL de la muestra de las isoenzimas y además se agregaron 2 mL de Buffer PBS.
2. La columna se cerró con un tapón de plástico y con film y se colocó en el rotamix a 26 rpm a 4 °C durante toda la noche.

Elución de la Columna y Obtención de la Muestra

1. Se detuvo la rotación y se esperó a que se estabilizara el contenido de la columna.
2. Se colectó la Fracción No Retenida (FNR) y se almacenó a -20 °C.
3. La columna fue lavada cinco veces con PBS 1X + 0,5MNaCl
4. Se agregó a la Sepharosa α Metil Manosa 0,3 M (α MM), en proporción 1:1 con la ConA-Sepharosa, es decir 4 mL de α MM.
5. Se incubó durante 1 hora en rotación a 26 rpm.
6. Se dejó eluir y así se obtuvo la Fracción Retenida (FR)
7. Se probó la actividad de la PME en la fracción no retenida y en la retenida.
8. Se almacenaron la muestras a -20 °C.

Lavado de la Columna con la ConA-Sepharosa:

Este procedimiento permite lavar y reconstituir la columna para utilizarla para otros ensayos:

1. Lavar dos veces con 200 mL de PBS + 1mM Mg^{+2} , 1mM + Ca^{+2} .
2. Lavar una vez con 200 mL de PBS 1X.
3. Lavar una vez con 200 mL de TTBS pH 7,5 (100mM Tris; 1 mL Tween, 0,5MNaCl).

4. Lavar una vez con 200 mL de TBS pH 7,5 (100mM Tris; 0,5MNaCl).
5. Lavar una vez con 100 mL de agua.
6. Lavar tres veces con PBS + 1mM Mg⁺², 1mM + Ca⁺².
7. Lavar tres veces con PBS.
8. Se guardó la columna para otros análisis.

4.1.3.2. Kit de Detección de Glicosilación.

Otra técnica utilizada para determinar la glicosilación de las isoenzimas fue con el Kit de Detección de Glicosilación (SIGMA GLYCOPRO) es cual es una modificación del Método PAS. Para lo cual se procedió de la siguiente forma:

1. Se preparó un gel SDS-PAGE al 15 % y se hizo la electroforesis con las muestras de FR obtenidas en la cromatografía de afinidad con la ConA - Sepharosa.
2. Una vez culminada la electroforesis se sumergió el gel en la solución de fijación (Kit SIGMA GLYCOPRO) y se agitó suavemente, durante 60 minutos. Se extrajo esta solución y se lavó el gel dos veces, con agua ultrapura, cada lavado de 10 minutos con agitación suave.
3. El gel fue transferido a la solución de Oxidación (Kit SIGMA GLYCOPRO) y se incubó durante 60 minutos. Se extrajo la solución y se lavó el gel dos veces, con agua ultrapura, cada lavado de 20 minutos con agitación suave.
4. La solución anterior fue descartada y se procedió a sumergir el gel en una solución de tñido "Reactivo de Schiff" (Kit SIGMA GLYCOPRO) durante 2 horas.
5. Se transfirió el gel a la solución de reducción (Kit SIGMA GLYCOPRO) y se dejó allí durante 2 horas.
6. El gel fue lavado con agua ultrapura y el agua se cambió hasta que las bandas se intensificaron.
7. Para almacenar el gel se sumergió en solución de ácido acético al 5%.

5.2. Caracterización Cinética de las isoenzimas de la PME

5.2.1. Determinación de las constantes cinéticas:

Una vez culminado el proceso de purificación de la enzima, se procedió a realizar la determinación de los parámetros cinéticos de la PME. Estos parámetros indican las condiciones óptimas de funcionabilidad de la enzima en cuanto a la concentración del sustrato, el pH y la temperatura. El primer paso para determinar la cinética es analizar la concentración de sustrato óptima.

Se determinó la actividad enzimática de acuerdo al método espectrofotométrico de Hagerman y Austin (1986) con variaciones en las concentraciones de la pectina cítrica. Experimentalmente se estableció un grupo control, el blanco y los grupos experimentales con tres repeticiones de cada uno.

5.2.1.1. Concentración óptima de sustrato

Para este ensayo se procedió de la siguiente forma:

1. Se preparó la pectina cítrica en agua destilada a diferentes concentraciones para formar cada grupo de tratamiento (Ver Cuadro 5):

Cuadro 5. Diferentes concentraciones de pectina cítrica utilizadas para determinar la concentración óptima de sustrato para la PME.

CONCENTRACIÓN DE PECTINA CÍTRICA (EXPRESADA EN %)	CONCENTRACIÓN DE PECTINA CÍTRICA (EXPRESADA EN mg/mL)
2	20
1,5	15
1	10
0,8	8
0,6	6
0,4	4
0,2	2
0,1	1
0,05	0,5
0,025	0,25
0,0125	0,125
0,006	0,06

2. Se preparó la mezcla de reacción de la siguiente forma:
938 μL de pectina cítrica + 282 μL de enzima + 20 μL de Azul de Bromofenol al 0,1%.
3. En el grupo control se sustituye la enzima purificada por el extracto crudo. El blanco se preparó sustituyendo la enzima por agua.
4. Todos los tubos fueron incubados en un baño térmico a 30°C x 1 hora. Culminada la incubación se detiene la reacción introduciendo los tubos en una mezcla de agua + hielo. y se procedió a leer la Absorbancia a 620 nm para medir la actividad.

Con los resultados obtenidos se comprobó que las isoenzimas tienen una cinética michaeliana, luego para determinar la constante Michaeliana (K_m) y la Velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) se utilizó el gráfico de Lineweaver-Burk (Lehninger, 1982; Bohinski, 1991).

5.2.2. pH óptimo de reacción:

Para determinar el pH óptimo de acción de la PME se procedió de la siguiente forma (Cameron y Grohman, 1995; Alexandre y col., 1997).

1. Se preparó la pectina cítrica a diferentes pHs, los cuales fueron: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. Para ajustar el pH del sustrato se utilizó HCl o NaOH.
2. Se establecieron los grupos control, los grupos experimentales y los blancos. En el grupo control se sustituye la enzima purificada por el extracto crudo. El blanco se preparó sustituyendo la enzima por agua. Los grupos experimentales se prepararon variando el pH de la pectina cítrica. Cada grupo experimental tiene tres repeticiones.
3. Se preparó la mezcla de reacción de la siguiente forma:
938 μL de pectina cítrica + 282 μL de enzima + 20 μL de azul de bromofenol al 0,1%.
4. Se incubaron cada uno de los grupos a los diferentes pHs por una hora. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a sumergir las muestras en un baño de agua + hielo.

5. Se midió la absorbancia a 620 nm con un espectrofotómetro Marca GENESYS 20 y se calculó el valor de la actividad de la PME de acuerdo a la formula ya establecida.

5.2.3. Temperatura óptima:

Para evaluar la temperatura óptima se determinó la actividad de cada enzima a diferentes temperaturas de incubación (Cameron y Grohman, 1995). Para determinar este parámetro se procedió de la siguiente forma:

1. Se preparó la pectina cítrica de acuerdo al resultado obtenido para la concentración de sustrato óptima.
2. Se preparó la mezcla de reacción de la siguiente forma:
938 μL de pectina cítrica (PC) + 282 μL de enzima + 20 μL de azul de bromofenol al 0,1%.
3. Se establecieron los grupos control, los grupos experimentales y los blancos. En el grupo control se sustituye la enzima purificada por el extracto crudo. El blanco se preparó sustituyendo la enzima por agua. Los grupos experimentales se prepararon de la siguiente forma: 938 μL de pectina cítrica + 282 μL de enzima + 20 μL de Azul de Bromofenol al 0,1%. Cada grupo experimental tiene tres repeticiones.
4. Los tratamientos de temperatura (expresados en $^{\circ}\text{C}$) fueron los siguientes: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70. Se incubaron cada uno de los grupos, a las diferentes temperaturas, durante una hora.
5. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a sumergir las muestras en una baño de agua + hielo.
6. Se midió la absorbancia a 620 nm con un espectrofotómetro Marca GENESYS 20.
7. Se calculó el valor de la actividad de la PME de acuerdo a la formula ya establecida.

5.3. Estabilidad de las enzimas al calor

Este procedimiento tiene la finalidad de medir la actividad residual de la enzima después de haber sido sometida a altas temperaturas por tiempos variables (Cameron y Grohman, 1995).

Luego se procedió a medir la actividad enzimática residual, de acuerdo a la metodología planteada (Hagerman y Austin, 1986), considerando la concentración, temperatura y pH óptimos obtenidos en esta investigación.

Para determinar la estabilidad al calor de la PME se procedió de la siguiente manera:

1. Se tomó 1 mL de la enzima purificada, para cada tratamiento, y fue sometida a diferentes temperaturas de 90 °C y 100 °C y a tiempos de 1, 5, 10 y 15 minutos. Cada grupo experimental tuvo tres repeticiones.
2. Una vez transcurrido el tiempo establecido se sumergen los tubos en una mezcla de agua + hielo y se procede a tomar la muestra para hacer el ensayo de actividad residual.
3. Se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a los parámetros establecidos de concentración de sustrato y pH óptimos: pectina cítrica (PC) 0,5 mg/mL a pH 3,5. La mezcla de reacción fue la siguiente:
938 µL de PC + 282 µL de enzima + 20 µL de azul de bromofenol al 0,1%.
4. Se preparó el grupo control sustituyendo la enzima purificada por el extracto crudo y el blanco se preparó sustituyendo la enzima por agua.
5. Se incubaron cada uno de los grupos a 30 °C x 1 Hora.
6. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a sumergir las muestras en una baño de agua + hielo.
7. Se midió la absorbancia a 620 nm con un espectrofotómetro Marca GENESYS 20.

En el siguiente esquema se presenta un resumen de las técnicas utilizadas durante la purificación de la PME a partir de la pulpa de frutos de níspero.

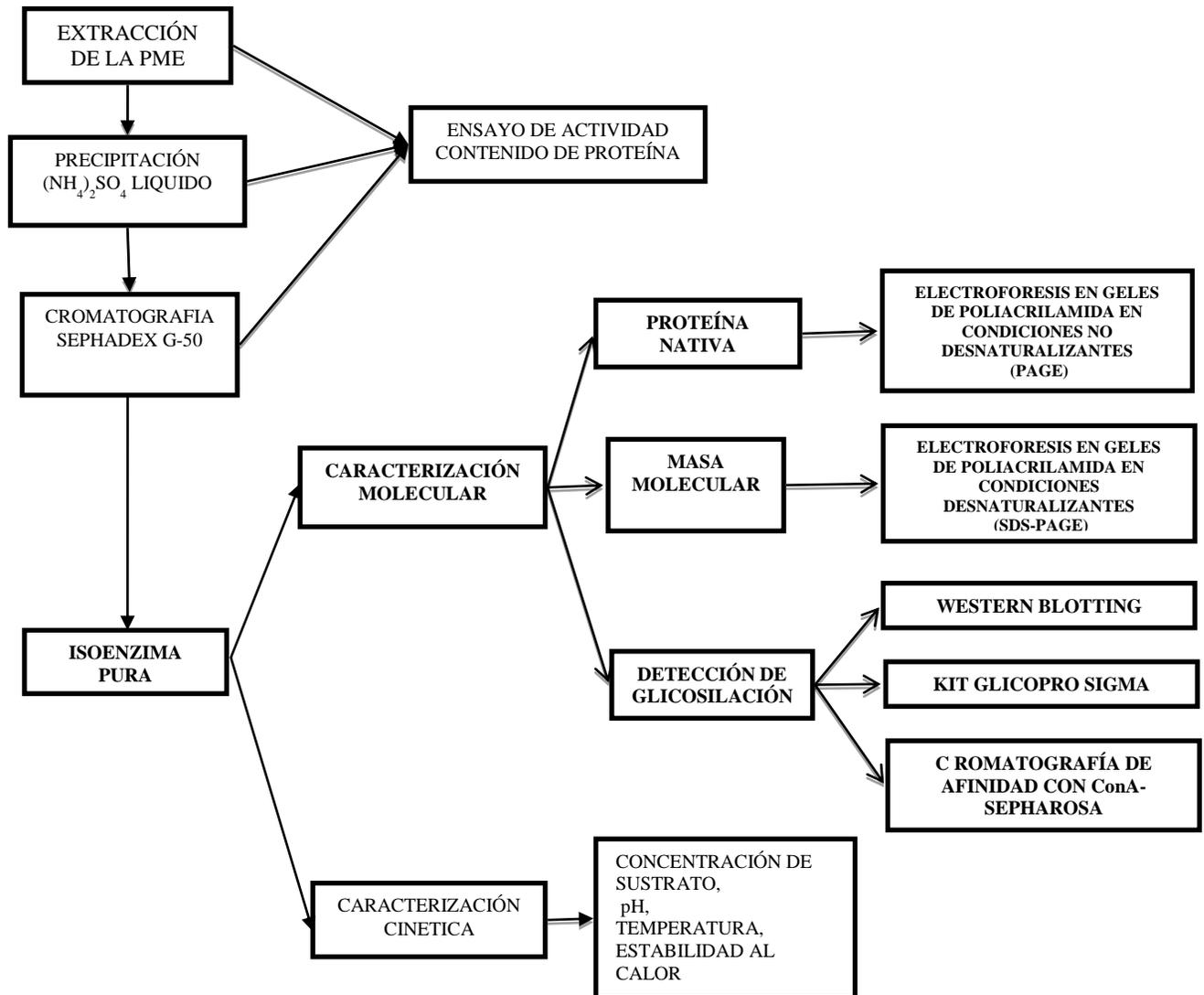


Figura 12. Esquema general de la purificación y análisis de la PME de frutos de níspero de la variedad prolífico.

6. DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño de la investigación fue completamente aleatorizado, con tres repeticiones para cada ensayo (Monzón, 1992). Posteriormente se realizaron los Análisis de Varianza (ANAVAR) y Pruebas de Medias correspondientes. Para todos los análisis de varianza se verificaron los supuestos del análisis homogeneidad y normalidad. El Programa utilizado fue el MSTAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DEL DESARROLLO DE FRUTOS DE NÍSPERO

El análisis del desarrollo de los frutos de níspero se dividió en dos Fases: **Fase I:** Fase Floral: que comprende la formación de yemas florales (YF), la antesis y la fecundación y la **Fase II:** Fructificación: crecimiento y diferenciación de los frutos, en las cuales se tomaron medidas del largo y del ancho del fruto (Figura 13).



Figura 13. Planos de medición en los frutos

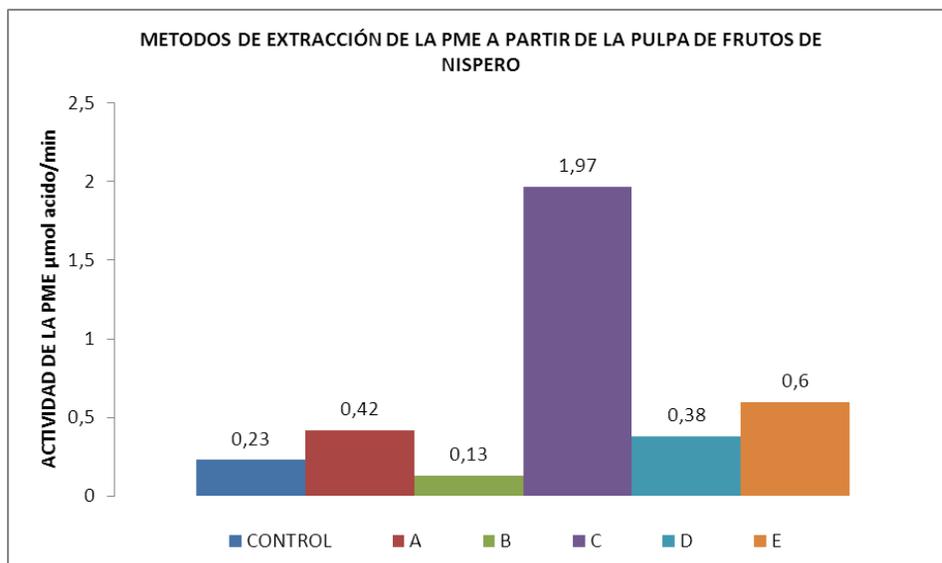
En la Fase Floral o Fase I se forma la yema floral (YF). La antesis ocurre entre los días 21 y 23, prolongándose la apertura de la flor hasta 10 días contados a partir de la antesis (dda: días después de la antesis) durante los cuales ocurre la fecundación o la abscisión. La **Fase II** inicia con la etapa de inmadurez o de frutos verdes, esta fase de crecimiento tiene una duración de 210 dda. La siguiente etapa de desarrollo del fruto es la de madurez fisiológica la cual inicia a los 240 dda y culmina a los 270 dda. Los frutos fueron colectados a los 240 dda, es decir, en la fase de madurez fisiológica. Además se consideró que estuviesen sanos, es decir, sin ataques de insectos, hongos y sin daños en la pulpa.

2. EXTRACCIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE LA PME A PARTIR DE FRUTOS DE NÍSPERO

Una vez aplicados cada uno de los procedimientos de extracción se procedió a medir la actividad de la PME y el contenido de proteínas totales.

Los resultados obtenidos para la actividad de la PME, extraída por diferentes métodos se presentan en la Gráfica 4, donde se puede observar que el mejor método para la extracción de la PME, es el **Método C** ya que se obtuvo un valor de Actividad de 1,97 μmol , ácido/min.

El análisis de varianza realizado indica que hay diferencias altamente significativas en los métodos aplicados, por lo cual se realizó la Prueba de Medias correspondiente la cual indica que el Método C es el mejor para ser aplicado en la extracción de la PME (Ver Anexo 1 y Cuadro 6).



Gráfica 4. Actividad de la PME extraída por diferentes métodos a partir de la pulpa de frutos de Níspero.

Cuadro 6. Prueba de Medias de la actividad de la PME y la concentración de proteínas en las muestras extraídas con diferentes Métodos de extracción.

Método de extracción	Actividad PME		Concentración de Proteínas (mg/mL)	
control	0,233	D	201,6	E
A	0,423	C	118,0	F
B	0,127	D	210,0	D
C	1,970	A	231,0	C
D	0,383	C	299,0	A
E	0,603	B	291,0	B

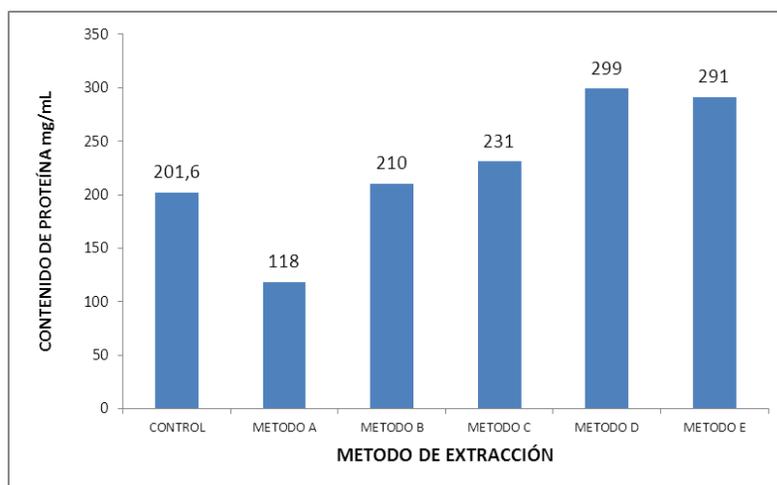
La actividad obtenida en el **Método C** representa el 856 % respecto al grupo control, lo cual indica un alto rendimiento en la extracción; este resultado también permite deducir que se mantuvo la integridad molecular y catalítica de la enzima. Este resultado tal vez sea debido a la aplicación del Nitrógeno Líquido (N₂ L) ya que la PME es una proteína de pared celular y está fuertemente adherida a ésta. El N₂ Líquido permite solubilizar a la PME. Otra ventaja que posiblemente ofrece el N₂ Líquido es que permite neutralizar el efecto del látex presente en la pulpa.

Al comparar el valor obtenido en el **Método C** con los otros métodos de extracción se puede observar una gran diferencia en la actividad de la enzima, por ejemplo en los métodos A y E los valores son de 0,42 y 0,6 μmol , ácido/min, respectivamente, lo cual representan sólo el 21,3 % y el 30,4 % de actividad en relación al método C. Sin embargo al ser comparados con la actividad obtenida en el grupo control, el método A y el E permitieron una mayor extracción de la enzima ya que la actividad obtenida representa un 182% y 260% en relación al grupo control.

De igual manera los **Métodos B y D** permiten extraer la enzima, pero los valores de actividad son muy bajos en relación al **Método C**. Otra de las ventajas que ofrece el **Método C** en relación a los utilizados en otras investigaciones (Ver Cuadro 1), es el tiempo invertido en la extracción, el cual es sólo de 2 horas máximo, en comparación con los otros, donde el tiempo oscila entre 6 a 24 horas.

Los resultados obtenidos para el contenido de proteínas fue expresado en miligramos de proteínas por cada mililitro de muestra (mg/ml) (Ver Grafica 5). En el **Método D** se logra extraer la mayor cantidad de proteínas con una valor de 299 mg/mL, seguido del **Método E** (291 mg/mL de proteínas). Sin embargo, a pesar que el **Método C** extrajo 231 mg/mL este extracto presenta mayor actividad para la PME. Es decir, los **Métodos D** y **E** permiten extraer mayor cantidad de proteína, pero cuando se determina la actividad de la PME se puede observar claramente que la actividad es muy baja en relación al **Método C**.

Estos resultados permiten inferir que en los **Métodos D** y **E** no se mantiene la integridad estructural y catalítica de la PME, debido posiblemente a que la metodología no es eficiente en la extracción de la PME, ya que es una enzima adherida a la pared celular.



Grafica 5. Contenido de proteína de los extractos crudos de pulpa de níspero procesados por diferentes métodos.

Se realizó el análisis de varianza (Ver Anexo 1) para el contenido de proteínas y método de extracción, obteniéndose diferencias altamente significativas, por consiguiente se realizó la Prueba de Medias, donde se obtuvo que el Método C

permite obtener mayor actividad de la PME A, sin embargo no es el mejor en cuanto a la concentración de proteínas (Ver Cuadro 6).

El mejor método para extraer la PME es el C, obteniéndose 231mg/mL de proteínas y una actividad catalítica muy alta con un valor de 1,97 μmol ácido/min.

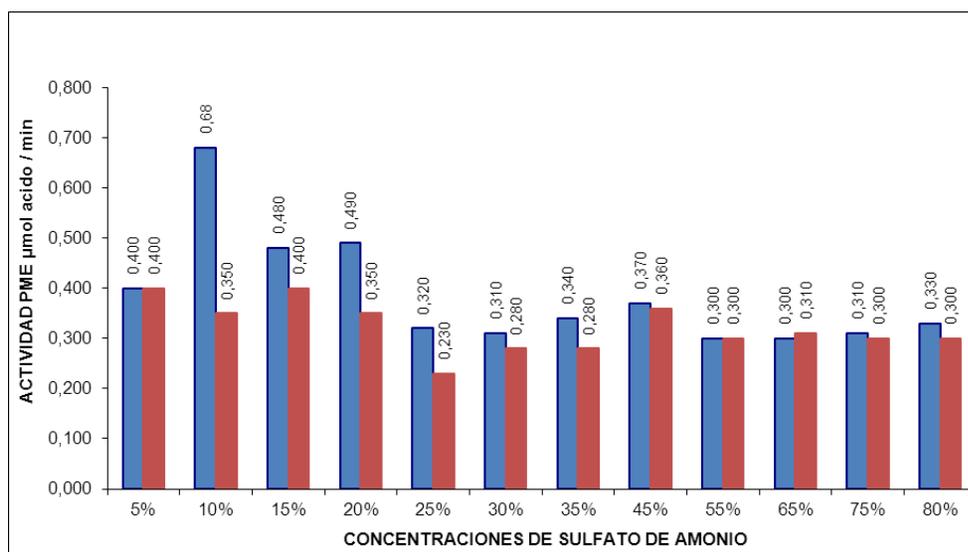
Los resultados obtenidos permiten concluir que el **Método C** es el más eficiente en la extracción de la enzima debido a la calidad de la enzima obtenida, a la cantidad de la enzima y al tiempo de procesamiento empleado para la extracción.

3. PURIFICACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE LA PME A PARTIR DE EXTRACTOS PROTEICOS DE FRUTOS.

3.1. Precipitación de la PME con Sulfato de Amonio

En el ensayo de precipitación con la sal de sulfato de amonio en estado sólido se observó que en el pellet hay mayor actividad de la PME que en el sobrenadante, lo cual demuestra que si hubo la precipitación de la proteína, determinándose que la concentración más efectiva para alcanzar la precipitación es 10% de sulfato de amonio sólido con un valor de la actividad promedio de 0,68 μmol , ácido/min (Ver Grafica 6).

Sin embargo en las otras muestras que fueron precipitadas a otras concentraciones, también se observa actividad de la PME, manteniéndose en valores que oscilan entre 0,49 μmol , ácido/min a 20 % de saturación y 0,3 μmol , ácido/min a 55 % de saturación. Esto indica que en todas las muestras se logró precipitar la enzima, pero la concentración donde se obtuvo mayor actividad de la PME fue al 10% de saturación con sulfato de amonio.



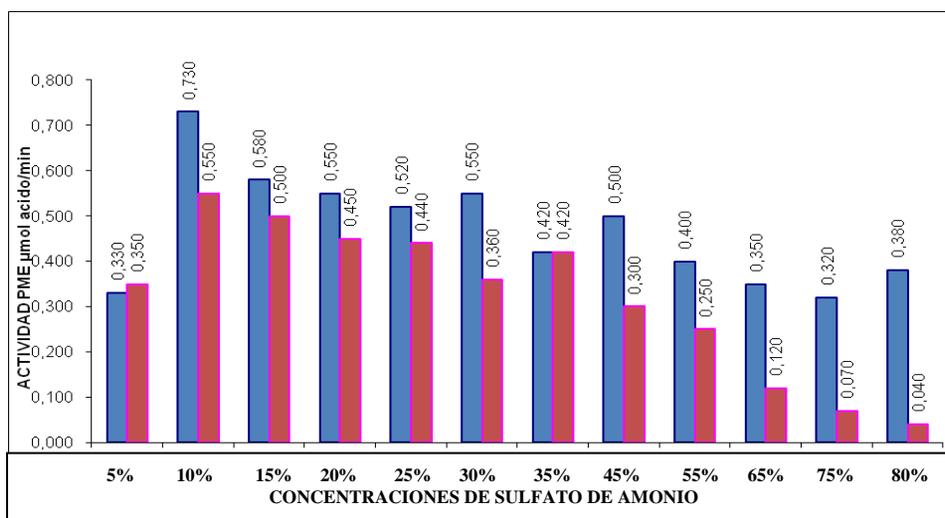
Grafica 6. Actividad promedio de la PME precipitada en diferentes concentraciones de sulfato de amonio sólido. Barras de color azul representan la actividad en el pellet y las barras de color rojo representan la actividad del sobrenadante.

Otro aspecto que es importante resaltar es que los valores de actividad de la PME obtenidos tanto en el pellet como en el sobrenadante no son muy disimiles, lo cual significa que con el sulfato de amonio sólido no se logra una mayor proporción de precipitación de la PME, siendo en algunos casos mayor la actividad de la PME en el sobrenadante que en el pellet como por ejemplo en las concentraciones de 65 % de saturación con valores para el pellet 0,30 μmol, ácido/min y en el sobrenadante de 0,31 μmol, ácido/min.

Como se explicó en la metodología, también se probó la precipitación de la PME con soluciones saturadas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los resultados indican que hay actividad de la PME tanto el pellet como en el sobrenadante. Cuando se utilizaron las soluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se pudo observar una clara diferencia en los valores de la actividad de la PME en el pellet y en el sobrenadante, siendo evidente que se logró una mayor precipitación de la PME con el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ preparado en solución, lo cual es demostrado con los altos valores de la actividad de la PME obtenidos en el pellet en comparación con la actividad de la PME en el sobrenadante.

Los resultados confirman que la concentración más eficiente para precipitar la enzima con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ líquido es al 10%, obteniéndose un valor de 0,73 μmol , ácido/min en el pellet y de 0,55 μmol , ácido/min en el sobrenadante, representando sólo el 75% de actividad observada en el pellet (Ver Grafica 7).

Los casos más contrastante son las muestras con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% donde se obtienen actividades de la PME en pellet de 0,38 μmol , ácido/min y en el sobrenadante de 0,04 μmol , ácido/min. La técnica de precipitación con sulfato de amonio se puede realizar progresivamente, es decir, se va aumentando la concentración del sulfato de amonio y se va centrifugando en cada paso o se puede agregar de una vez la cantidad de sulfato de amonio requerida. En los trabajos de Vovk y Simonovska (2007) y Rodrigo y col., (2006) utilizan el sulfato de amonio sólido para precipitar la proteína, con concentraciones que oscilan entre 60 y 80% obteniendo buenos resultados. En contraste con los resultados obtenidos en esta investigación que fueron muy bajos (soluciones de 10 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).



Grafica 7. Actividad de la PME precipitada a diferentes concentraciones de sulfato de amonio líquido. Barras de color representan los valores de actividad para el pellet. Las barras de color rojo representan los valores de actividad en el sobrenadante.

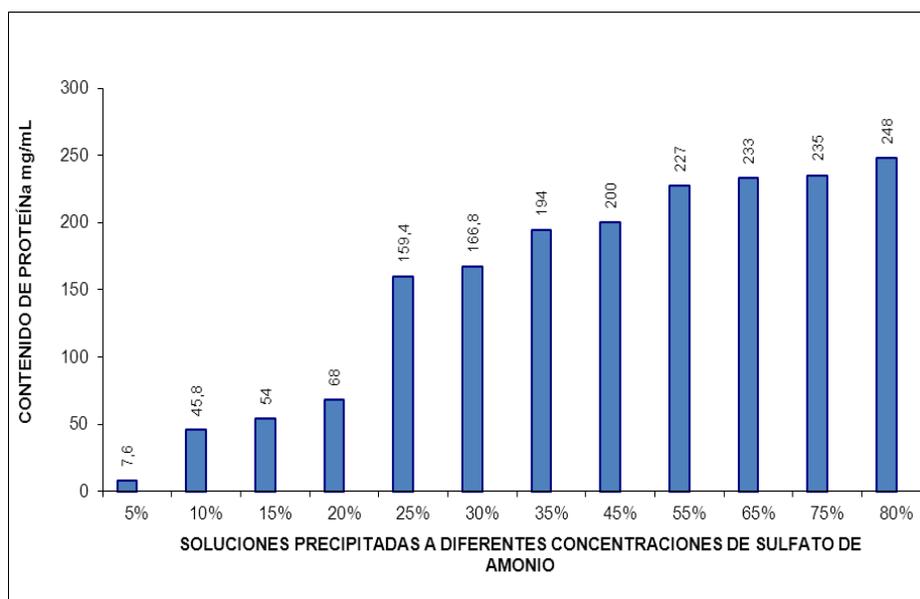
El ANAVAR (Ver Anexo 2) realizado demuestra que hay diferencias altamente significativas en la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ líquido y la prueba de medias aplicada indica que la mejor concentración para precipitar es al 10% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Ver Cuadro 7).

Cuadro 7. Prueba de Medias de la Actividad de la PME de las soluciones precipitadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio líquido y sólido.

% Sulfato de amonio	Sulfato de amonio líquido	Sulfato de amonio sólido	Promedio
5%	0,330 GHIJ	0,387 EFGH	0,358 DE
10%	0,727 A	0,680 A	0,703 A
15%	0,580 A	0,480 D	0,530 B
20%	0,550 B	0,490 D	0,520 B
25%	0,520 CD	0,320 HIJ	0,420 C
30%	0,550 BC	0,307 J	0,428 C
35%	0,420 E	0,340 GHIJ	0,380 D
45%	0,500 CD	0,370 EFGHI	0,435 C
55%	0,400 EF	0,300 J	0,350 DEF
65%	0,350 FGHIJ	0,300 J	0,325 EF
75%	0,320 IJ	0,310 IJ	0,315 F
80%	0,380 EFGH	0,330 GHIJ	0,355 DE

En la Grafica 8 se observan los valores obtenidos para el contenido de proteínas de las muestras precipitadas, los cuales indican que a medida que se aumenta el porcentaje de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aumenta el contenido de proteínas en la muestra ya que a la concentración del 10% de sulfato de amonio se obtuvo el valor mas bajo (45,8 mg/mL), mientras que de 25 % en adelante los valores oscilan entre 159,4 y 248 mg/mL de proteína.

Estos resultados indican que aunque al 10% existe menor cantidad de proteína, ésta es mayoritariamente la PME. En cambio a concentraciones más altas, no solamente está presente la PME, sino otras proteínas que tal vez interfieran con su actividad (Ver Gráfica 8).



Gráfica 8. Contenido de proteína de las soluciones precipitadas a diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ líquido.

Estos resultados permiten inferir que la mejor técnica para precipitar la PME es con la solución de sulfato de amonio a una concentración del 10% ya que se obtiene la PME con una alta actividad.

El ANAVAR demuestra que hay diferencias altamente significativas en la precipitación de las proteínas con diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ líquido.

Se realizó la prueba de medias correspondiente la cual dio como resultado que la concentración del 10% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ está en el grupo G con un valor bajo en el contenido de proteínas, sin embargo para los fines de esta investigación lo que se requiere es obtener la enzima con la menor cantidad de contaminantes posibles. Es importante resaltar que a esta concentración se obtuvo mayor actividad de las isoenzimas de la PME de níspero (Ver Anexo 3 y Cuadro 8).

Cuadro 8. Prueba de Medias de la Actividad para la concentración de proteínas en pellet del precipitado con distintas concentraciones de sulfato de amonio líquido.

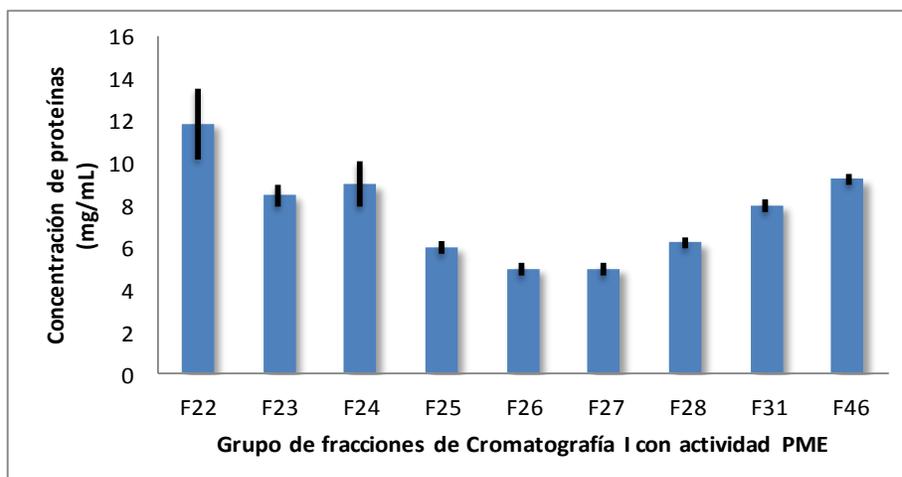
% Sulfato de amonio	Concentración de proteínas (mg/mL)	
5	7,60	H
10	45,80	G
15	54,00	F
20	68,00	E
25	159,43	D
30	166,77	D
35	195,00	C
45	200,00	C
55	227,00	B
65	232,90	B
75	235,03	B
80	248,00	A

3.2. Cromatografía en Sephadex G-50

3.2.1. Cromatografía por fraccionamiento

En la cromatografía realizada se obtuvieron 100 fracciones, al medirse la actividad de la PME, solamente nueve fracciones presentaron actividad (fracciones 22 hasta la 28, 31 y 46) con valores entre 1,28 y 0,2 μmol , ácido/min, lo cual indica que en esas fracciones se encuentra la PME.

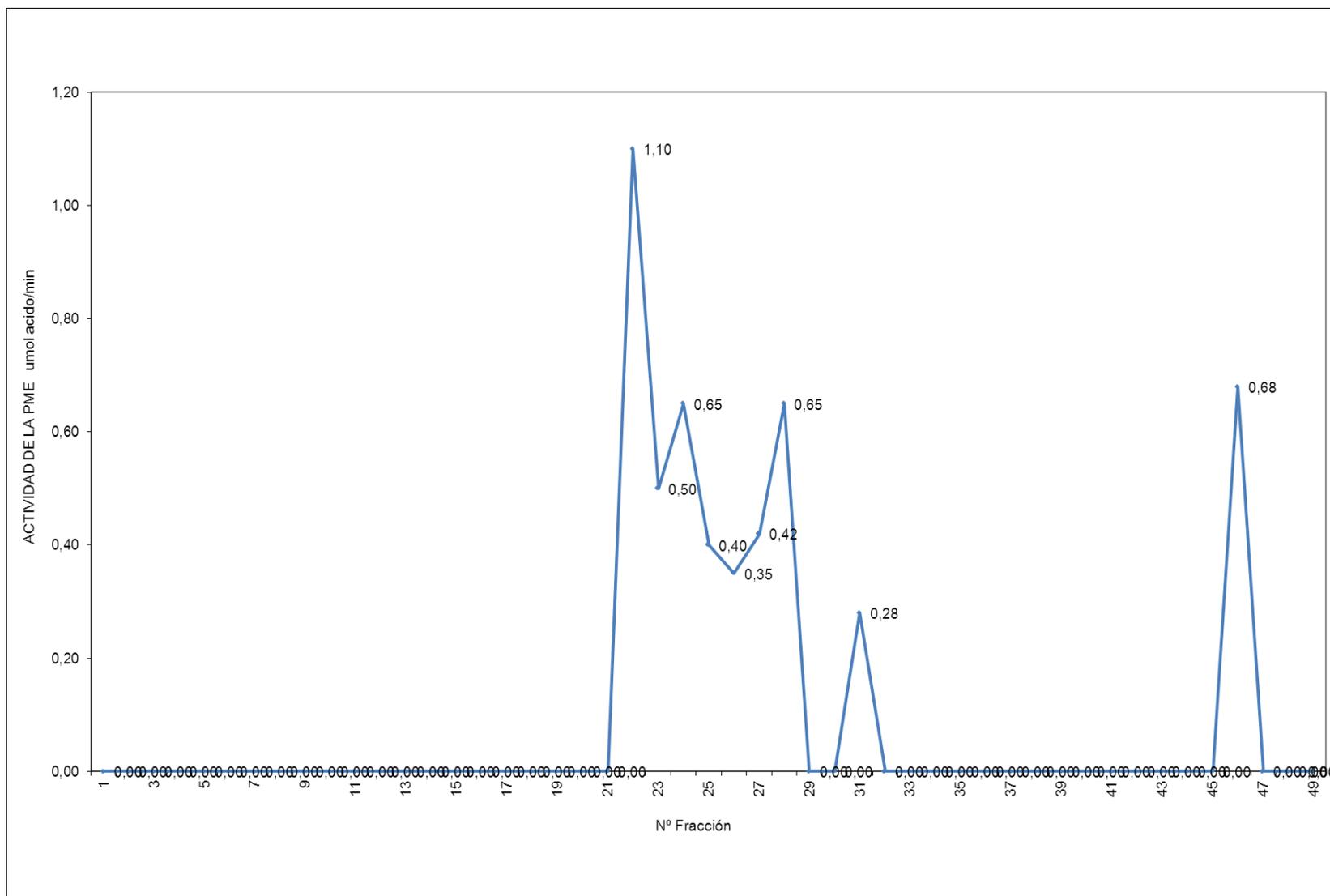
En el cromatograma se observan claramente los picos resultantes donde se evidencia la actividad de la PME (Ver Grafica 10), también se determinó el contenido de proteínas para las fracciones con actividad de la PME (Ver Grafica 9). Los resultados indican que en la fracción 22 es donde hay mayor cantidad de proteína con un valor de 11,9 mg/ml, seguido por las fracciones 24 y 46 donde el contenido es de 9 y 9,25 mg/mL, respectivamente. En el resto de las demás fracciones los valores oscilan entre 5 y 8,5 mg/mL.



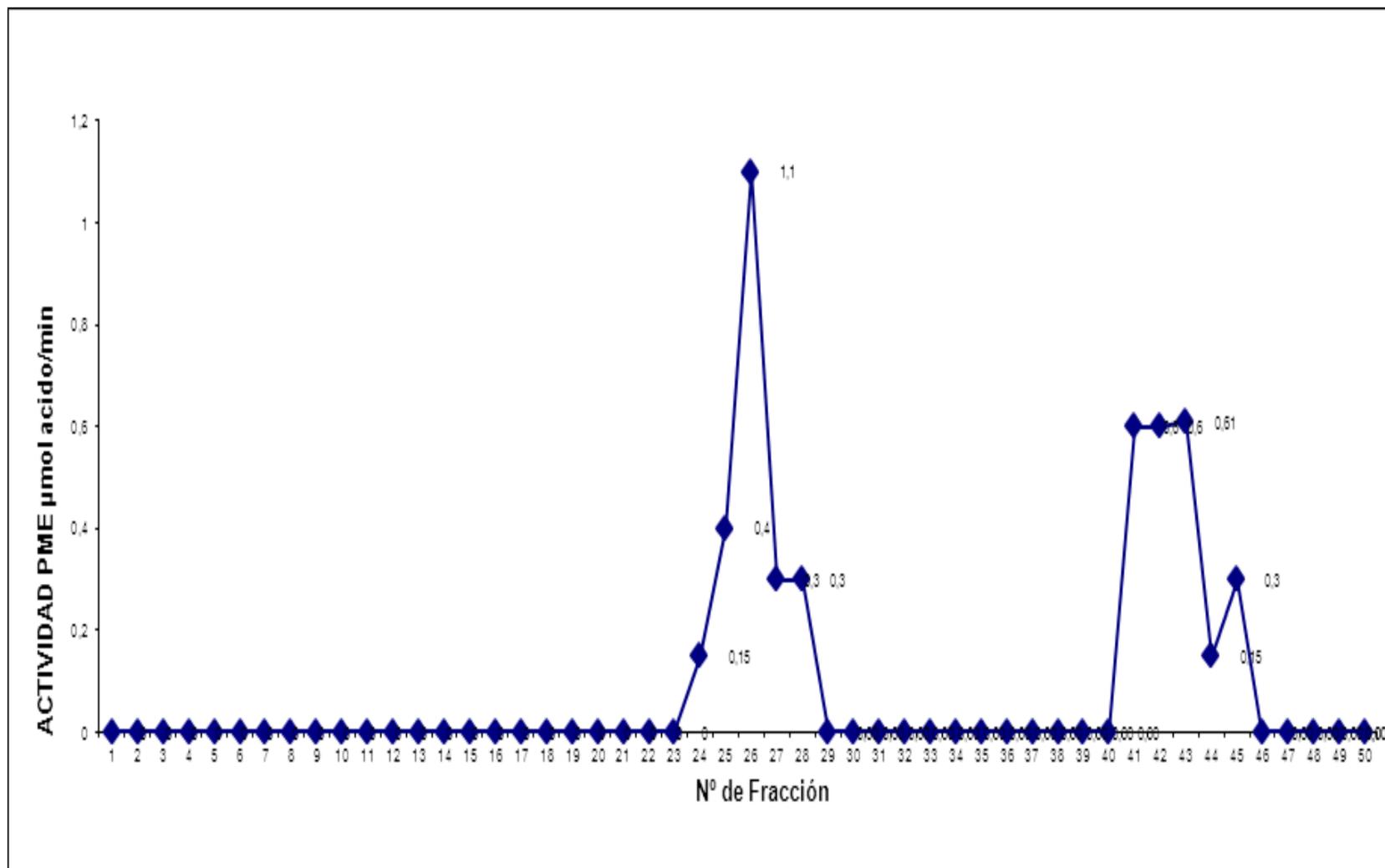
Gráfica 9. Contenido de Proteínas en las fracciones obtenidas en la primera cromatografía por fraccionamiento con Sephadex G-50 con actividad para la PME.

Las muestras con actividad para la PME fueron mezcladas y sometidas a una segunda cromatografía por fraccionamiento (Ver Gráfica 11), para verificar la reproducibilidad de los resultados. Se obtuvieron diez fracciones con actividad para la PME: las fracciones N° 24 a la 28 y de la fracción 41 a la 45 con actividades que oscilan entre los 1,1 y 0,15 μmol , ácido/min.

La presencia de actividad en estas fracciones, formando picos, indica que están presentes dos isoenzimas de la PME (Ver Gráfica 11). Considerando estos resultados se formaron dos grupos para analizar las muestras, se unieron las fracciones 24 a la 28 formando el primer pool, considerando que son sólo una isoenzima, obteniéndose un volumen final de 15 mL conformando a la PME I y la PME II que está formada por el pool de las fracciones 41 a la 45, con un volumen final de 40 mL (Ver Gráfica 11). Adicionalmente se almacenaron 2 mL de cada una de las fracciones para los diferentes análisis.



Gráfica 10. Cromatograma donde se observan los picos de actividad de la PME obtenida a partir de frutos de níspero.



Gráfica 11. Cromatograma donde se observan los picos de actividad de la PME obtenida a partir de frutos de níspero.

Las muestras obtenidas fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Cuando se hizo el revelado de los geles se observaron las bandas correspondientes a las proteínas presentes en cada fracción de la cromatografía, entre esas bandas de proteínas está presente la PME de níspero (Figura 14). Estos resultados demuestran que en las muestras obtenidas si hay proteínas presentes y que tiene actividad para la PME, lo cual significa que se han logrado separar dos isoenzimas de la PME a partir de la pulpa de nísperos.

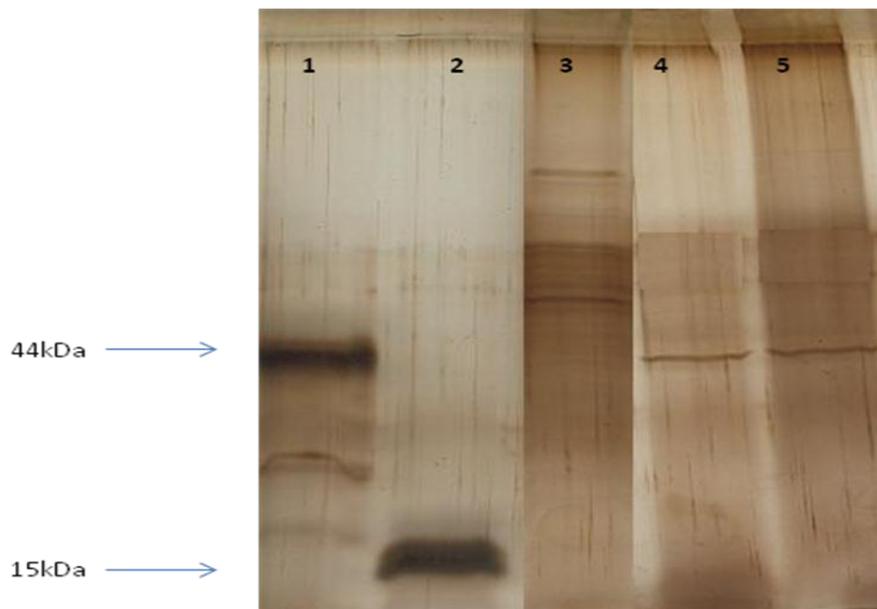


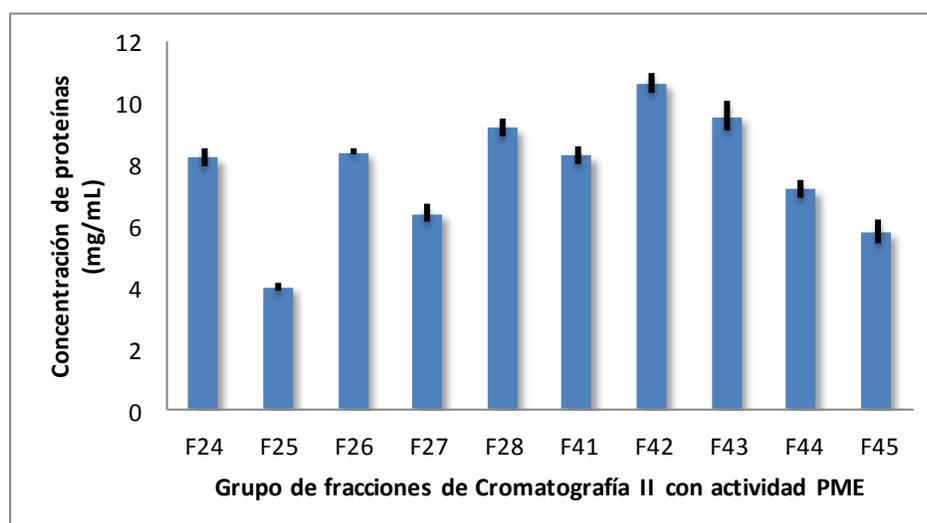
Figura 14. Gel SDS-PAGE (15%), mostrando la purificación de dos isoenzimas de la PME de níspero (*Manilkara zapote*) var. prolifera. Carriles: 1.- 3 ug peroxidasa (44kDa); 2.- 3 ug Ribonucleasa B (15kDa); 3.- 3ug Extracto crudo; 4. 1 ug PME I ; 1ug PMEII

En otros frutos también se ha logrado detectar la presencia de isoenzimas para la PME distribuidas de acuerdo al tejido o presentes de acuerdo al estado de desarrollo de los frutos. Tal es el caso de los frutos del limón, donde Macdonald y col., (1993) purificaron dos isoenzimas de la PME, una localizada solamente en el exocarpo y la otra en el endocarpo del limón. Ambas poseen pesos moleculares similares, entre 35 y 33 kDa.

En frutos de fresa (*Fragaria x ananassa Duch*) Drayen y Van Cutsem (2008) encontraron seis isoenzimas diferentes las cuales se activan diferencialmente en cada estado de desarrollo.

Otros ejemplos lo representan los trabajos de Jiang y col., (2001) en guisantes (*Pisum sativum L*), quienes encontraron 4 isoenzimas de la PME; y el de Cameron y Grohman, (1995) en pulpas de toronja, donde se detectaron cuatro isoenzimas las cuales denominaron RGPME 1, 2, 3 y 4.

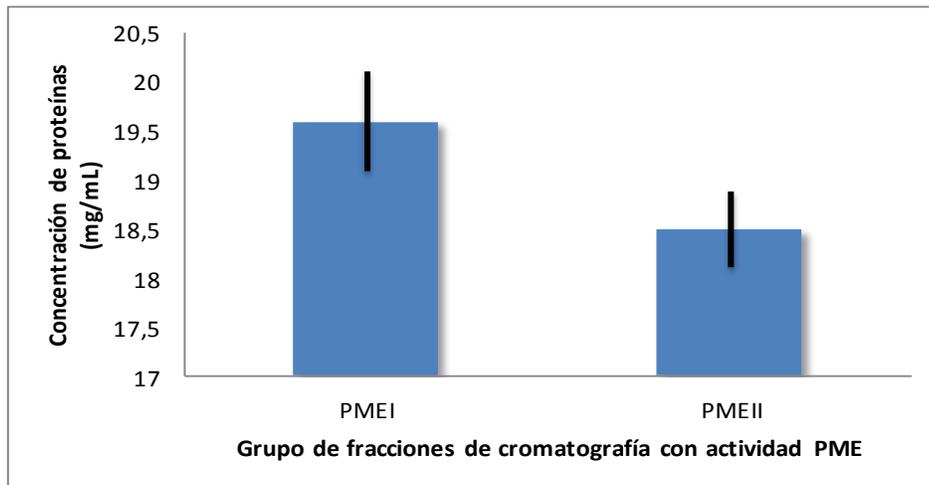
Para las fracciones obtenidas en la segunda cromatografía se determinó el contenido de proteínas presentes (Gráfica 12). El mayor contenido de proteína obtenido fue en la fracción 42 (F42) con un valor de 10,7 mg/mL, seguido de las fracciones 28 y 43 con valores de 9,2 y 9,6 mg/mL, respectivamente. En el resto de las fracciones los valores oscilan entre 4 y 8,4 mg/mL.



Gráfica 12. Contenido de Proteínas en las fracciones obtenidas en la segunda cromatografía por fraccionamiento con Sephadex G-50 con actividad para la PME.

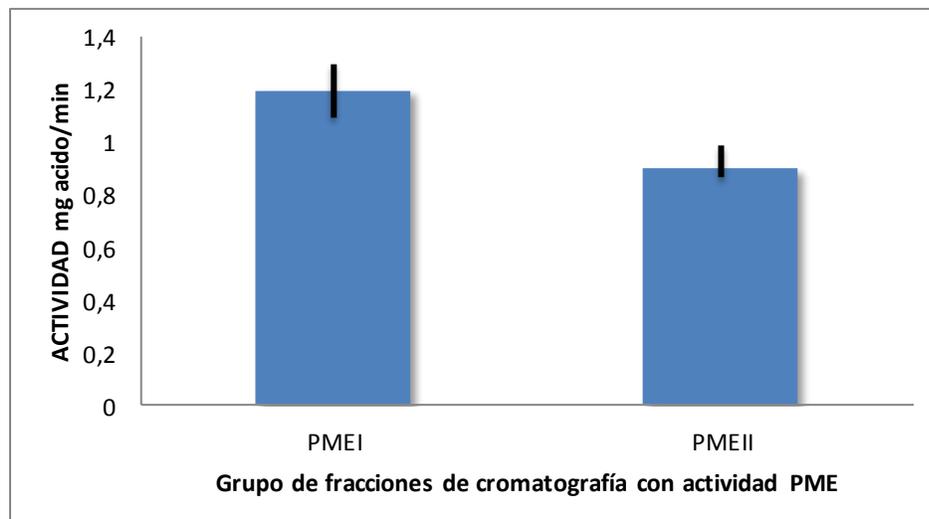
Como se explicó anteriormente las fracciones obtenidas fueron mezcladas formando dos grupos. El primero grupo formado por las fracciones 24 a la 28, conformando a la PME1 y en el segundo grupo las fracciones 41 a la 45 las cuales

forman a la PMEII. Se determinó el contenido de proteínas para la PME I y la PME II. En la Gráfica 13 se observa que para la PME I se obtuvo 19,6 mg/mL, siendo este valor superior al obtenido para la PME II, el cual fue de 18,5 mg/mL.



Gráfica 13. Contenido de Proteínas en los Pool de las fracciones obtenidas en la segunda cromatografía por fraccionamiento con Sephadex G-50 con actividad para la PME y que conforman a la PME I (Pool 1) y a la PME II (Pool 2).

El análisis de la actividad en los pool que conforman a la PME I y la PME II, permiten determinar que la PME I tiene una actividad más alta que la PME II, con valores de 1,2 μmol ácido/min (Gráfica 14)



Gráfica 14. Actividad las isoenzimas de la PME de nísperos obtenidas mediante la cromatografía por fraccionamiento.

3.2.2. Cromatografía Bacht

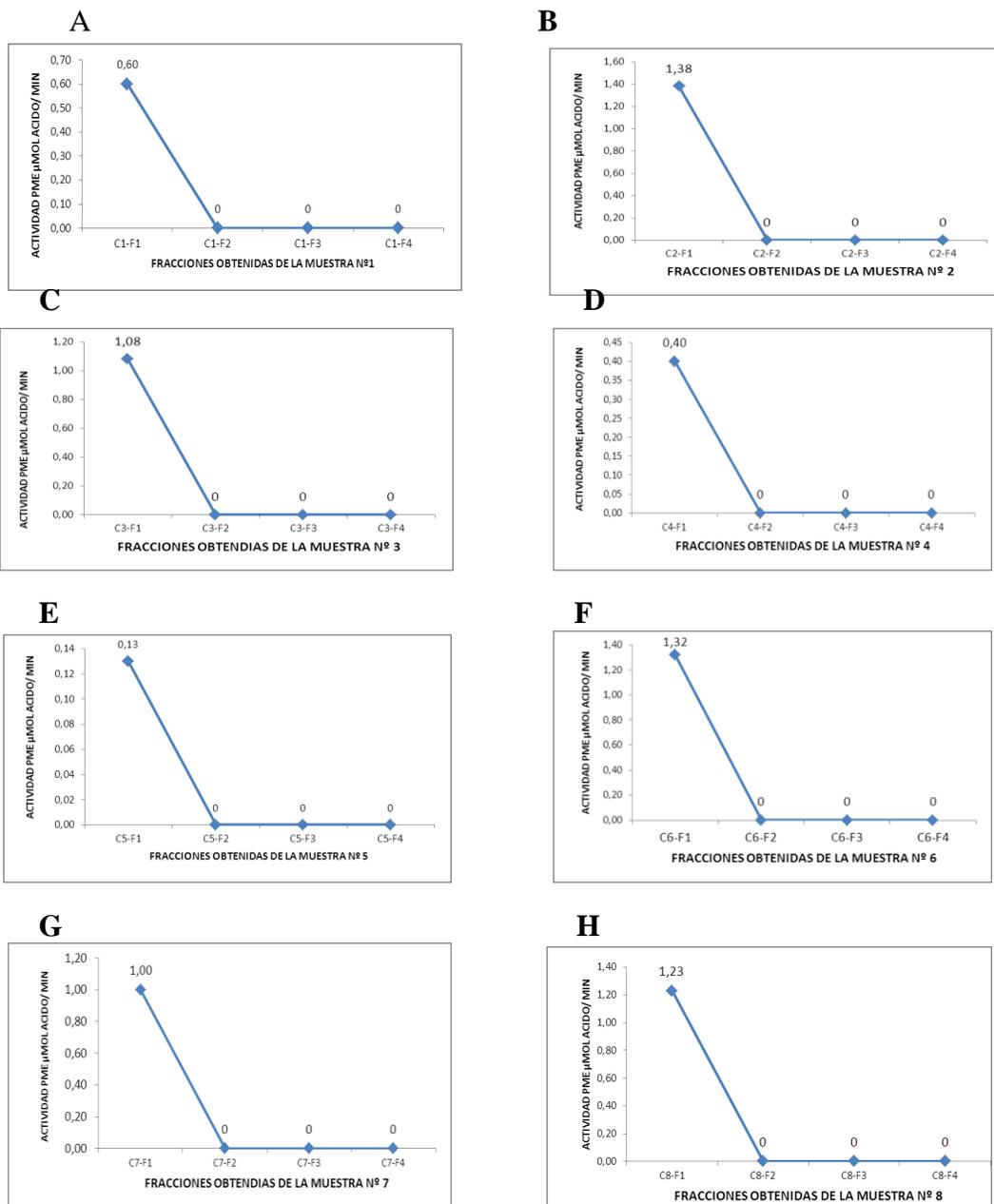
Se realizó la Cromatografía Bacht a las muestras que fueron sometidas a la precipitación con sulfato de amonio. De cada cromatografía se obtuvo un total de 4 fracciones, para un total de 32 muestras.

Todas las soluciones fueron sometidas a la prueba de actividad para verificar la presencia de la PME (Ver Gráfica 15). Los resultados en esta prueba indican que en la primera fracción colectada de cada cromatografía toda la PME presente fluyó, lo cual indica que este procedimiento es más rápido, sin embargo no se observa la separación y formación de los picos de actividad tal como en el ensayo de cromatografía por fraccionamiento.

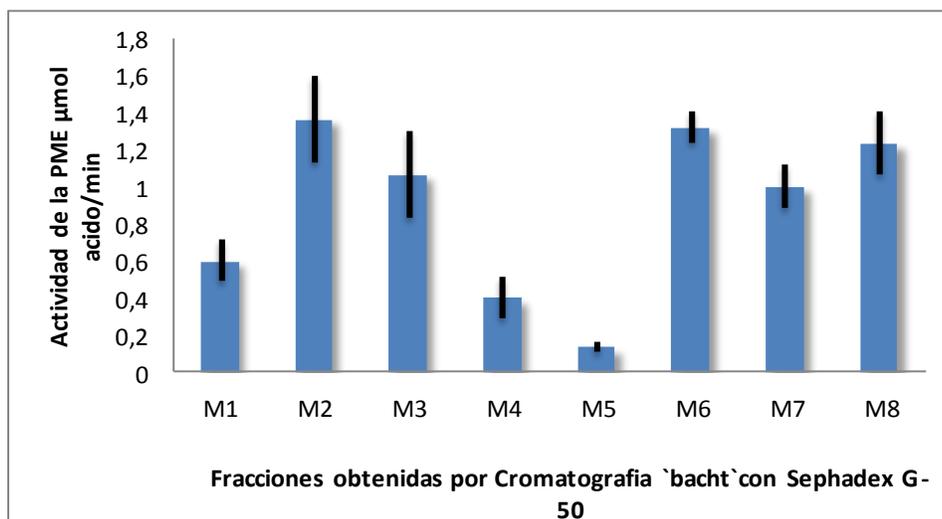
En la revisión de literatura realizada no se encontraron reporte de que se haya utilizado esta técnica para la purificación o desalinización de la PME.

En la Grafica 16 se hace un resumen de las fracciones que presentaron actividad de la PME en las diferentes cromatografías que se realizaron. Los valores obtenidos para la PME oscilan entre 1,38 y 0,13 μmol , acido/min.

Estos resultados indican que con este procedimiento se logró obtener la PME con mayor actividad pero no hubo la separación en varios picos de actividad, es decir no se logró la separación de las isoenzimas.

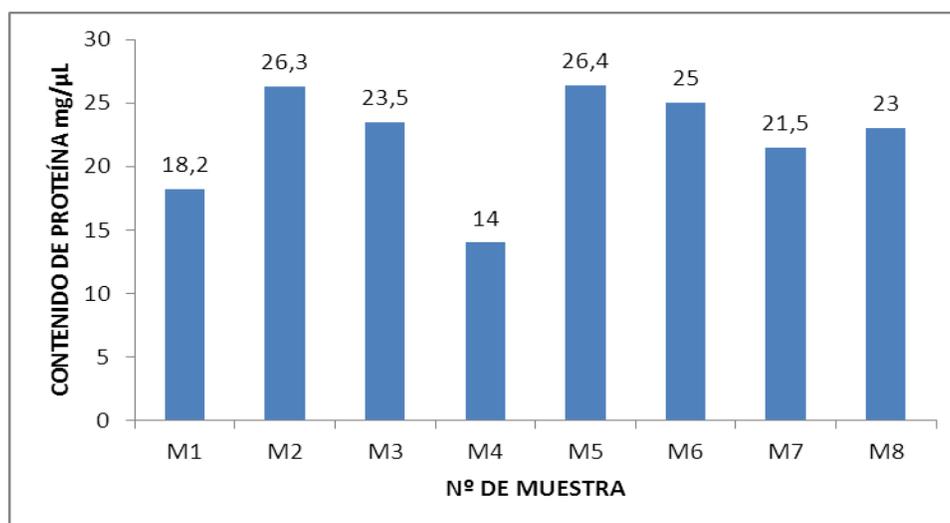


Gráfica 15. Actividad de la PME en las fracciones obtenidas en las diferentes cromatografías bacht. **A.** Actividad de la PME de la muestra N° 1. **B.** Actividad de la PME de la muestra N° 2. **C.** Actividad de la PME de la muestra N° 3. **D.** Actividad de la PME de la muestra N° 4. **E.** Actividad de la PME de la muestra N° 5. **F.** Actividad de la PME de la muestra N° 6. **G.** Actividad de la PME de la muestra N° 7. **H.** Actividad de la PME de la muestra N° 8.



Gráfica 16. Actividad de la PME en las muestras sometidas a cromatografía `bacht`.

Posteriormente se realizó el análisis para determinar el contenido de proteínas de las muestras (Ver Grafica 17), obteniéndose valores comprendidos entre 14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 26,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína en la muestra. Estos valores son superiores para el contenido de proteínas a los obtenidos en la cromatografía por fraccionamiento.



Gráfica 17. Contenido de proteínas en las muestras obtenidas de la cromatografía Bacht con Sephadex G-50.

Debido a los resultados de la cromatografía por fraccionamiento y de la cromatografía bacht se decidió seleccionar las muestras obtenidas por fraccionamiento para realizar los posteriores análisis ya que se obtuvo una separación en picos de actividad lo cual es un indicio de la presencia de isoenzimas de la PME. Los análisis posteriores se realizaron considerando dos isoenzimas de la PME integrados por las muestras que formaron los picos de actividad siendo esta la PME I: fracciones 24 a la 28 y la PME II: fracciones 41 a la 45.

4. TABLA DE PURIFICACIÓN

Una vez culminada la purificación de las isoenzimas se elaboró la tabla de purificación para la PME I y la PME II. En esta tabla se determinan criterios relevantes del proceso como lo son: la actividad específica, el rendimiento y el factor de purificación.

La actividad específica es una relación que se establece entre el valor de la actividad de la enzima y la cantidad de proteína de la muestra e indica la cantidad de enzima que biológicamente está en actividad en relación al total de la proteína presente en la muestra. Es importante recordar que inicialmente el extracto crudo y la muestra precipitada con sulfato de amonio es el mismo para la PME I como para la PME II.

En los resultados obtenidos para la PME I y la PME II se determinó que en el extracto crudo la actividad específica es de $0,011 \mu\text{mol ácido} \times \text{min}^{-1}/\text{mg}$ (Ver Cuadro 9). En la medida que va progresando en la purificación este valor aumenta, casi hasta duplicarse en la precipitación con sulfato de amonio, con un valor de $0,021 \mu\text{mol ácido} \times \text{min}^{-1}/\text{mg}$. Esto evidencia que la actividad catalítica de la enzima se ha incrementado en relación al total de las proteínas presentes en la muestra, es decir, se ha logrado purificar las enzimas.

Para la PME I en el último paso de la purificación el valor de la actividad específica es de $0,082 \mu\text{mol ácidoxmin}^{-1}/\text{mg}$, representando un incremento de 3.9 veces la actividad en relación al paso anterior. Esto indica que se ha logrado disminuir la cantidad de proteínas totales en relación a la PME I.

La actividad específica de la PME II en el último paso de la purificación tiene un valor de $0,065 \mu\text{mol ácidoxmin}^{-1}/\text{mg}$. Siendo este valor 3 veces más alto que el paso de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De acuerdo a estos resultados la PME I tiene mayor actividad específica (1.2 veces más alta) que la PME II.

Cuadro 9. Tabla de purificación para la PME I y la PME II de nísperos.

Muestra	Volumen Total (mL)	Actividad Total $\mu\text{mol ácido}/\text{min}$	Proteína Total mg/mL	mg en 0,75mL	Actividad Específica $\mu\text{mol ácidoxmin}^{-1}/\text{mg}$	Rendimiento %	Factor de Purificación
Extracto Crudo	17,5	1,97	231	173,25	0,011	100	1
Solución Precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	0,73	45,8	34,35	0,021	37,05	1,91
Cromatografía Sephadex G-50 PME I	15	1,2	19,6	14,7	0,082	60,9	7,45
Cromatografía Sephadex G-50 PME II	40	0,9	18,5	13,875	0,065	45,68	5,9

El Rendimiento o también llamado Porcentaje de Recuperación de la enzima indica la cantidad (expresada en porcentaje) de la enzima que fue recuperada a partir del extracto inicial que representa el 100% de toda la proteína. Este valor también se sustenta en la cantidad de proteína extraída (expresada en mg/mL) (Ver Cuadro 9).

Para la PME I el Rendimiento final fue de 60,9 % y para la PME II fue de 45,65%. Claramente se observa que el porcentaje de recuperación fue más alto para la

PMEI que en la PMEII, tal vez debido a las condiciones del medio o a las características de cada una de las isoenzimas en relación a su ubicación celular.

Los valores de proteína total permiten demostrar que el método tanto de extracción como de purificación son eficientes ya que la cantidad de PMEI extraída es de 19,6 mg y de PMEII es de 18,5 mg a partir de 20 g de pulpa de frutos nísperos.

Los valores obtenidos en esta investigación evidencian un alto rendimiento al ser comparados con los trabajos de Ding y col., (2002) en frutos de higo (*Ficus awkeotsang*) donde extrajeron 27,3 mg de proteína a partir de 50 g de pulpa de higos. Otra investigación realizada en frutos de mandarina reporta la extracción de 1,5 mg de proteína (Rillo y col., 1992) a partir del endocarpo de los frutos. Éstos resultados permiten concluir que el método de extracción y purificación diseñado en esta investigación es eficiente y se extrae alta cantidad de PME.

5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CINÉTICA DE LA ISOENZIMAS DE LA PME

5.1. Caracterización Molecular

5.1.1. Determinación de la glicosilación

5.1.1.1. Afinodetección por Western Blotting

De acuerdo a lo pautado en la metodología se realizó el Western Blotting para detectar la presencia de grupos glicanos de tipo polimanosídicos en las isoenzimas de la PME. Después del paso de la transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa, a fin de corroborar su realización correcta, se tiñó (temporalmente) con rojo de ponceau. El tratamiento aplicado evidenció la presencia de las bandas de las proteínas utilizadas como control (marcadores de masa molecular: MW), y una simple banda para las muestras de la PME, evidenciando el grado de purificación obtenido y la correcta transferencia, (Figura 15). Sin embargo, la afinodetección no

mostró evidencias de proteínas glicosiladas, posiblemente porque o no existían tales grupos o no se encontraban accesibles a la lectina ConA, por lo que puede decirse que esta prueba no es concluyente y, obligó a recurrir a otros tipos de procedimientos a fin de aclarar la glicosilación o no de las isoenzimas PME de níspero

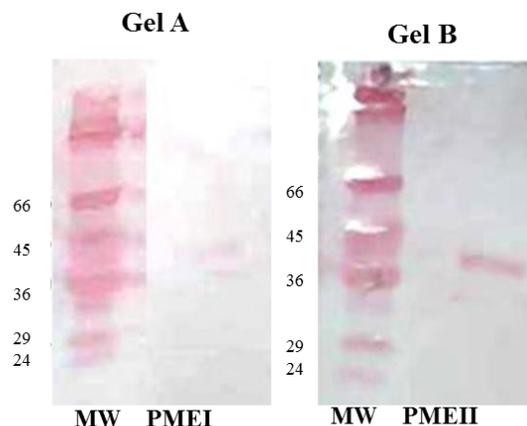


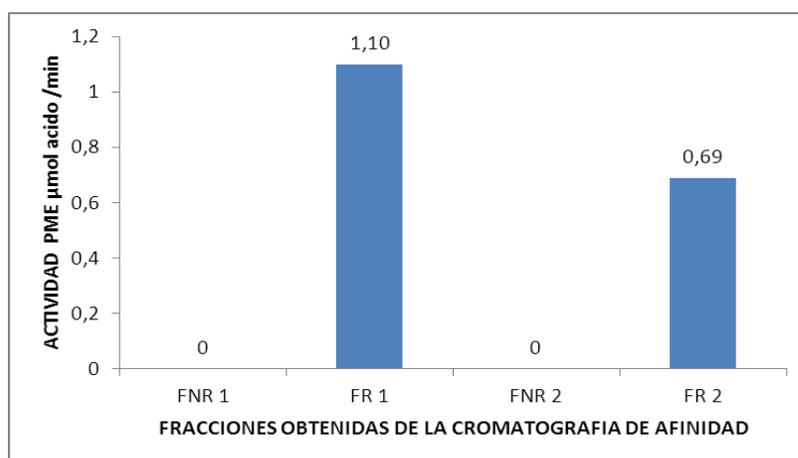
Figura 15. Membranas de transferencia para Western Blotting teñidas con rojo de ponceau. **Gel A:** se observan las bandas del Marcador Molecular (MW) y la banda correspondiente a la PME I. **Gel B:** se observan las bandas del Marcador Molecular (MW) y la banda correspondiente a la PME II.

5.1.1.2. Cromatografía de Afinidad

Las muestras de la PME I y la PME II fueron sometidas a la cromatografía de afinidad con la ConA-sepharosa indicando si la enzima es glicosilada. Además también permite demostrar que parte de los grupos de carbohidratos son grupos manosídicos, ya que la adhesión a la ConA-sepharosa ocurre si hay por lo menos 14 o 15 grupos. Una vez realizada la cromatografía de afinidad se midió la actividad de la PME y se encontró que la actividad de la PME estaba presente en la fracción retenida (FR) demostrando que es una proteína glicosilada y que este carbohidrato está formado por grupos manosídicos.

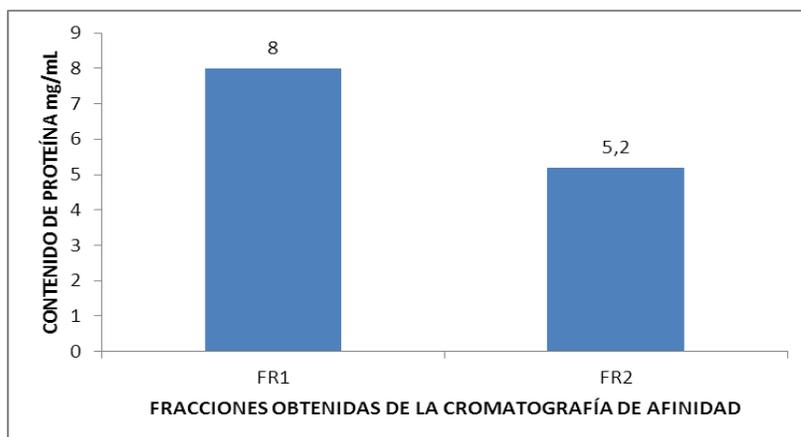
Los datos demuestran que se obtuvo un valor alto para la actividad de la PME. Siendo este resultado contrastante con lo obtenido en la fracción no retenida (FNR) ya que no hay actividad para la PME, por lo tanto toda la PME presente quedó adherida a la ConA-sepharosa. La FR1, corresponde a la PME I, mostró una actividad de 1,1 μmol , ácido/min y la FR 2 (corresponde a la PME II) de 0,69 μmol , ácido/min.

Estos resultados muestran que ambas isoenzimas de la PME de níspero presentan un tipo de glicano reconocido por la ConA y que, por lo tanto, la cromatografía de afinidad permite obtener la PME activa y con alta eficiencia. (Ver Gráfica 18).



Grafica 18. Actividad de la PME en las fracciones retenidas obtenidas mediante la cromatografía de afinidad con la ConA-sepharosa.

Las diferencias en cuanto a la actividad entre PME I y PME II se debe a que en la muestra 1 hay una mayor cantidad de la enzima, lo cual fue determinado mediante el método Bradford. En la FR 1 el contenido de proteína es de 1,1 mg/mL y en la FR 2 el valor es de 0,69 mg/mL (Ver Grafica 19).



Gráfica 19. Contenido de proteína de la FR 1 y de la FR 2, de acuerdo al Método Bradford.

En un estudio realizado por Denes y col., (2000) en frutos de manzanas cv. Golden Delicious se detectó una sola enzima para la PME, la cual fue purificada mediante cromatografía de afinidad.

5.1.1.3. Kit de Glicosilación

Mediante el ensayo de cromatografía de afinidad con la ConA-sepharosa se determinó que la enzima PME es glicosilada. Para confirmar este resultado se utilizó un Kit de Detección de glicosilación de proteínas marca Sigma GLYCOPRO y se tiñó un gel SDS-PAGE con el KIT, observándose que en los carriles correspondientes a las muestras de las fracciones retenidas se observa una banda indicando la presencia de un grupo carbohidrato en la PME por lo tanto se concluye que la enzima en estudio es glicosilada (Ver Figura 16).

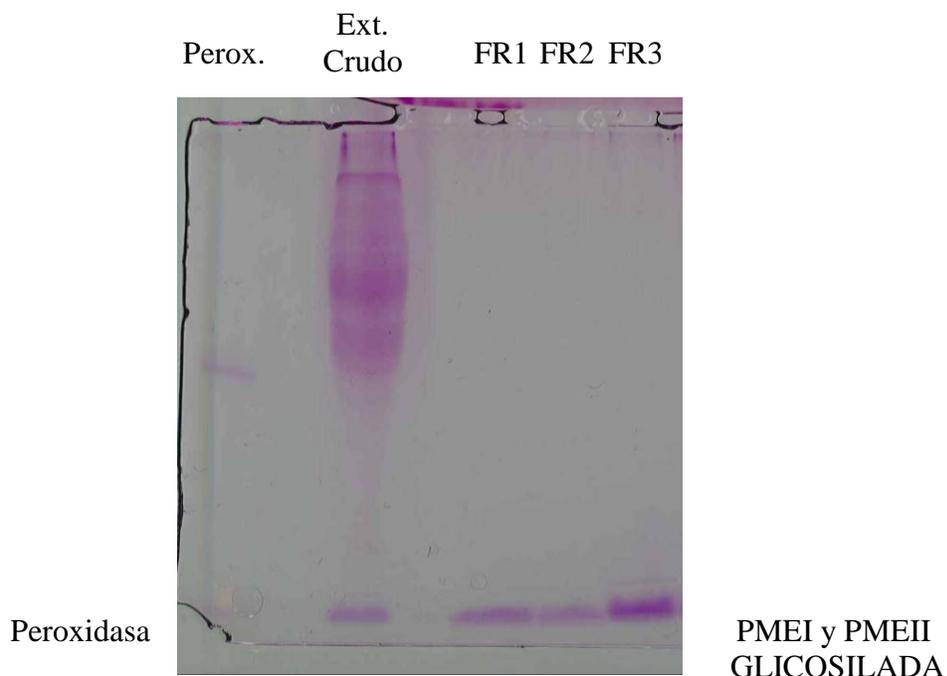


Figura 16. Gel SDS-Page teñido con el kit GLYCOPRO para detectar la proteína glicosilada. Carril 1: Peroxidasa de rábano, Control positivo. Carril 2: vacío. Carril 3: Extracto Crudo de nísperos. Carril 4: vacío. Carril 5: Fracción Retenida 1 PMEI (FR1). Carril 6: Fracción Retenida PMEI (FR2). Carril 7: Fracción Retenida 3 PMEII (FR3).

En el trabajo de Rillo y col., (1992) en mandarina determinaron mediante un Kit de inmuno-ensayo (Boehring) que la PME es glicosilada, sin embargo no lograron medir el porcentaje y tipo de carbohidratos presentes.

Otro reporte sobre la glicosilación de la PME fue realizado por Ding y col., (2002) en frutos de higo (*Ficus awkeotsang*) donde mediante el método PAS (periodic acid-Schiff) determinaron que la PME es glicosilada. Además evaluaron la composición del carbohidrato y detectaron que estaba formado por 22 hexosas, 16 manosas, 4 N-acetilglucosamina y 2 residuos de galactosa.

La glicosilación de la PME sugiere un importante rol en la estabilidad de la proteína. Esta glicosilación es en parte responsable de la estabilidad térmica y

tolerancia al pH (Cameron y Grohman, 1996) ya que le confiere molecularmente resistencia a estos factores.

5.2. Peso Molecular

Para determinar el peso molecular de las isoenzimas de la PME se realizó la electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE. Como resultado se obtuvo el gel para determinar el peso molecular de las isoenzimas PME y PME II (Ver figura 17). En el gel se observan las bandas correspondientes a la PME I en los carriles 4 y 5 y a la PME II en los carriles 6 y 7. Se utilizaron como marcadores de peso molecular a la Peroxidasa con un peso de 44 kDa y la Ribonucleasa B con un peso molecular de 15 kDa. Además estas proteínas también son glicosiladas (Ver Figura 17). De acuerdo a las bandas observadas en el gel se determinó que el Peso Molecular de la PME I y PME II de níspero es de 42 kDa.



Figura 17. Gel SDS-Page teñido con plata donde se observan las bandas de la PME I y de la PME II. P= Peroxidasa (44 kDa). RiboB = Ribonucleasa B (15 kDa). PME I y PMEII. FNR= Fracción No Retenida. FR1= Fracción Retenida 1. FR2= Fracción Retenida 2.

El peso molecular para la PME I y la PME II reportados en esta investigación es similar al de en pulpas de toronja, donde se detectaron cuatro isoenzimas llamadas RGPME 1, 2, 3 y 4 de la PME con pesos moleculares entre 20 kDa y 40 kDa (Cameron y Grohman, 1995).

Laats y col., (1997) analizaron frutos de *Phaseolus vulgaris* cv. Odessa y detectaron dos isoenzimas, la PE-1 (en la legumbre) y la PE-2 (en el tegumento) con pesos moleculares de 42 y 33,5 kDa respectivamente. Alonso y col., (1997), utilizando técnicas de cromatografía, purificaron dos isoenzimas en frutos de kaki (*Diospyros kaki*) la PME I de 51 kDa y la PME II de 30 kDa. Otro ejemplo lo representa el estudio de Castaldo y col., (1989) en manzanas (*Malus communis*) donde determinaron que existen dos isoenzimas denominadas A y B. La isoenzima A tiene un peso molecular de 55 kDa y la isoenzima B 28 kDa. En contraste con estos resultados Carvalho y col., (2009) en frutos de guayaba (*Psidium guajava*) sólo detectaron una PME con un peso molecular de 57 kDa.

5.3. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (PAGE) “Proteína Nativa”

Se procedió de acuerdo a la metodología planteada. Se determinó la condición nativa de la enzima mediante un gel en condiciones no desnaturizantes. En el gel obtenido se observan las manchas que corresponden a las proteínas (Datos no mostrados), tanto la PME I como la PME II. Este gel permitió deducir la presencia de la enzima en condiciones nativas.

5.4. Caracterización Cinética de la PME

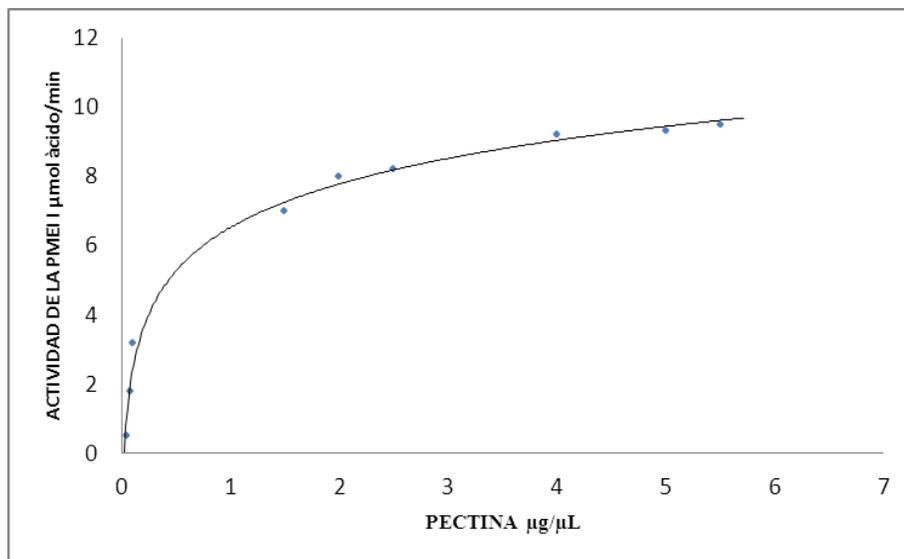
Los análisis anteriores han demostrado la presencia de dos isoenzimas de PME, la PME I y la PME II, ya que se presentaron fracciones con actividad para la PME y formaron dos picos de actividad bastante definidos en el cromatograma

obtenido. Basados en estos datos se realizaron los ensayos de la cinética enzimática para los dos isoenzimas de la PME.

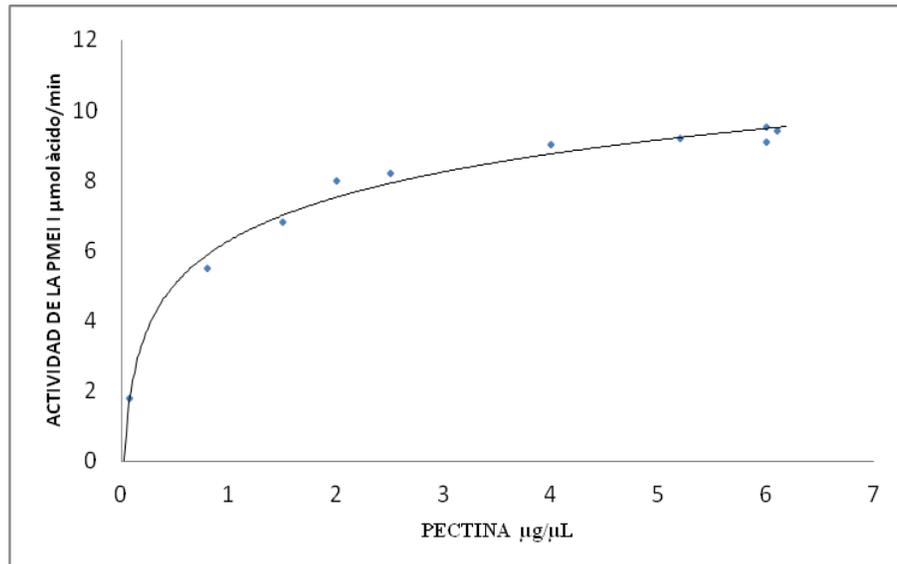
5.4.1. Concentración Óptima de Sustrato: K_m y $V_{m\acute{a}x}$

Para la determinación de la concentración óptima de sustrato se probaron diferentes concentraciones de pectina cítrica para la PME I y la PME II, de acuerdo a la metodología planteada.

Una vez obtenidos los resultados se procedió a realizar las gráficas correspondientes a la cinética (Ver Gráficas 20 y 21), lo cual permitió comprobar que ambas isoenzimas, la PME I y la PMEII, se comportan de acuerdo a la cinética de Michaelis-Menten ya que, en ambos casos, la línea de tendencia corresponde a una hipérbola rectangular. De acuerdo a esta gráfica la $V_{m\acute{a}x}$ alcanzada, por ambas isoenzimas indica la velocidad de reacción de las isoenzimas y la concentración de sustrato para lograr la saturación de las isoenzimas. La K_m indica la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la $V_{m\acute{a}x}$ (Ver Gráficas 20 y 21) (Lehninger, 1982).



Gráfica 20. Representación gráfica de la Cinética de Michaelis-Menten para la PME I de frutos de nísperos.

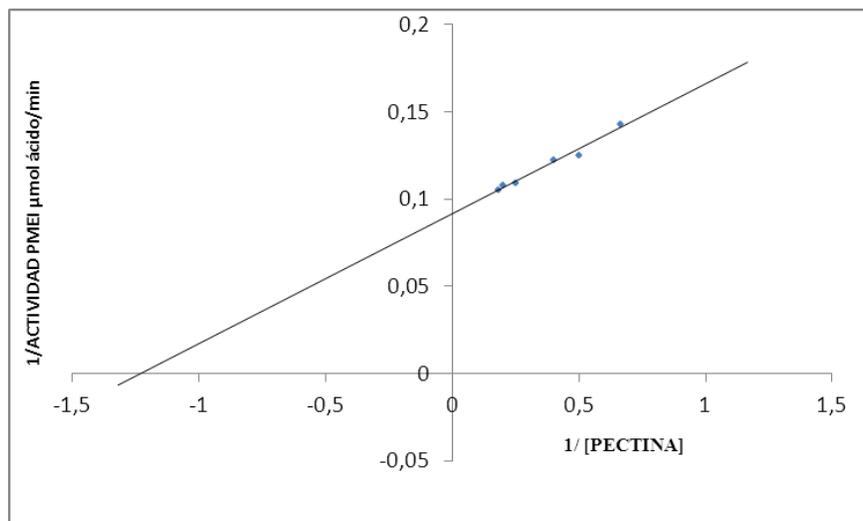


Gráfica 21. Representación gráfica de la Cinética de Michaelis-Menten para la PME II de frutos de nísperos.

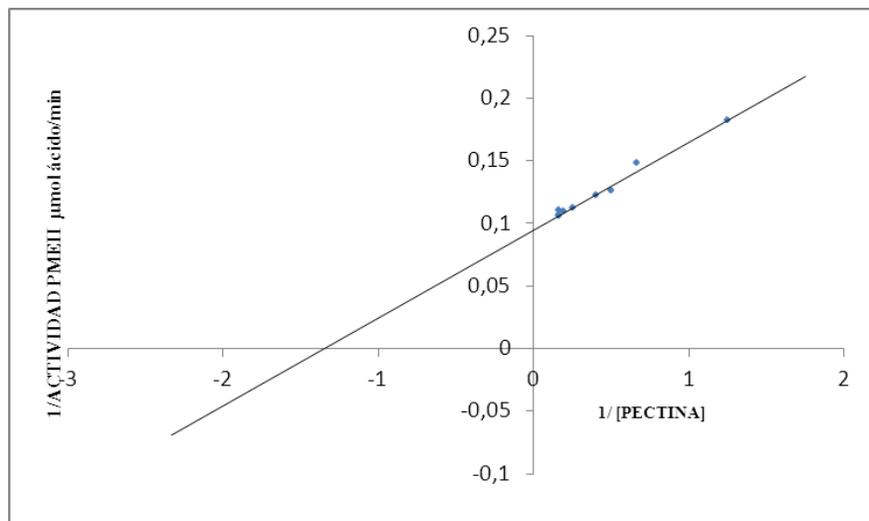
Sin embargo, este tipo de gráfica no permite precisar los valores exactos de K_m y $V_{m\acute{a}x}$, por lo cual se procedió a utilizar la representación gráfica de Lineweaver-Burk para linearizar los valores obtenidos.

Se determinaron las constantes cinéticas (K_m y la $V_{m\acute{a}x}$) mediante la representación gráfica de Lineweaver-Burk, encontrándose que para ambas isoenzimas la **K_m es de 1,15 µg/µL** y la **$V_{m\acute{a}x}$ es de 0,091 µmol, ácido/min** (Ver Grafica 22 y 23).

El valor obtenido para la K_m es bajo indicando que hay una alta afinidad de las enzimas por el sustrato, lo cual confirma nuevamente que durante el proceso de extracción y purificación aplicados en esta investigación no alteran o afectan la integridad molecular y catalítica de la enzima.



Gráfica 22. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la PME I de frutos de nísperos.



Gráfica 23. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la PMEII de frutos de nísperos.

En el trabajo realizado por Bedoya (2002) las constantes cinéticas aparentes se calcularon a través de la representación lineal de Lineweaver-Burk la cual indica que la PME del níspero var. Prolífico tiene una K_m de 0,04 mg/ml y una $V_{máx}$ de 0,8235 Δ Abs/h los cuales son muy altos comparados a los obtenidos en la presente

investigación, pero esto es posiblemente debido a que se realizó una purificación parcial.

Estos valores son comparables a los obtenidos por Castaldo y col., (1989) en frutos de manzanas (*Malus communis*) donde encontraron dos isoenzimas, denominadas A y B, que difieren en sus cargas eléctricas y pesos moleculares, pero tienen iguales parámetros cinéticos, encontraron que ambas isoenzimas tienen una K_m de $1,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una $V_{\text{máx}}$ de $0,73 \text{ }\mu\text{mol metanol}\cdot\text{min}^{-1}$. La K_m y $V_{\text{máx}}$ tan bajas reportadas para níspero demuestran la alta afinidad de las isoenzimas por el sustrato.

Los valores obtenidos para la PME I y PME II de Níspero son bajas en relación a los resultados de otras investigaciones como por ejemplo Rillo y col., (1992) en frutos de mandarina, donde determinaron que la K_m de la PME es de $0,84 \text{ mg/mL}$ y la $V_{\text{máx}}$ es de $0,38 \text{ }\mu\text{mol de ácido/h}$. Por parte Alonso y col., (1997), detectaron dos isoenzimas en frutos de kaki (*Diospyros kaki*), que fueron llamadas PME I y PME II, cuyas K_m demuestran que la PME II de kaki es más afín al sustrato con un valor de $31 \text{ }\mu\text{g x mL}^{-1}$ que la PME I que tiene una K_m de $54 \text{ }\mu\text{g x mL}^{-1}$.

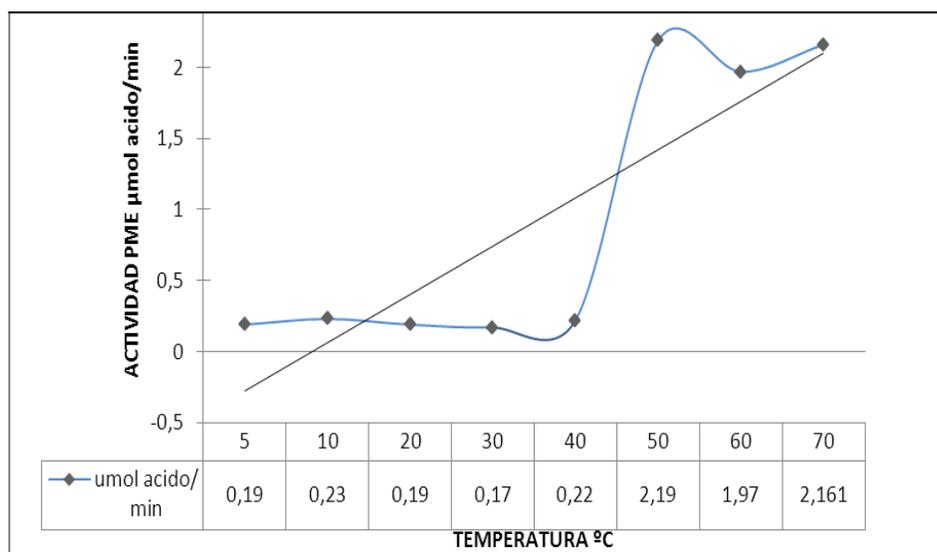
En pulpas de toronja se detectaron cuatro isoenzimas llamadas RGPME 1, 2, 3 y 4. La RGPME 3 tiene una K_m de $0,106 \text{ mg x mL}^{-1}$. La RGPME 2 es la forma más abundante de las isoenzimas encontradas y tiene una K_m de $0,079 \text{ mg pectina cítrica/mL}$ (Cameron y Grohman, 1995). En manzanas cv. Golden Delicious se encontró la presencia de una sola enzima para la PME los parámetros cinéticos de la enzima fueron una K_m de $0,098 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una $V_{\text{máx}}$ de $3,86 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ de enzima (Denés y col., 2000).

5.5. Temperatura Óptima

Como se puede observar en la Grafica 24 para la isoenzima PME I se probó la temperatura óptima de acción encontrándose que el porcentaje de actividad a las

temperaturas de 5, 10, 20, 30 y 40 °C fue inferior al 0,23 μmol ácido/min representando sólo el 10,5 % de la actividad en relación a la observada a 50 °C. El incremento a esta temperatura alcanzó la cifra de 2,19 μmol ácido/min. De igual manera a 60 y 70 °C la actividad es alta alcanzando valores de 1,97 y 2,16 μmol , ácido/min, esto indica un rango de actividad a altas temperatura entre 50 y 70 °C (Ver Gráfica 24)

Basados en estos resultados se determinó que la temperatura óptima de la actividad de la PME I es a 50 °C, lo cual fue corroborado por la prueba de medias calculada para la PME I (Ver Cuadro 10 y Anexo 4).



Grafica 24. Representación gráfica de la actividad de la PME I a diferentes temperaturas.

Diversas investigaciones han demostrado la termoestabilidad de la PME. Por ejemplo en frutos de guayaba (*Psidium guajava*) la PME tiene una temperatura óptima de 95 °C siendo ésta la temperatura más alta reportada (Carvalho y col., 2009). En frutos de limón Macdonald y col., (1993) purificaron dos isoenzimas de la PME, una localizada en la piel y la otra en el endocarpo, la temperatura óptima

para la PME del endocarpo fue de 70 °C, reteniendo 33 % de actividad y la PME de la piel presentó una temperatura óptima de 67 °C reteniendo un 81 % de actividad. Estos resultados demuestran que algunas de las PME estudiadas en diferentes frutos tienen temperaturas óptimas muy altas.

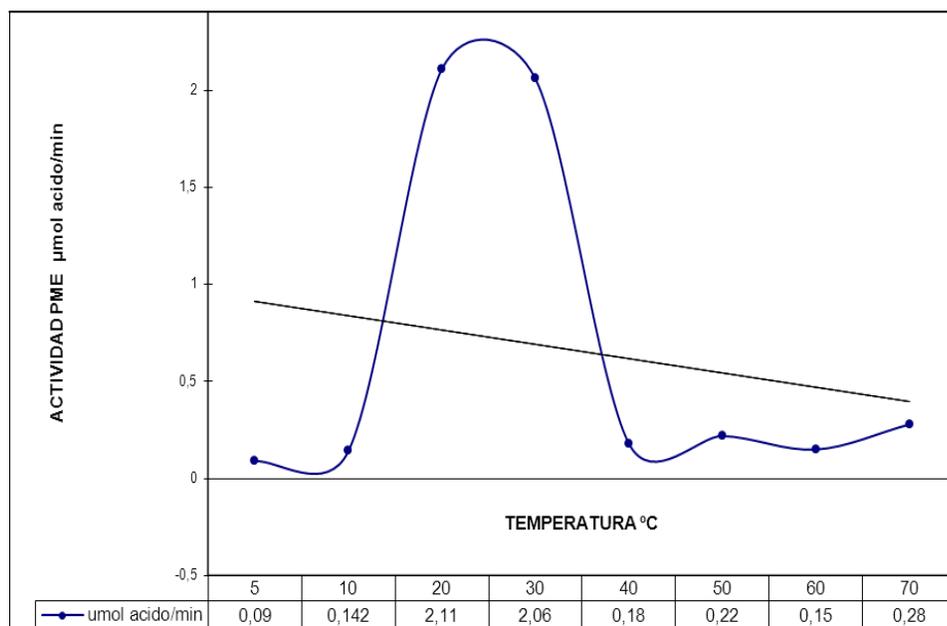
Esta termoestabilidad tal vez sea conferida porque son enzimas glicosiladas. Además esta capacidad de algunas PME puede ser un mecanismo adaptativo que permite a la enzima soportar altas temperaturas y aun así presentan actividad ya sea para permitir el crecimiento del fruto o su posterior ablandamiento una vez que ocurra la maduración.

En otro estudio realizado en manzanas cv. Golden Delicious se encontró la presencia de una sola enzima para la PME con una temperatura óptima de 63 °C (Denés y col., 2000) demostrando las PMEs pueden tener altas temperaturas óptimas de acción.

De igual manera se probó la temperatura óptima para la isoenzima PME II, de acuerdo a la metodología planteada. Para esta PMEII se encontró que la más alta actividad está entre 20 y 30°C con valores de 2,11 y 2,06 μmol ácido/min respectivamente (Gráfica 25), siendo estos valores considerablemente más altos que en el resto de los tratamientos aplicados lo cuales oscilaban entre 0,09 y 0,28 μmol ácido/min, representado solamente entre el 4,26 y 13,27% de la actividad obtenida a entre 20 y 30°C.

En conclusión la PMEII tiene su actividad óptima en un rango de temperatura de 20 a 30 °C, por lo cual se calculó un promedio entre las dos temperaturas y se determinó que la temperatura óptima es de 25°C.

Los análisis estadísticos de ANAVAR y la prueba de medias indican que las temperaturas de 20 y 30 °C es donde se obtiene mayor valor de la actividad de la PME II (Ver Anexo 4 y Cuadro 10).



Gráfica 25. Representación gráfica de la actividad de la PME II a diferentes temperaturas.

Cuadro 10. Prueba de Medias de la de la actividad de la PME I y de la PMEII para determinar la temperatura óptima.

Temperaturas (°C)	Actividad de la PME	
	PME I	PME II
5	0,190 E	0,093 G
10	0,230 D	0,143 F
20	0,193 E	2,110 A
30	0,170 F	2,063 B
40	0,223 D	0,183 E
50	2,193 A	0,220 D
60	1,973 C	0,150 F
70	2,163 B	0,280 C

En estudios realizados por Bedoya (2002) donde purificó parcialmente a la PME a partir de frutos de níspero se detectaron dos picos de actividad, el primero a

10 °C y el segundo a 50 °C. El segundo pico de actividad a 50 °C coincide con el obtenido en esta investigación. Al comparar estos resultados podemos concluir que las evidencias indican que las temperaturas óptimas de acción para la PMEII es de 25 °C y para la PME I es de 50 °C. La diferencia de la temperatura observada a 10 °C en el trabajo de Bedoya (2002) y la presente investigación, tal vez sea debido a que la enzima fue purificada parcialmente en el primer caso.

5.6. pH Óptimo

La prueba para determinar el pH óptimo de acción se realizó considerando la temperatura óptima de cada isoenzima, es decir, para la PME I la temperatura de incubación fue de 50°C y para la PME II la temperatura de incubación fue de 25 °C. Los resultados para este ensayo se muestran a continuación.

Se probó la actividad de la PME I a diferentes pHs, con valores de pH 2 hasta pH 11. En la Gráfica 26 se puede observar que a pH 4 es donde se observa la mayor actividad de la PME I con un valor de 2,52 μmol ácido/min, sin embargo a pH 3 y 5 también se observa una gran actividad de la PME, con valores de 2,25 y 1,65 respectivamente, es decir tiene una actividad óptima en un rango de pH de 3 a 5.

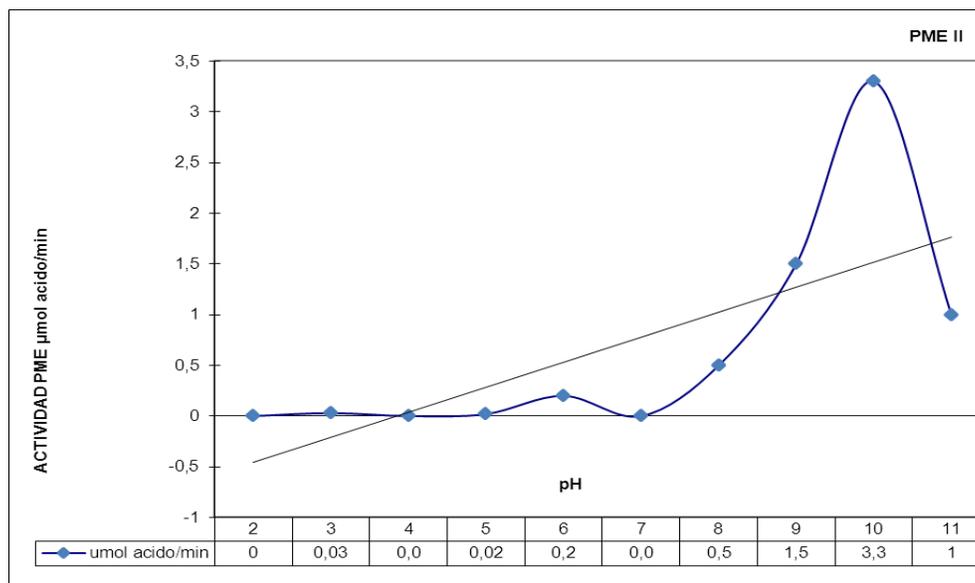
Los resultados obtenidos en esta investigación permiten comprobar el estudio realizado por Bedoya (2002) en frutos de níspero de la variedad prolifera donde se purificó parcialmente la PME y sólo se detectó un pico de actividad entre pH 3 y 4. Esto indica que tiene su actividad máxima a pHs ácidos. A valores superiores o inferiores presentó una disminución de la actividad, por ejemplo a pH 2 su actividad se redujo en un 75.67 % y a pH 5 se redujo en un 66.21 %.

Estos ensayos permiten determinar que aunque la PME tiene un amplio rango de actividad (entre pH 2 y pH 11) presenta un pico máximo entre pH 3 y 4. A

Cuadro 11. Prueba de Medias de la de la actividad de la PME I y de la PMEII para determinar el pH óptimo.

pH	Absorbancia de Actividad PME	
	PME I	PME II
2	0,200 E	0,000 G
3	2,250 B	0,033 F
4	2,523 A	0,000 G
5	1,653 C	0,017 FG
6	0,250 D	0,203 E
7	0,153 F	0,000 G
8	0,000 G	0,503 D
9	0,000 G	1,500 B
10	0,000 G	3,300 A
11	0,000 G	1,000 C

Para la PMEII también se probó la actividad a diferentes pHs. En la Gráfica 27 se observa que hay un pico de actividad a pH 10 con un valor de 3,3 μmol ácido/min, mientras que a pH 9 y 11 también se observa actividad de la enzima pero con valores de 1,5 y 1,0 μmol ácido/min, respectivamente. Sin embargo, a pHs ácidos la actividad de la enzima es prácticamente nula, inferior 0,2 μmol ácido/min.



Grafica 27. Representación gráfica de la actividad de la PME II a diferentes pHs.

Los análisis estadísticos de ANAVAR y prueba de medias indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos y que la PMEII tiene una alta actividad a un pH de 10 (Ver Anexo 5 y Cuadro 11).

Los valores obtenidos permiten concluir que el espectro de acción de la PME a diferentes pHs es muy amplio, ya que por ejemplo en frutos de kaki (*Diospyros kaki*) se determinó que la PME I tiene un pH óptimo de 7,4 y la PMEII de 7,8 (Alonso y col., 1997) a diferencia de la PME II de níspero, donde el pH óptimo es más alto, alcanzando un valor de 10. Así mismo, en frutos de manzanas (*Malus communis*) existen dos isoenzimas cuyo pH óptimo está entre 6,5 y 7,5 (Castaldo y col., 1989). En otro estudio realizado en manzanas cv. Golden Delicious se encontró la presencia de una sola enzima para la PME y su pH óptimo fue estimado sobre 7,5 (Denés y col., 2000). En el lino (*Linum usitatissimum L.*) se encontraron diferentes isoenzimas de la PME y se clasificaron en dos grupos, las que tienen grandes picos de actividad entre un pH de 8 y 9 y las que lo hacen a un pH entre 9,5 y 10 (Alexandre y col., 1997).

Esta capacidad de permanecer activa a pH muy bajos o muy altos se debe a que son enzimas glicosiladas. Esta glicosilación permite incrementar la tolerancia al pH (Cameron y Grohman, 1996) ya que le confiere molecularmente resistencia a estos factores.

De acuerdo a lo reportado por Micheli (2001) las PME pueden tener diferentes modos de acción. Algunas isoformas de la PME pueden actuar aleatoriamente a pH ácido pero lo hacen linealmente a un pH alcalino y a un pH determinado, algunas isoformas son más efectivas que otras sobre pectinas altamente metilesterificadas. La presencia de isoenzimas con actividades óptimas a pH alcalino y otra a pH ácido brinda una visión del grado de adaptabilidad de las plantas al entorno.

Para la explicación de la presencia de dos isoenzimas con pHs tan disimiles pueden considerarse los siguientes criterios:

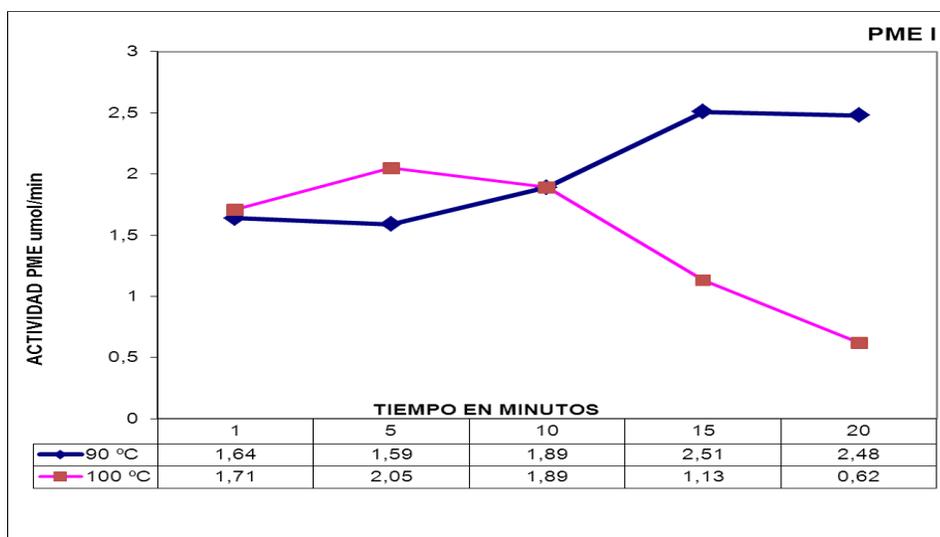
- La PME I puede ser una forma inmadura o aún no activa de la PME II o viceversa.
- La PME I y la PME II pueden ser isoenzimas ubicadas en diferentes estructuras de la célula. Por ejemplo la PME I que actúa a pH ácido está ubicada en el apoplasto, a nivel de la pared celular. La PME II por tener un pH óptimo alcalino es una enzima ubicada intracelularmente.
- La explicación más razonable para este hecho, tal vez se deba a que cada una de ellas actúan en momentos diferentes del desarrollo. Es importante señalar que el fruto de níspero fue colectado en la etapa de madurez fisiológica, momento en el cual el fruto deja de crecer para iniciar los cambios organolépticos, entre ellos la pérdida de la firmeza. Una de las PME estaría asociada al crecimiento y endurecimiento de la pared y la otra asociada al reblandecimiento de la pared durante la maduración (Micheli, 2001). Como la etapa en la cual se hizo la colecta es de transición coexistían las dos isoenzimas en el tejido.

5.7. Estabilidad al Calor

Los reportes de la literatura denotan que la PME es una enzima altamente termoresistente, hecho que fue comprobado con los ensayos de estabilidad al calor de las dos isoenzimas de la PME de frutos de níspero.

La PME I demostró una gran estabilidad al tratamiento térmico. En la gráfica 28 se observa como la enzima en el tratamiento a 90 °C va incrementando su actividad a medida que transcurre el tiempo, desde 1,64 μmol ácido/min hasta 2,51 μmol ácido/min luego de 15 minutos a 90 °C, para luego descender levemente a 2,48 μmol ácido/min a los 20 minutos de tratamiento. Esto demuestra su gran estabilidad al calor. Después de 20 minutos a 90°C la PME I retiene el 100% de la actividad. Por el contrario cuando la enzima PME I fue tratada con temperaturas de 100 °C se observa que a uno, cinco y diez minutos la actividad era de 1,71, 2,05 y 1,89 μmol ácido/min respectivamente, para luego comenzar a descender hasta alcanzar su mínimo valor en el tratamiento de veinte minutos con un valor de actividad de 0,62

μmol acido/min. La PME I después de 20 minutos a 100°C mantiene el 30,24 % (Ver Grafica 28).

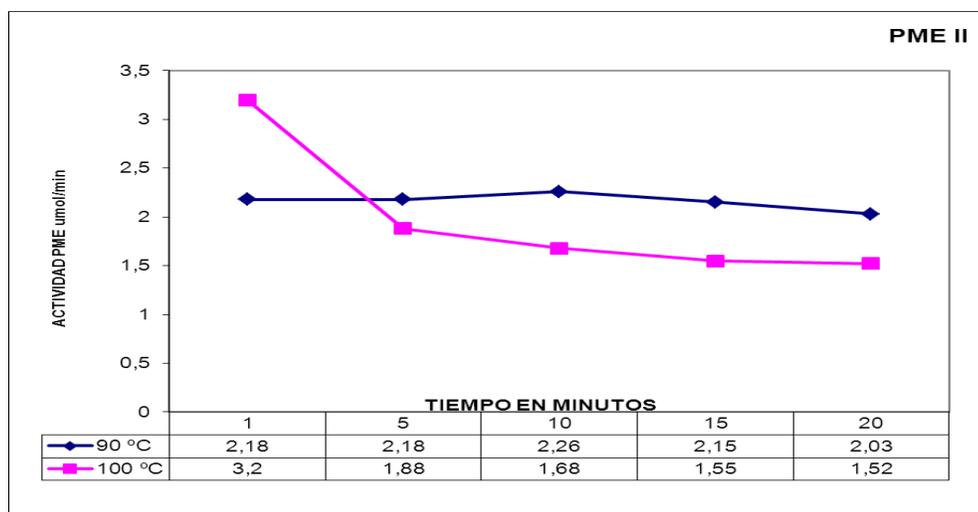


Gráfica 28. Actividad residual de la PME I tratada a 90 y 100°C en diferentes tiempos.

Los análisis realizados de estabilidad al calor de la PMEII muestran que es menos termorresistente que la PME I. La PME II tratada con temperaturas de 90°C a diferentes tiempos tiene valores de actividad superiores a $2 \mu\text{mol}$ acido/min. El menor valor obtenido fue de $2,03 \mu\text{mol}$ acido/min (a 20 minutos de tratamiento) y el mayor valor de $2,26 \mu\text{mol}$ acido/min (en el tratamiento de 10 minutos). Después de 20 minutos de tratamiento a 90°C la PME I retuvo el 89,82 % de la actividad (Ver Gráficas 28 y 29).

Cuando la PME II fue tratada con 100°C se observó que en el tratamiento de un minuto la actividad residual fue muy alta alcanzado los $3,20 \mu\text{mol}$ acido/min; sin embargo, a medida que se fue aumentando el tiempo del tratamiento la actividad disminuyó paulatinamente, obteniéndose valores inferiores a los que se obtuvieron con los tratamiento a 90°C . Por ejemplo en el tratamiento de cinco minutos la actividad fue de $1,88 \mu\text{mol}$ acido/min; a los diez minutos, y quince minutos la actividad fue de $1,55 \mu\text{mol}$ acido/min, y a los veinte minutos fue de $1,52 \mu\text{mol}$

ácido/min. La PMEII después de 20 minutos a 100°C retuvo 47,5 % de la actividad. Estos resultados indican que la PME II muestra mayor termorresistencia a 90°C que a 100°C, sin embargo los valores obtenidos permiten concluir que la PME I y la PMEII del níspero son termoestables.



Grafica 29. Actividad residual de la PME II tratada a 90 y 100 °C en diferentes tiempos.

En el análisis realizado por Bedoya (2002) en frutos de níspero se evidenció que la PME I perdió actividad al aumentar el tiempo de calentamiento, ya que una vez transcurridos 9 minutos se registró la menor actividad tanto para los que se trataron a 90 °C como para los tratados a 100 °C. La PME I retuvo actividad residual 83.3 % después de 9 minutos y a 90 °C retuvo el 77.63 % de la actividad. De igual manera la PMEII es altamente resistente al calor, a 100 °C y después de 9 minutos de tratamiento mantuvo 89.5% y a 90 °C después de 9 minutos retuvo el 97.4 % de la actividad (Bedoya, 2002).

El análisis de varianza realizado indica diferencias altamente significativas en los tratamientos de temperatura y tiempos aplicados, observándose en la prueba de medias (Ver Anexo 6 y Cuadro 12) que para la PME I el tratamiento a 90 °C durante 15 y 20 es mayor la actividad, formando el Grupo A. Sin embargo en la PMEII que

el tratamiento de 1 minuto a 100 °C es donde hay mayor actividad, formando el grupo A.

En la investigación realizada por Carvalho y col., (2009) en frutos de guayaba (*Psidium guajava*) se reporta que la PME obtenida es altamente termoestable. Después de 300 minutos a 90°C la PME de guayaba retiene un 96,8 % de la actividad. Siendo esta enzima la con la mayor termoestabilidad reportada. Biológicamente la termoestabilidad demostrada por estas isoenzimas de la PME, no sólo en frutos de níspero, sino, también en otros frutos tal vez sea explicada por La glicosilación de estas enzimas. Esta glicosilación es en parte responsable de la estabilidad térmica (Cameron y Grohman, 1996) ya que le confiere molecularmente resistencia a estos factores.

Cuadro 12. Prueba de Medias de la de la actividad residual de la PME I y de la PMEII tratadas a temperatura de 90 y 100 °C

TEMPERATURA (°C)	Tiempo (min)	PME I	PME II
90	1	1,640 DE	2,183 B
90	5	1,587 E	2,200 B
90	10	1,887 C	2,257 B
90	15	2,513 A	2,153 B
90	20	2,483 A	2,033 C
100	1	1,713 D	3,200 A
100	5	2,050 B	1,880 D
100	10	1,893 C	1,683 E
100	15	1,133 F	1,550 F
100	20	0,617 G	1,517 F

Al comparar la actividad residual de las isoenzimas de frutos nísperos se puede notar que la PME II es más termorresistente que la PME I. Los resultados obtenidos en este estudio son contrastantes con el estudio de Alonso y col., (1997) en frutos de kaki (*Diospyros kaki*) donde las dos isoenzimas demuestran una alta estabilidad al calor, manteniendo un 80 % de la actividad inicial después de 5

minutos, a 80 °C para la PME1 y a 70°C para la PME2, pero ambas son inactivadas a 90 °C durante 5 minutos de incubación, esto demuestra que las PME de nísperos son más termoestables.

Cameron y Grohman (1995) detectaron en pulpas de toronja cuatro isoenzimas de la PME, RGPME 1, 2, 3 y 4. La RGPME 3 es la más estable térmicamente reteniendo 45,2 % de actividad después de 60 segundos a 95 °C, las RGPME 1, 2 y 4 fueron totalmente inactivadas después de 30 segundos de incubación a 95 °C.

CONCLUSIONES

Basados en la investigación que se ha realizado se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Se diseñó una nueva metodología de extracción de las isoenzimas de la PME de nísperos, que permite obtener un extracto enriquecido de la PME en forma rápida, sencilla.
2. Se purificó la PME a partir de la pulpa de frutos de níspero de la variedad prolifera mediante la precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en gel sephadex G-50.
3. Se demostró la presencia de dos isoenzimas de la PME en los frutos de nísperos de la variedad prolifera, denominadas PME I y PME II.
4. La PME I y la PME II tienen igual K_m , $V_{máx}$ y Peso Molecular pero difieren en su pH y temperatura óptima. La K_m de la PME I y la PME II es de 1,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y la $V_{máx}$ es de 0,078 μmol , ácido/min. El Peso Molecular de la PME I y de la PME II es de 42 kD. La temperatura óptima de la PME I es de 50 °C y de la PME II es de 25 °C. El pH óptimo de la PME I es de 4 y de la PME II es 10.
5. Ambas isoenzimas son termorresistentes, sin embargo la PME II es más estable que la PME I.
6. Las isoenzimas de la PME en frutos de níspero son glicosiladas. Este grupo de carbohidratos está compuesto en parte por grupos manosídicos.

RECOMENDACIONES

1. Realizar el análisis correspondiente para determinar la composición y secuencia de aminoácidos de las isoenzimas de PME I y PME II.
2. Liofilizar las isoenzimas PME I y PME II de frutos de níspero.
3. Hacer pruebas a nivel agroindustrial para determinar la aplicabilidad de las isoenzimas de la PME de nísperos.
4. Realizar los análisis correspondientes para determinar el porcentaje y la composición de los carbohidratos que glicosilan a las isoenzimas PME I y PME II de frutos de níspero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abu-Sarra, A. y Abu-Goukh. 1992. Changes in pectinesterases, polygalacturonase and cellulase activity during mango fruit ripening. *J. Hort. Sci.* 67 : 561-568.
2. Alexandre, F., Morvan, O., Gafe, J., Mareck, A., Jauneau, A., Dauchel, H., Balangé, A. y Morvan, C. 1997. Pectin methylesterase pattern in flax seedlings during their development. *Plant Physiol. Biochem.* 35: 427-436.
3. Alonso, J., Rodríguez, M. y Canet, W. 1995. Detection of pectinesterase in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 16: 39-42.
4. Alonso, J., Howell, N. y Canet, W. 1997. Purification and characterization of two pectinmethylesterase from persimmon (*Diospyros kaki*). *J. Sci. Food Agric.* 75: 352-358.
5. Andrews, P. y Shulin, L. 1995. Cell wall hydrolytic enzyme activity during development of nonclimateric sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *J. Hort. Sci.* 70: 561-567.
6. Arnao, E. 2003. Selección asistida por marcadores moleculares en un programa de retrocruzas en arroz. Tesis de Maestría, Postgrado en Agronomía, UCV.
7. Avilán, L., Laborem, G., Figueroa, M. y Rangel, L. (1980). Absorción de nutrimentos por una cosecha de Níspero (*Achras sapota* L.). *Agron. Trop.* 30 (1-6): 7-16.
8. Bajard, C., Fauveau, C., Grassin, C. y Pellerin, P. 2006. Enzimas para la enología. Modo de producción, modo de acción e Impacto en la transformación de la uva en vino. *Revista Enología* N° 5. Año III Noviembre-Diciembre 2006 (82-85).
9. Bedoya, A. 2002. Actividad de las enzimas poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, celulasa y patrón de proteínas durante la maduración de frutos de níspero (*Manilkara zapota* var. Prolific). Trabajo para optar al grado de Magíster Scientiarum en Botánica Agrícola. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 128 p.
10. Bedoya, A. 2009. Análisis físico y químico durante el desarrollo de frutos de níspero (*Manilkara zapota* var. Prolific). Trabajo de Ascenso presentado para

optar a la Categoría de Asistente. Instituto “Rafael Alberto Escobar Lara” de la Universidad Pedagógica Experimental Libertador, Maracay. 71 p.

11. Berlijn, J. y Van Haeff, J. (1994). Fruticultura. México; Editorial Trillas. 17-19 p.
12. Bohinski, R. 1991. Bioquímica. (5a. ed.). (Ramón Elizondo Mata trad.). Adisson-Wesley Iberoamericana. 190 p.
13. Bradford, M. 1976. A rapid sensitive assay for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
14. Cabrera, J. 1995. Characterization of pectic substances from a commercially prepared citrus pectin. *Cult. Trop.* 16: 37-40.
15. Cabrera, J., Gutiérrez, A. y Varela, M. 1995. Comparación del ácido péctico obtenido a partir de albedo de lima persa con el polipectato de sodio reactivo. *Cul. trop.* 16: 29-31.
16. Cameron, R. y Grohmann, K. 1995. Partial purification and thermal characterization of pectinmethylesterase from red grapefruit finisher pulp. *J. Food Sci.* 60: 821-825.
17. Cameron, R. y Grohmann, K. 1996. Purification and characterization of a thermally tolerant pectin methyleterase from a commercial Valencia fresh frozen orange. *J. Agric. Food Chem*, 44, 458-462.
18. Carvalho, A., De Assis S., Leite, K., Bach E. y Oliveira, O. 2009. Pectin methylesterase activity and ascorbic acid content from guava fruit, cv. *Predilecta*, in different phases of development. *Int J Food Sci Nutr.* May;60 (3):255-65.
19. Castaldo, D., Quagliuolo, L., Servillo, L. Balestrieri, C. y Giovane, A. 1989. Isolation and characterization of pectin methylesterase from apple fruit. *J. Food Sci.* 54: 653-655.
20. Cooper, T. 1984. Instrumentos y Técnicas de Bioquímica. Editorial REVERTÉ, S.A. Barcelona, España. 441 p.
21. Cutillas, A. (1993). Participación de los polisacáridos de la pared celular en el control de la textura del fruto de *Diospyros kaki*.. Trabajo de ascenso para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia-España.

22. Denés, J. M., Baron, A. y Drilleau, J. F. 2000. Purification, properties and heat inactivation of pectin methylesterase from apple (cv Golden Delicious). *J. Sci. Foods Agric.* 80: 1503-1509.
23. Díaz-Sobac, R., De La Cruz, J., Vázquez, A., Beristain, C. y García, H. 1997. Evaluation of softening and associated enzyme activities during the ripening of coated 'Manila' mangoes. *J. Hort. Sci.* 72: 749-753.
24. Ding, J., Hsu, J., Wang, M. y Tzen, J. 2002. Purification and glycosylation analysis of an acidic pectin methylesterase in jelly fig (*Ficus awkeotsang*) achenes. *J. Agric. Food Chem* 50, 2920-2925.
25. Drayen, M. y Vat Cutsem, P. 2008. Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *J. of Plant Physiology* 165: 1152—1160.
26. Figueroa, M. (1978). Cultivo del níspero. Primer Curso Internacional de Fruticultura Tropical. MAC. FONAIAP. 16 p.
27. Flores, M., Páiz, L., De Ortega, M., Ortiz, J., Deshpande, S. y Rolz, C. 1971. Variación de los constituyentes pécticos solubles y de la actividad de la pectinesterasa durante el proceso de maduración de algunas frutas. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.* 11: 594-602.
28. Gaffé, J., Tieman, D. y Handa, A. 1994. Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues. *Plant Physiol.* 105: 199-203.
29. Gil, F. y Velaverde, A. (1980). Tratado de arboricultura frutal. Aspectos de la morfología del árbol frutal. Vol. I. México; Ediciones Mundi-Prensa.
30. Giovane, A., Quanglinolo, D., Castaldo, D., Servillo, L. y Balestrieri, C. 1990. Pectinmethylesterase from *Actinidia chinensis* fruit. *Phytochem.* 29: 2821-2823.
31. Guadarrama, A. y Rivas, N. 1990. Purificación y caracterización cinética de la enzima polifenol oxidasa del ocumo (*Xanthosoma sagittifolium*). *Rev. Fac. Agron. U.C.V.* 16: 65-86. 113 p.
32. Guadarrama, A. 1994. Aspectos bioquímicos durante la maduración de frutos de Jobo de la India (*Spondias cithera* Sonner), Níspero del Japón (*Eribotrya japónica* Lindl) y Pomagas (*Syzigium malaccense* L. Merr and Perry). Trabajo de ascenso para Asociado. U.C.V-Facultad de Agronomía.

33. Hagerman, A., y Austin, P. 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methylesterase. *J. Agric. Food Chem.* 34: 440-444.
34. Herrera, E. 1996. Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas. Volumen I. Interamericana McGraw-Hill. España. 1.110 p.
35. Hill, T.A. (1977). Hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. Ediciones Omega S.A. Barcelona-España. 102 p.
36. Hoyos, J. 1994. Frutales en Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. pp. 290-293.
37. Javeri, H. y Wicker, L. 1991. Partial purification and characterization of peach pectinesterase. *J. Food Biochem.* 15: 241-252.
38. Jiang, Ch., Wu., M., Chang, W. y Chang, H. 2001. Change in Particle Size of Pectin Reacted with Pectinesterase Isozymes from Pea (*Pisum sativum* L.) Sprout. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4383-4387
39. Johanson, K., El-Ahmad, M., Friemann R., Jörnvall, H., Markovic, O. y Eklund H. 2002. Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters.* 243-249.
40. Junqueira, L. y Carneiro, J. 1997. Biología celular y molecular. (Eduardo Bustos Trad.). (6ª. ed.). Interamericana McGraw-Hill. México. 324 p.
41. Laborem, G., Figueroa, M., Rancel, L. y Bandres, L. 1981. Estudio de la calidad de la fruta en las principales variedades comerciales de níspero en Venezuela. VIII Convención Anual de Fruticultores. FONAIAP. 12 p.
42. Laats, M., Grosdenis, F., Recourt, K., Voragen, A., y Wichers, H. 1997. Partial Purification and Characterization of Pectin Methylesterase from Green Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45 (3), pp 572-577
43. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-687
44. Leal, F. y Grazia, M. 1986. Manual de Prácticas de Fruticultura. Costa Rica: IICA. 181 p.
45. Lehninger, A. 1982. Bioquímica. Las Bases moleculares de la estructura y función celular. (2ª. ed). España: Ediciones Omega. 1117 p.

46. Lester, G. y Dunlap, J. 1985. Physiological changes during development and ripening of 'Perlita' Muskmelon fruits. *Sci. Hort.* 26: 323-331.
47. Lin, T., Liu, C., Chen, S. y Wang, W. 1989. Purification and characterization of pectinmethylesterase from *Ficus awkeotsang* Makino Achenes. *Plant Physiol.* 91: 1445-1453.
48. Macdonald, H., Evans, R. y Spencer, W. 1993. Purification and properties of the major pectinesterase in lemon fruits (*Citrus limon*). *J. Sci. Food Agric.* 62: 163-168.
49. Marquis, H. y Bucheli, P. 1994. Inhibition of tomato pectin methylesterase by partially purified kiwi pectin methylesterase inhibitor protein. *Int. J. Food Sci. Tech.* 29: 121-128.
50. Micheli, F. 2001. Pectin methylesterase: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* Vol. 6. N° 9: 414-419.
51. Ministerio de Agricultura y Cria (MAC). 2000. Anuario Estadístico. Caracas. Venezuela.
52. Monzón, P. 1992. Introducción al diseño de experimentos. Alcance 34. FAGRO-UCV- Maracay. 167 p.
53. Nuñez, M., Breulis, L., Souty, M. y Gómez, R. 1992. Características generales de las sustancias pécticas de la corteza de los frutos de lima persa. *Cult. Trop.* 13 (2-3) 77-81.
54. Pérez-Almeida, I. y Carpita, N. 2006. Las β -Galactosidasas y la dinámica de la pared celular. *INTERCIENCIA*. Jul 2006, Vol. 31 N° 7.
55. Rillo, L., Castaldo, D., Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C. y Quagliuolo, L. 1992. Purification of pectin methylesterase from mandarin orange fruit. *J. Agric. Food Chem*, 40, 591-593.
56. Rivas, N. y De Martos, C. 1979. Caracterización físico-química del níspero (*Achras sapota*) del Estado Zulia y Estudio de su adaptabilidad al enlatado. *Rev. Fac. Agron.* 10 (1-4) 57-69.
57. Rodrigo, D., Corte's, C., Clynen, E., Schoofs, L., Van Loey, A. y Hendrickx, M. 2006. Thermal and high-pressure stability of purified polygalacturonase and pectinmethylesterase from four different tomato processing varieties. *Food Research International* 39: 440-448
58. Roskoski, R. 1997. Bioquímica. Interamericana McGraw-Hill Editores. 350 p.

59. Ruehle, G. 1987. Nispero o Chicozapote. En: Frutales: Manual Práctico. (7.a. ed.) N°: 91-92. Editado por TOA. Colombia.
60. Salisbury, F. y Ross, C. 2000. Fisiología de las Plantas. (Trad. José Manuel Alonso). Thomson Editores Spain PARANINFO. España. 988 p.
61. Samson, J. 1991. Fruticultura Tropical (González Gurza, B. Trad.). México: Editorial Limusa.
62. Seymour, T., Preston, J., Wiocker, L., Lindsay, J., Wei, C. y Marshall, M. 1991. Purification and properties of pectinesterases of marsh white grapefruit pulp. *J. Agric. Food Chem* 39: 1080-1085.
63. Versteeg, C., Rombouts, F., Spaansen, H. y Plnik, W. 1980. Thermoestability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *J. Food Sci.* 45: 969-971.
64. Vovk, I. y Simonovska, B. 2007. Isolation of tomato pectin methylesterase and polygalacturonase on monolithic columns. *Journal of Chromatography A*, 1144 (2007) 90–96.
65. Wong, D. 1995. Química de los alimentos, mecanismo y teoría. España; Editorial Acribia. 476 p.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de Varianza de la Actividad de la PME y de la concentración de proteínas de los extractos obtenidos por los diferentes métodos de extracción.

Fuente de Variación	gl	Cuadrados Medios	
		Actividad PME	Concentración de Proteínas (mg/mL)
Repetición	2	0,002	16,194
Métodos de extracción	5	1,386 **	13.249,42 **
Error	10	0,005	9,232
Total	17		
CV (%)		11,15	1,35

Anexo 2. Análisis de Varianza de la Actividad de la PME de las soluciones precipitadas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio líquido y sólido.

Fuente de Variación	gl	Cuadrados medios para Actividad PME	
		Pellet	Sobrenadante
% sulfato de amonio (A)	11	0,075 **	0,053 **
Forma de uso del sulfato de amonio (B)	1	0,128 **	0,000
A x B	11	0,010 **	0,040 **
Error	48	0,001	0,001
Total	71		
CV (%)		7,92	8,97

Anexo 3. Análisis de la varianza para la concentración de proteínas en pellet del precipitado con distintas concentraciones de sulfato de amonio

Fuente de Variación	gl	Cuadrados Medios
repetición	2	46,702
% sulfato de amonio	11	22.220,82 **
Error	22	23,208
Total	35	
CV (%)		3,14

Anexo 4. Análisis de la varianza de la actividad de la PME I y de la PME II para determinar la temperatura óptima.

Fuente de Variación	gl	Cuadrados Medios			
		PME I		PME II	
Repetición	2	0,0001		0,0001	
Temperatura	7	2,9414	**	2,3512	**
Error	14	0,0001		0,0001	
Total	23				
CV (%)		0,89		3,16	

Anexo 5. Análisis de la varianza de la actividad de la PME I y de la PME II para determinar el pH óptimo.

Fuente de Variación	gl	Cuadrados Medios			
		PME I		PME II	
Repetición	2	0,0001		0,0001	
pH	9	3,1162	**	3,3791	**
Error	18	0,0001		0,0001	
Total	29				
CV (%)		2,48		1,71	

Anexo 6. Análisis de la varianza de la actividad residual de la PME I y de la PME II a temperatura de 90 y 100 °C.

Fuente de Variación	gl	Cuadrados Medios			
		PME I		PME II	
Temperatura (A)	1	2,192	**	0,298	**
Error	4	0,002		0,002	
Tiempo (B)	4	0,113	**	0,798	**
A x B	4	1,555	**	0,711	**
Error	16	0,004		0,004	
Total	29				
CV (%)		3,6		3,25	

Anexo 7. Estadísticos descriptivos e Intervalo de Confianza para las fracciones con actividad de la PME obtenidas en la cromatografía por fraccionamiento 1.

DESVIACIÓN ESTANDAR	IC	PROMEDIO	MAXIMO	MINIMO	PROMEDIO
1,493	1,690	11,9	13,590	10,210	11,9
0,458	0,519	8,5	9,019	7,981	8,5
0,954	1,079	9	10,079	7,921	9
0,265	0,299	6	6,299	5,701	6
0,2	0,226	5	5,226	4,774	5
0,265	0,299	5	5,299	4,701	5
0,208	0,236	6,233	6,469	5,998	6,233
0,265	0,299	8	8,299	7,701	8
0,252	0,285	9,233	9,518	8,949	9,233

Anexo 8. Estadísticos descriptivos e Intervalo de confianza para la concentración de proteínas de la PME I y la PMEII.

DESVIACIÓN ESTANDAR	IC	PROMEDIO	MÁXIMO	MINIMO	PROMEDIO	
0,455	0,514	19,6	20,114	19,086	19,6	PMEI
0,340	0,385	18,5	18,885	18,115	18,5	PMEII

Anexo 9. Estadísticos descriptivos e Intervalo de confianza para la actividad de la PME I y la PMEII

DESVIACIÓN ESTANDAR	IC	PROMEDIO	MÍNIMO	MÁXIMO	PROMEDIO	
0,265	0,103	1,2	1,303	1,097	1,19	PMEI
0,153	0,059	0,9	0,993	0,874	0,88	PMEII

Anexo 10. Estadísticos descriptivos e Intervalo de confianza para las fracciones obtenidas en la cromatografía `bacht` con Sephadex G-50

DESVIACIÓN ESTANDAR	IC	PROMEDIO	MAXIMO	MINIMO	PROMEDIO
0,1	0,113	0,6	0,713	0,487	0,6
0,208	0,236	1,367	1,602	1,131	1,367
0,208	0,236	1,067	1,302	0,831	1,067
0,1	0,113	0,4	0,513	0,287	0,4
0,0208	0,024	0,133	0,157	0,110	0,133
0,0764	0,086	1,317	1,403	1,230	1,317
0,1	0,113	1	1,113	0,887	1
0,153	0,173	1,233	1,406	1,060	1,233

Anexo 11. Estadísticos descriptivos e Intervalo de Confianza para las fracciones obtenidas en la cromatografía II por fraccionamiento con Sephadex G-50

DESVIACIÓN ESTANDAR	IC	PROMEDIO	MÁXIMO	MINIMO	PROMEDIO
0,252	0,285	8,233	8,518	7,949	8,233
0,1	0,113	4	4,113	3,887	4
0,1	0,113	8,4	8,513	8,287	8,4
0,265	0,299	6,4	6,699	6,101	6,4
0,265	0,299	9,2	9,499	8,901	9,2
0,265	0,299	8,3	8,599	8,001	8,3
0,289	0,327	10,667	10,993	10,340	10,667
0,451	0,510	9,567	10,077	9,056	9,567
0,265	0,299	7,2	7,499	6,901	7,2
0,346	0,392	5,8	6,192	5,408	5,8