



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION Y PURIFICACION
POR ISOELECTROENFOQUE DE
ENDO-POLIGALACTURONASA INTRA Y
EXTRACELULAR DE *Kluyveromyces marxianus*
CDBB-L-278.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
NIDIA MAYELY ABUD GOMEZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Rosa María Ramírez Gama
Vocal	Prof. Agustín López-Munguía Canales
Secretario	Prof. Alma Elizabeth Cruz Guerrero
1er. Suplente	Prof. Amanda Gálvez Mariscal
2do. Suplente	Prof. Luz del Carmen Castellanos Román

Sitio donde se desarrolló el tema:

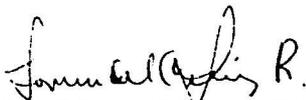
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

Nombre Completo y firma del asesor del tema



M. en B. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Nombre completo y firma del supervisor técnico



M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz

Nombre completo y firma del sustentante



Nidia Mayely Abud Gómez

IF (SI...)

Si tú te puedes conservar sereno
cuando otros a tu lado palidecen,
de su cobarde envidia roto el freno
en vilipendios que ellos se merecen:

si te muestras seguro de tí mismo
cuando todos se empeñan en dudar,
y sabes despreciar su pesimismo
y sus recelos sabes disculpar;

si sabes esperar sin impaciencia;
si, injuriado, no quieres injuriar;
si el odio pagas con benevolencia
sin alarde de tu noble obrar;

si soñar puedes sin que al despertar
sean los sueños dueños de la acción,
guardando el rumbo sin desorientarte
por un exceso de imaginación;

si despreciando sus frivolidades,
gloria o desastre sabes afrontar,
y ves con calma tus sinceridades
con artera intención de interpretar;

si al contemplar la obra de tu vida
alquien, aleve, logra destrozar,
sabes decirle al alma dolorida:
¡Adelante! ¡Volvamos a empezar!

si pudiendo apilar lo que has ganado
lo sabes arriesgar a "cara o cruz"
y pierdes, y al perder nunca han cambiado
de color tu cara ni tus ojos luz;

si contristado, exhausto y dolorido,
le ordenas resistencia al corazón;
y vences cuando estás ya vencido,
rotos los nervios, uerta la razón;

si hablas al vulgo sin encanallarte,
si hablas con reyes sin enloquecer;
si unos ni otros logran alterarte,
sacando tu alma de tu propio ser;

si la hora que fugaz pasa y no espera
con asidua labor sabes colmar,
nadie podrá oponerse a tu carrera
y HOMBRE algún día te podrás llamar.

Rudyard Kipling

A mis padres, Guillermina y Ricardo,
por su gran cariño, confianza y apoyo.

A mis hermanos, Alma y Riqui, por su
amistad y por ser parte de mi vida.

Al amor de mi vida, Edgar, por todo
el estímulo y cariño brindado.

A mis amigas de la universidad, Anabel,
Karina y Ethel, por los momentos que
hemos pasado juntas.

Con profundo agradecimiento a mis
asesores Mariano, Alma y Lorena, por su
gran apoyo, amistad y confianza, y
por ser parte de esta meta.

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	5
3.1. Enzimas	5
3.2. Levaduras	6
3.3. <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i>	8
3.4. Enzimas pécticas.....	13
3.5. Producción y características de la endo-poligalacturonasa de <i>K. marxianus</i>	17
3.6. Modo de acción de la endo-poligalacturonasa de <i>K. marxianus</i>	20
4. Objetivos	23
5. Plan de trabajo	24
6. Metodología	26
6.1. Condiciones de crecimiento y conservación del microorganismo...	26
6.2. Condiciones de producción de endo-poligalacturonasa	26
6.3. Medición de biomasa	27
6.4. Obtención de las enzimas	27
6.5. Concentración de la endo-poligalacturonasa	28
6.6. Determinación de actividad de endo-poligalacturonasa	29
6.7. Determinación de proteína	30
6.8. Purificación parcial de los extractos de endo-poligalacturonas y determinación de su punto isoelectrico	31
6.9. Determinación de actividad de endo-poligalacturonasa en las fracciones obtenidas del Rotofor	34
6.10. Determinación de actividad enzimática en geles de electroforesis.....	34
6.11. Electroforesis.....	38
6.12. Determinación de peso molecular	41
7. Resultados y discusión	43
7.1. Endo-poligalacturonasa intracelular	43
7.2. Endo-poligalacturonasa extracelular	57
8. Conclusiones	69
9. Bibliografía	70
10. Anexos	77

1. Resumen

Los objetivos de este trabajo consistieron en estudiar la síntesis de endopoligalacturonasa intracelular en la cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278, así como en caracterizar este extracto enzimático y también el de la endo-poligalacturonasa extracelular, determinando su punto isoeléctrico y su peso molecular.

Durante el estudio se encontró actividad de endo-poligalacturonasa intracelular en esta cepa de *Kluyveromyces marxianus*, lo cual no había ocurrido anteriormente, ya que se había reportado que la actividad de endo-poligalacturonasa intracelular no era detectable al trabajar con varias cepas de este microorganismo (Espinoza y col., 1992).

Se purificaron parcialmente las endo-poligalacturonas intra y extracelular por el método de isoelectroenfoque, con lo cual también se determinó su punto isoeléctrico. Mediante electroforesis no desnaturizante y actividad enzimática en gel de poliacrilamida, ambas enzimas fueron identificadas y se encontraron 3 isoenzimas para cada una, cuyo valor de punto isoeléctrico fue de 5.0 en ambos casos.

Asimismo, se determinó el peso molecular de cada isoenzima mediante electroforesis con SDS, encontrándose que el peso molecular de las isoenzimas intracelulares es casi del doble que el de las extracelulares, ya que los valores de las primeras se encuentran en el rango de 59, 150 a 80, 612 Da, mientras que los valores de las segundas se encuentran dentro del rango de 31, 805 a 39, 391 Da.

La importancia de este trabajo radica en generar conocimientos sobre las características de ambas endo-poligalacturonas sintetizadas por *Kluyveromyces marxianus*, lo cual a su vez puede generar conocimientos sobre los cambios que sufre la endo-poligalacturonasa al ser transportada al exterior de la célula.

2. Introducción

Desde que se observó que las pectinasas podían ser utilizadas en la elaboración de jugos de frutas, han habido grandes avances tecnológicos en esta industria. Actualmente, las principales aplicaciones son en la clarificación de jugos, tanto de frutas como de vegetales, así como en concentrados de frutas.

Las enzimas pécticas tienen gran importancia en la industria alimentaria, ya que son explotadas con los siguientes propósitos (Gerhartz, 1990):

- 1) Incrementar el rendimiento en la obtención de jugos de frutas, debido a que facilitan el prensado de éstas.
- 2) Maximizar la utilización de materias primas, ya que ocasionan la licuefacción completa de la fruta.
- 3) Mejorar el rendimiento en la obtención de sustancias contenidas en las frutas, como ácidos, colorantes o sustancias aromáticas.
- 4) Clarificar jugos, con el fin de incrementar su vida de anaquel.

Esto no sólo aplica para las frutas con pulpa y frutas con hueso, sino también para las bayas, frutas cítricas y frutas tropicales.

Las preparaciones comerciales de enzimas pécticas son producidas a partir del hongo *Aspergillus niger*. Sin embargo, estas preparaciones contienen, además de las enzimas pécticas, otras enzimas indeseables, como la arabinofuranosidasa, la cual es responsable de la formación de cierta turbidez en los jugos de frutas.

La levadura *Kluyveromyces marxianus* es productora de varias enzimas, entre ellas de la enzima péctica denominada endo-poligalacturonasa, la cual es producida extracelularmente bajo condiciones microaerobias o en presencia de pectina (Espinoza y col, 1992). Se ha considerado que una preparación de dicha enzima producida por *Kluyveromyces marxianus* sería mejor que la de *A. niger*, porque esta levadura es capaz de secretar sólo un pequeño rango de proteínas (Barnby y col.,

INTRODUCCIÓN

1990). Esto tiene la ventaja de reducir el riesgo de encontrar enzimas contaminantes en el extracto de endo-poligalacturonasa.

La enzima producida por esta levadura es capaz de clarificar eficientemente los jugos de manzana (Gómez-Ruiz y col., 1988), pues cataliza la despolimerización de sustancias pécticas (Sakai y col., 1984) atacando los enlaces internos, dando como resultado una rápida disminución de la viscosidad (Suckling, 1990), además de que es efectiva en la maceración de tejidos de papa y zanahoria (Lim y col., 1980). Debido a ésto, se ha pensado que es posible utilizarla en la industria.

Para poder estudiar y caracterizar enzimas, es preciso purificarlas, para lo cual existen varios métodos, entre ellos el de isoelectroenfoque. Este método utiliza las diferencias en el punto isoelectrico de las proteínas para poder separarlas unas de otras (Buddecke, 1983) y se basa en el hecho de que todas las proteínas tienen una carga neta que está determinada por su secuencia de aminoácidos y por el pH del ambiente. Cuando se aplica un campo eléctrico a una proteína que se encuentra en un ambiente con un gradiente de pH establecido, ésta migra hasta que alcanza el pH al cual su carga neta es de cero. Entonces deja de migrar, pues ha alcanzado su punto isoelectrico (Scopes, 1994).

En general, en este trabajo se pretende purificar parcialmente la endo-poligalacturonasa de la cepa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 y caracterizarla, determinando su punto isoelectrico y su peso molecular.

Aunque se ha reportado que la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* es solamente extracelular (Espinoza y col., 1992), en este estudio se pretende saber si es detectable la actividad de la enzima intracelular en la cepa CDBB-L-278.

INTRODUCCIÓN

La importancia de este trabajo radica en generar conocimientos sobre las características de las endo-poligalacturonasas sintetizadas por *K. marxianus*, levadura que ha sido considerada como una posible fuente potencial de enzimas pectinolíticas aplicables en la industria de alimentos. También se pretende generar conocimientos sobre los mecanismos de excreción de estas enzimas a partir de dicho microorganismo.

3. Antecedentes

3.1. Enzimas

Las enzimas poseen una extraordinaria potencia catalítica, que es generalmente mucho mayor que la de los catalizadores sintéticos. Poseen un grado de especificidad elevado respecto de sus sustratos, aceleran reacciones químicas específicas sin formación de subproductos y actúan en soluciones acuosas diluidas en condiciones muy suaves de temperatura y pH (Lehninger, 1995).

Es esta especificidad de las enzimas lo que permite a los expertos en la Ciencia de los Alimentos modificar selectivamente determinados componentes individuales y no afectar a otros (Fennema, 1993).

Aunque la síntesis de toda enzima tiene lugar en el interior de la célula, algunas se excretan a través de la pared celular y pueden funcionar fuera de la misma. Por ello se consideran dos tipos de enzimas: enzimas extracelulares (que funcionan fuera de la célula) y enzimas intracelulares (que funcionan dentro de la célula). La función principal de las enzimas extracelulares es la de efectuar cambios precisos en los nutrientes del ambiente externo, necesarios para que dichos nutrientes puedan ser transportados al interior. Las enzimas intracelulares sintetizan material celular y también degradan nutrientes para aportar los requerimientos energéticos de la célula.

Las características generales de las enzimas son las mismas independientemente de que sean producidas por células microbianas, humanas o de otros seres vivos. Por ejemplo, muchas de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en la levadura son idénticas a las de la célula muscular humana.

Las enzimas son proteínas que pueden o no tener unidos grupos químicos. Como tales, se desnaturalizan por el calor, precipitan en presencia de etanol o de elevadas concentraciones de sales inorgánicas como el sulfato amónico, y no se difunden (no dializan) a través de membranas semipermeables o selectivas (Pelczar y Chan, 1991).

ANTECEDENTES

No obstante, las enzimas son inestables. Su actividad puede reducirse mucho o desaparecer en diferentes condiciones físico-químicas. Con respecto a esto, el comportamiento de las enzimas puede ser muy distinto. Algunas se inactivan por pequeños cambios, como la exposición a la temperatura ambiente durante corto tiempo. Entre los factores que afectan la actividad de las enzimas están los siguientes: concentración de enzima, concentración de sustrato, pH y temperatura (Pelczar y Chan, 1991).

A nivel industrial, la principal fuente de enzimas son los microorganismos (Smith, 1988; Chaplin y Bucke, 1990), debido a que su producción representa ventajas económicas como:

- 1) La síntesis de enzimas es más predecible y controlable.
- 2) Se cuenta con un amplio espectro de características, tales como actividades en diferentes intervalos de pH y resistencia a altas temperaturas.
- 3) Existe suficiente disponibilidad de materias primas con una composición relativamente constante.
- 4) Su producción no está sujeta a variaciones estacionales, ni existe riesgo de escasez por cambios climáticos o situaciones geográficas.
- 5) La manipulación genética ha incrementado considerablemente las posibilidades de optimizar los rendimientos a través de mutaciones, de selección de cepas y de condiciones de crecimiento y más recientemente, mediante la tecnología de DNA recombinante.
- 6) Diseño de enzimas mejoradas por ingeniería de proteínas.
- 7) Estudios sobre evolución dirigida.

3.2. Levaduras

Las levaduras son un grupo de microorganismos que filogenéticamente pertenecen al reino fungi, y se agrupan principalmente en dos clases: Ascomycotina y Basidiomycotina (Kurtzman y Robnett, 1991). Existen aproximadamente 60 géneros y 500 especies (Lachance, 1993); su forma predominante es la unicelular; su reproducción asexual, puede ser por gemación o por fisión (Kurtzman y Robnett, 1991).

ANTECEDENTES

Tienen gran importancia en Biotecnología, debido a los productos industriales que se obtienen a partir de ellas (Pelczar y Chan, 1991). Gracias a que fermentan los azúcares, se pueden aplicar en:

- Producción de alcohol utilizado como materia prima en laboratorios y en la industria química. El alcohol es un producto de gran importancia, ya que es después del agua, el solvente más común.
- Producción de alcohol para gasohol, el cual es utilizado como suplemento de los combustibles convencionales. La escasez de energía ha hecho crecer el interés por el uso de este producto, el cual usualmente es una mezcla de 90% de gasolina sin plomo y un 10% de alcohol. Se está usando en varias regiones de Estados Unidos y se produce en mayor escala en Brasil. El uso extensivo de esta mezcla combustible estará determinado, en su mayor parte, por factores económicos, es decir, los costos inherentes a la producción del alcohol. Es preciso disponer de grandes cantidades de materias primas muy baratas para someterlas a fermentación y deben buscarse métodos más eficientes de recuperación del alcohol para que el gasohol se convierta en un combustible económico.
- Producción de bebidas alcohólicas, tales como la cerveza, el ron, el whisky y el vino. Los productos son diferentes, debido a las diferencias existentes entre los materiales fermentados y entre las cepas de levadura que realizan la fermentación.
- Elaboración de pan. La utilización de la levadura para esponjar la masa en panadería se remonta a los principios de la historia de los egipcios. El dióxido de carbono producido durante la fermentación es el responsable del esponjamiento de la masa. La calidad del producto depende de una adecuada selección de las levaduras, de las condiciones de incubación y de la elección de la materia prima.
- Producción de enzimas. A partir de las levaduras se producen enzimas que son importantes a nivel industrial (amilasas, proteasas, lactasa e invertasa) y otras con un gran potencial en la industria de alimentos (lipasas, pectinasas e inulinasas) (Reed y Nagodawithana, 1991).

3.3. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*

Con base en la clasificación de levaduras, se sabe que el microorganismo *Kluyveromyces marxianus* es una levadura ascosporógena, y que pertenece al grupo de los Eumycota del tipo Hemiascomycetes que se encuentra dentro de la clase Ascomicotina. Es del orden Endomycetales, de la familia Saccharomycetaceae y subfamilia Saccharomycetoideae; del género *Kluyveromyces* y de la especie *marxianus*. Produce de 1 a 4 ascosporas, su forma va de reniforme a media luna, puede fermentar glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, D-xilosa e inulina. No asimila nitrato, crece a 37°C (Kreger-van Rij, 1984); sin embargo, es reconocida como una levadura termotolerante, ya que también tiene la capacidad de crecer a 45°C (Cruz - Guerrero y col., 1998).

A través de los años, *Kluyveromyces marxianus* ha sido reclasificada taxonómicamente. En los 50's del siglo pasado, Lodder y Kreger-van Rij la agruparon en el género *Saccharomyces* llamándola *S. fragilis* y *S. marxianus*, las cuales se caracterizan por producir ascosporas lunadas en contraste con las ascosporas redondas del resto de las especies clasificadas bajo el mismo género. Posteriormente, en 1970 Lodder considera la forma de las ascosporas como fundamental y las reclasifica bajo el género *Kluyveromyces*, llamándolas *K. fragilis* y *K. marxianus* respectivamente. En 1984 Kreger-van Rij decidió fusionarlas en *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* (Reed y Nagodawithana, 1991).

Kluyveromyces marxianus var. *marxianus* es una levadura de grado alimenticio que ha sido utilizada para la producción de proteína unicelular a partir de suero de leche (Mayrath y Bayer, 1979; Reed y Nagodawithana, 1991). La fermentación del suero con esta levadura, permite la conversión de la lactosa presente en biomasa, la cual tiene un alto contenido de proteínas y vitaminas. Esta puede ser utilizada como alimento humano y para ganado, debido a la naturaleza inocua, tanto del microorganismo como del medio (García-Garibay y col., 1987a).

ANTECEDENTES

La proteína unicelular ha sido utilizada como un suplemento proteínico en alimentos horneados, bisquets, bocadillos, sopas y alimentos especiales, tales como los geriátricos y para bebés. Se utiliza además como un extensor en la elaboración de salchichas y otros productos cárnicos, principalmente en el este de Europa (García-Garibay y col., 1993).

Además, esta levadura produce varias enzimas de interés tecnológico, éstas son: lactasa, la cual es producida a nivel industrial (Castillo, 1990), pectinasa (Phaff, 1966; Wimbome y Rickard, 1978; García-Garibay y col., 1987a; García-Garibay y col., 1987b) e inulinasa (Vandamme y Derycke, 1983; Giraud y Galzy, 1990; Espinoza y col., 1992).

Específicamente, la cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 se ha reportado como una buena productora de las tres enzimas mencionadas anteriormente (Espinoza y col., 1992; García - Garibay y col., 1987b).

3.3.1. Producción de lactasa

La lactasa o β -galactosidasa es la enzima que cataliza la hidrólisis de la lactosa, carbohidrato prácticamente único de la leche que se encuentra en una concentración de alrededor de 4.7% en ese alimento. Los productos de la hidrólisis son los monosacáridos D-glucosa y D-galactosa.

Esta enzima se utiliza en la industria láctea con el objeto de producir leche libre de lactosa para personas con intolerancia a este disacárido y con otros objetivos que han adquirido gran importancia para el fabricante de lácteos, y que dan a esta enzima un potencial de utilización todavía mayor (García-Garibay, 1992).

La lactasa se puede aplicar en la obtención de:

- Productos concentrados, como la leche condensada y los helados, donde se logra prevenir la cristalización de la lactosa. Esto se debe a que los productos de la hidrólisis (glucosa y galactosa), presentan mayor solubilidad, lo que evita los problemas asociados a la cristalización.

ANTECEDENTES

- Leche en polvo para dietas especiales particularmente para niños con deficiencia temporal de β -galactosidasa, así como para ancianos y enfermos.
- Productos lácteos fermentados, como el yoghurt o algunos quesos. Esto se debe a que se alcanza más rápidamente el pH deseado y de este modo, se reduce el tiempo de proceso.
- Suero de leche deslactosado. El suero es el sobrenadante que resulta de la coagulación de la caseína durante la elaboración del queso. El suero contiene todos los minerales, proteínas y azúcares solubles de la leche, y el contenido de lactosa es de 4.2 a 4.4%. Debido a su alto valor nutritivo, el suero de leche puede ser utilizado como medio de cultivo para microorganismos incapaces de hidrolizar la lactosa, después de haber sido tratado con β -galactosidasa. El hidrolizado del suero es concentrado hasta obtener jarabes con un 70-75% de sólidos. Estos jarabes son utilizados como ingredientes en la elaboración de helados, productos de panadería, confitería y refrescos (Lee y Lindley, 1982).

La β -galactosidasa es una enzima producida por varios organismos vivos: bacterias, hongos, levaduras, animales y plantas. Sin embargo, las fuentes comerciales de obtención de los productos enzimáticos con fines comerciales (para su utilización en la industria láctea) se limitan a los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, y a las levaduras *Kluyveromyces marxianus* (antes *K. fragilis*), *Kluyveromyces lactis* y *Candida pseudotropicalis*.

Debido a su pH óptimo (3.5 a 4.5) las lactasas de hongos están prácticamente limitadas a utilizarse en suero ácido de leche, o en suero dulce previamente acidificado, mientras que las lactasas de levaduras (pH óptimo 6.4 a 6.8) son las enzimas destinadas a la hidrólisis de lactosa en leche. Adicionalmente, las levaduras mencionadas son microorganismos inocuos, cuya utilización en alimentos, incluso de la biomasa entera, está reglamentado y permitido por las legislaciones de la mayoría de los países desarrollados; particularmente *K. marxianus* (antes *K. fragilis*) tiene la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe) por la Food and Drug Administration de los EUA (García-Garibay, 1992).

Puesto que la lactasa producida por las levaduras es intracelular (Espinoza y col., 1992), tiene que ser extraída y para ello existen diferentes métodos reportados por varios autores (Mahoney y col., 1975; Sánchez-Font y col., 1980; García-Garibay, 1992). La extracción de enzimas tiene algunos inconvenientes, tales como: utilización de procesos muy costosos y de que los extractos que se obtienen pueden contener enzimas activas contaminantes, por ejemplo proteasas que alteren el producto final.

3.3.2. Producción de inulinasa

La inulinasa es la enzima que cataliza la hidrólisis de la inulina, el cual es un polímero de fructosa encontrado como un hidrato de carbono de reserva en raíces y tubérculos, y es muy abundante en la alcachofa de Jerusalén y algunos agaves (Moussa y Baratti, 1987). De hecho, es en éstos el polisacárido más abundante (Blanco, 1979).

Una de las aplicaciones de las inulinasas con más interés en la industria, es la producción de jarabes fructosados, utilizando agaves como fuente de inulina. Gracias a su abundancia en nuestro país, estos agaves representan una excelente fuente del carbohidrato.

Los jarabes fructosados ya desde hace varios años tienen una gran importancia en el mercado de los edulcorantes, sustituyendo a la sacarosa (Vandame y Dericke, 1983).

Grootwasink y Fleming (1980) reportan que es más favorable la hidrólisis enzimática de la inulina que la hidrólisis química. La hidrólisis enzimática a 50°C no causa ninguna coloración indeseable, la cual sí aparece en el hidrolizado ácido de inulina. Cambios en el aroma y sabor son mínimos en la hidrólisis enzimática. Otra de las desventajas de la hidrólisis ácida es la formación de difructosa anhidra, compuesto que no posee ninguna propiedad edulcorante, por lo que tiene que ser removida del jarabe de fructosa.

Las enzimas que degradan la inulina son encontradas en plantas y microorganismos, incluyendo hongos, levaduras y bacterias. La levadura *Kluyveromyces marxianus* ha sido ampliamente estudiada para la producción de inulinasa (Grootwassink y Fleming, 1980; Grootwassink y Hewitt, 1983; Negoro, 1978; Snyder y Phaff, 1960), y se ha reportado que es capaz de producirla intra y extracelularmente.

En el estudio realizado por Cruz-Guerrero y col. (1995), se demostró que *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 es una levadura hiperproductora de inulinasa, enzima que es producida de manera parcialmente constitutiva.

3.3.3. Producción de pectinasa

Las enzimas pécticas o pectinasas son términos genéricos utilizados para aquéllas enzimas que modifican de alguna manera la estructura de las sustancias pécticas presentes en los tejidos vegetales (Gómez-Ruiz y col., 1988).

Las pectinasas tienen un papel muy importante en la industria de alimentos, pudiendo ser utilizadas en un gran número de procesos como son:

- 1) Agente clarificante en la producción de jugos de frutas (como jugo de manzana, pera y uva) y vegetales (Lim y col., 1980; Sakai y col., 1984), así como de vinos, sidras y vinagres. En los jugos, las sustancias pécticas se encuentran en estado coloidal y mantienen suspendidos otros compuestos, lo cual resulta en un alto grado de turbidez. Por tanto, cuando las pectinasas se agregan, actúan despolimerizando la pectina, con lo cual se destruye el coloide y todo el material en suspensión se precipita, retirándose luego por filtración (Yamasaki y col., 1967).
- 2) Como agente de maceración y licuefacción de tejidos para preparar concentrados y purés de frutas, y para la extracción de aceites esenciales (Lim y col., 1980; Sakai y col., 1984; Kobayashi y Matsuo, 1979).

- 3) Combinaciones de pectinasas y celulasas son utilizadas en la producción del mosto de uva en la elaboración de vino y en la extracción de almidón de papa y maíz (Fons y Rob, 1980).
- 4) Las enzimas pectinolíticas también se utilizan para favorecer la fermentación de cocoa, debido a que éstas degradan las paredes celulares de la pulpa, permitiendo que los azúcares sean liberados (Rosane y Rose, 1994).

3.4. Enzimas pécticas

Como se mencionó antes, las pectinasas son las enzimas capaces de degradar las sustancias pécticas presentes en los tejidos vegetales. El término sustancias pécticas, se usa generalmente para referirse a un grupo de polisacáridos vegetales, cuya unidad básica es el ácido D-galacturónico, el cual mantiene unidas las células vegetales (McMillan y col., 1992).

La estructura básica de estos compuestos está formada por moléculas de ácido D-galacturónico unidas por enlaces glucosídicos α -D(1-4), en donde algunos de los carboxilos pueden estar esterificados con grupos metilos. Cuando el ácido galacturónico se encuentra esterificado por grupos metilos, el polímero se denomina pectina. mientras que si se encuentra libre de grupos metilo, el polímero se conoce como ácido péctico o ácido poligalacturónico.

Los polímeros altamente esterificados (pectinas muy metoxiladas) son los mejores sustratos para las pectinliasas (pectintranselimininasas). Las pectinliasas rompen los enlaces glucosídicos adyacentes a un éster metílico por una reacción de β -eliminación, dando un doble enlace por cada enlace glucosídico roto. Son producidas en general por hongos y no se encuentran en bacterias o en vegetales superiores.

Las pectinas en las que los grupos metoxilo han sido utilizados parcialmente (pectinas poco metoxiladas) o completamente (ácido poligalacturónico) son los mejores sustratos para las pectato liasas. En este caso, la reacción de β -eliminación tiene lugar en una posición adyacente a un grupo carboxilo libre. Las pectato liasas son enzimas

ANTECEDENTES

típicamente bacterianas. Sólo unos pocos mohos las producen y no existen en los vegetales superiores.

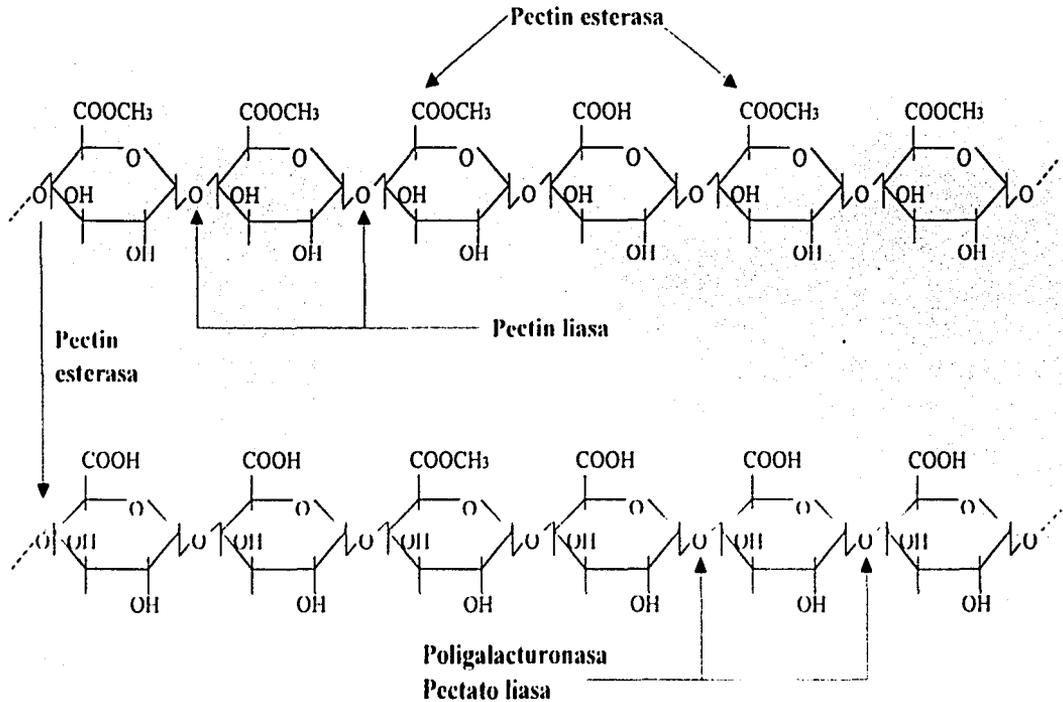
Las pectinesterasas retiran el metanol de los grupos carboxilo esterificados, dando lugar a pectinas poco metoxiladas y ácido poligalacturónico.

Las poligalacturonasas hidrolizan los enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$ entre dos residuos no metilados de ácido galacturónico. Estas enzimas actúan en ácido poligalacturónico y en pectinas cuyo grado de metilación está por debajo de 55-60% (Gainvors y col., 1994; Gómez-Ruiz y col, 1988). Junto con la endopoligalacturonasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos internos, la exopoligalacturonasa, que hidroliza los externos y las pectato liasas, la pectinesterasa completa una mezcla de enzimas capaz de despolimerizar las pectinas altamente esterificadas (Fennema, 1993).

En la figura 3.4.1. se ilustra la acción de las enzimas antes mencionadas.

Figura 3.4.1.

Degradación enzimática de la pectina por la poligalacturonasa, pectato liasa, pectin liasa y pectinesterasa

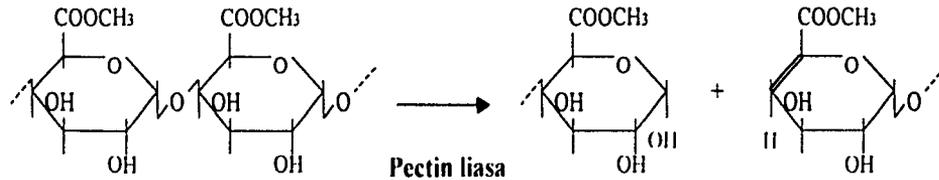
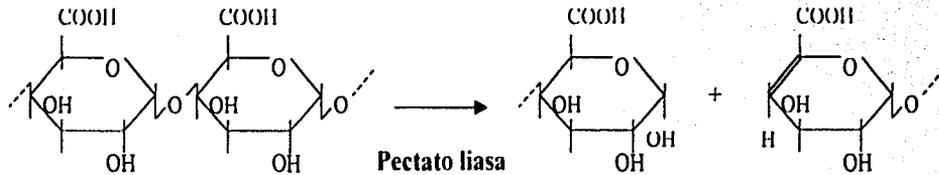
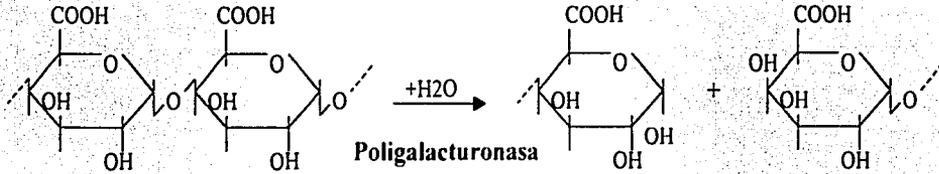


Continúa en la siguiente página...

ANTECEDENTES

Figura 3.4.1.

(Continuación)



61

3.5. Producción y características de la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus es una de las pocas levaduras reportadas como capaces de degradar la pectina. De todas las especies de levaduras conocidas que poseen actividad pectinolítica, *K. marxianus* es generalmente reconocida como la más efectiva. La enzima producida por esta levadura ha sido ampliamente estudiada (García-Garibay y col., 1987a). Se ha reportado que la única enzima péctica que produce *Kluyveromyces marxianus* es la endo-poligalacturonasa (Luh y Phaff, 1951; Barnby y col., 1990).

Espinoza y col. (1992), trabajaron con cinco cepas de *Kluyveromyces marxianus* (incluyendo la cepa CDBB-L-278) y en ningún caso detectaron actividad de pectinasa intracelular. Supusieron que el mecanismo de excreción podría ser diferente del de la inulinasa, la cual es excretada como un dímero, mientras que la enzima periplásmica es encontrada como una proteína tetramérica (Rouwenhorst y col., 1990).

Se ha reportado que la pectinasa de *K. marxianus* es una enzima parcialmente constitutiva (Cruz-Guerrero y col., 1998), que contiene oligosacáridos (Barnby y col., 1990). Su temperatura óptima de acción es de 30°C y se considera una enzima termoestable, ya que a 50°C todavía actúa eficientemente; sin embargo, se inactiva a 75°C (Lim y col., 1980). Su pH óptimo es de 5 y la temperatura óptima de la levadura para la secreción de la enzima es de 35-43°C (Rosane y Rose, 1994). Se ha visto que la producción de la enzima está asociada con el crecimiento de la levadura (García-Garibay y col., 1987a).

Cruz-Guerrero y col. (1998) realizaron un estudio en el cual determinaron que en condiciones anaeróbicas, la producción de la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* es constitutiva, mientras que en condiciones aeróbicas es inducida por la presencia de pectina. También observaron que la temperatura no afecta directamente la producción enzimática, sino que tiene un efecto indirecto debido a que ocasiona cambios en la solubilidad del oxígeno. García-Garibay y col. (1987b) determinaron que la represión de la producción enzimática

ANTECEDENTES

por la concentración de oxígeno es independiente de la naturaleza de la fuente de carbono que se encuentre en el medio.

Rosane y Rose (1994) realizaron estudios sobre el efecto de las condiciones nutricionales del medio de fermentación sobre la secreción de endo-poligalacturonasa. Dichos autores trabajaron con una cepa de *Kluyveromyces marxianus* aislada de una fermentación de cocoa y reportaron que el reemplazar la glucosa del medio por sacarosa, no tuvo ningún efecto sobre la producción de la endo-poligalacturonasa, mientras que en un medio con fructosa se retardó la secreción de la enzima y en un medio con galactosa la secreción de la enzima disminuyó. También observaron que en un medio con xilosa, la secreción de la endo-poligalacturonasa fue considerablemente retardada, lo cual también sucedió al trabajar con altas concentraciones de glucosa.

Las preparaciones comerciales de enzimas pécticas son producidas a partir de *Aspergillus niger*, pero éstas contienen otras enzimas que pueden resultar indeseables. Tal es el caso de la arabinofuranosidasa, la cual ocasiona la formación de turbidez en jugos de frutas. Por lo tanto, una preparación derivada de *Kluyveromyces marxianus* sería mejor en cuanto a que esta levadura secreta sólo un pequeño rango de proteínas (Barnby y col., 1990). Esto tendría como ventaja el reducir el riesgo de encontrar enzimas contaminantes.

La endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* se ha utilizado a nivel laboratorio como agente macerativo y como coadyuvante durante la producción de jugos de frutas y vegetales (Kobayashi y Matsuo, 1979; Lim y col., 1980; Ozawa y col., 1961; Voragen y col., 1980). Luh y Phaff (1951) reportaron que una solución de pectina al 2% puede ser clarificada usando la enzima.

Se han realizado estudios en los cuales se ha encontrado factible la posibilidad de producir de manera simultánea, proteína unicelular y endo-poligalacturonasa a partir de *Kluyveromyces marxianus*, lo cual incrementa significativamente el atractivo del proceso de producción de proteína unicelular (García-Garibay y col., 1987a).

A la fecha, existen muchos trabajos en los que se reporta que la enzima presenta diferentes formas, diferenciadas por su peso molecular y punto isoeléctrico, aunque estas dependen de la cepa de *Kluyveromyces marxianus* utilizada:

- Lim y col. (1980) reportaron 3 isoenzimas, cuyas características son las siguientes:

Tabla 3.5.1.
Propiedades de endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus*

Enzima	pl	PM (Da)
I	6.1	46, 000
II	6.1	50, 000
III	5.8	30, 000

- Cal y Emeis (1983) establecieron la existencia de 21 isoenzimas. Encontraron una banda principal, la cual tuvo un punto isoeléctrico de 5.8 y un peso molecular de 76, 000 Da (lo cual corresponde a dos isoenzimas de 47, 900 y 28, 100 Da). Hallaron también una banda ácida, la cual tuvo un punto isoeléctrico de 2.7 y un peso molecular de 32, 200 Da.
- Sakai y col. (1984) reportan que *Kluyveromyces marxianus* es capaz de producir al menos 4 endo-poligalacturonasas de diferentes pesos moleculares; la predominante de ellas tuvo un punto isoeléctrico de alrededor de 5.6 y un peso molecular de aproximadamente 33, 000 Da.
- Smith y Pyle (1990) hallaron 9 endo-poligalacturonasas producidas por *Kluyveromyces marxianus*. Ellos reportan que el punto isoeléctrico de estas enzimas se encuentra en el intervalo de 5.6 - 6.5, y que tienen un peso molecular de alrededor de 43, 000 Da.

- Barnby y col. (1990), aislaron 4 isoenzimas y encontraron que la diferencia entre ellas es la variación en el grado de glicosilación. Las características de estas isoenzimas son:

Tabla 3.5.2.
Propiedades de endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus*

Enzima	pl	PM (Da)
I	6.3	49, 600
II	6.0	49, 600
III	6.3	46, 700
IV	5.7	49, 600

- Harsa y col. (1993), reportan que la endo-poligalacturonasa de *K. marxianus* tiene un punto isoeléctrico entre 5.9 - 6.3 y un peso molecular de alrededor de 45, 000 Da.

3.6. Modo de acción de la endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus*

Se han descrito dos mecanismos diferentes de ataque de las endo-poligalacturonasas (Pasculli y col., 1991):

- 1) Un ataque donde ocurre primero la hidrólisis de los fragmentos más largos, y los mono-, di- y tri- galacturonatos aparecen en las etapas de degradación posteriores.
- 2) Un ataque múltiple de cadenas sencillas, el cual resulta en una rápida liberación de oligogalacturonatos en la etapa inicial del proceso de degradación

Los estudios revelan que las diferencias en el modo de acción de las poligalacturonasas, están determinadas por la naturaleza y por el

tamaño de su sitio activo, así como por la ubicación de los grupos catalíticos.

La endo-poligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* muestra el primer modo de acción, ya que la velocidad de hidrólisis de oligogalacturonatos decrece conforme disminuye la longitud de la cadena de oligómeros, lo cual indica que la enzima tiene preferencia por las cadenas largas.

Según Demain y Phaff (1954) y Phaff y Demain (1956), el curso de la reacción consiste en:

- a) Un ataque inicial rápido en la cadena lineal mediante un mecanismo al azar, hasta que ocurre una hidrólisis de alrededor del 25%.

Ácido péctico \longrightarrow ácidos tetra + tri + di + galacturónico

- b) Una fase más lenta, durante la cual se rompe otro 25% de los enlaces disponibles.

Ácido tetragalacturónico \longrightarrow ácido tri + galacturónico

- c) Una etapa extremadamente lenta, la cual cesa en un valor del 70% de hidrólisis.

Ácido trigalacturónico \longrightarrow ácido di + galacturónico

La endo-poligalacturonasa de *K. marxianus* cataliza la hidrólisis del ácido péctico a una mezcla de ácidos digalacturónico y galacturónico. El ácido digalacturónico no es atacado por la enzima, porque no tiene afinidad hacia ella. Esto fue observado por Demain y Phaff (1954), quienes vieron que el dímero no inhibe significativamente la hidrólisis de los oligómeros mayores. La endo-poligalacturonasa de *K. marxianus* difiere en este aspecto de las preparaciones comerciales de

poligalacturonasa fúngica, ya que éstas sí llevan a cabo una hidrólisis completa del ácido péctico hasta ácido galacturónico.

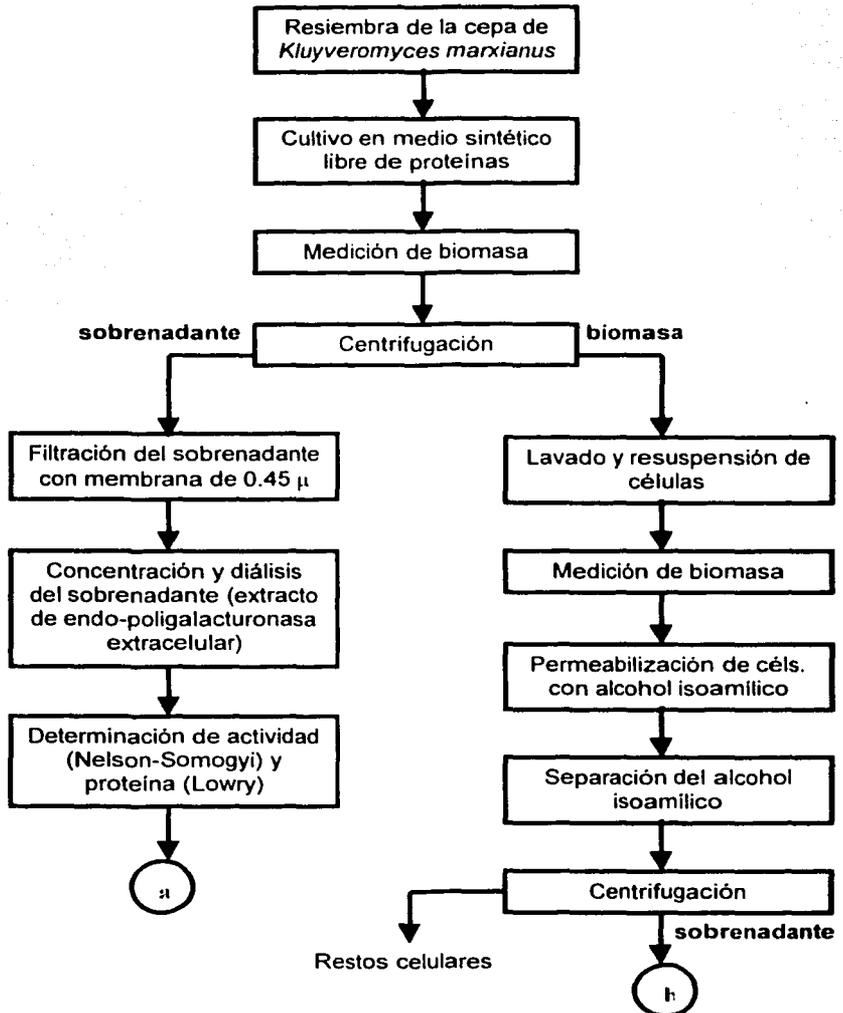
Pasculli y col. (1991) realizaron estudios, en donde se dieron cuenta de que el grado de hidrólisis por parte de la endo-poligalacturonasa disminuye rápidamente, conforme se incrementa el grado de metilación y acetilación del sustrato. Por ello, la enzima hidroliza la pectina en forma limitada (García-Garibay y col., 1987a; Luh y Phaff, 1954).

Experimentos realizados por Luh y Phaff (1954) sobre la acción de la endo-poligalacturonasa de *K. marxianus* en ácidos pectínicos de diferentes contenidos de metoxilos, indican que esta enzima requiere la presencia de al menos dos grupos carboxílicos vecinos libres, para que sea posible la hidrólisis del enlace correspondiente.

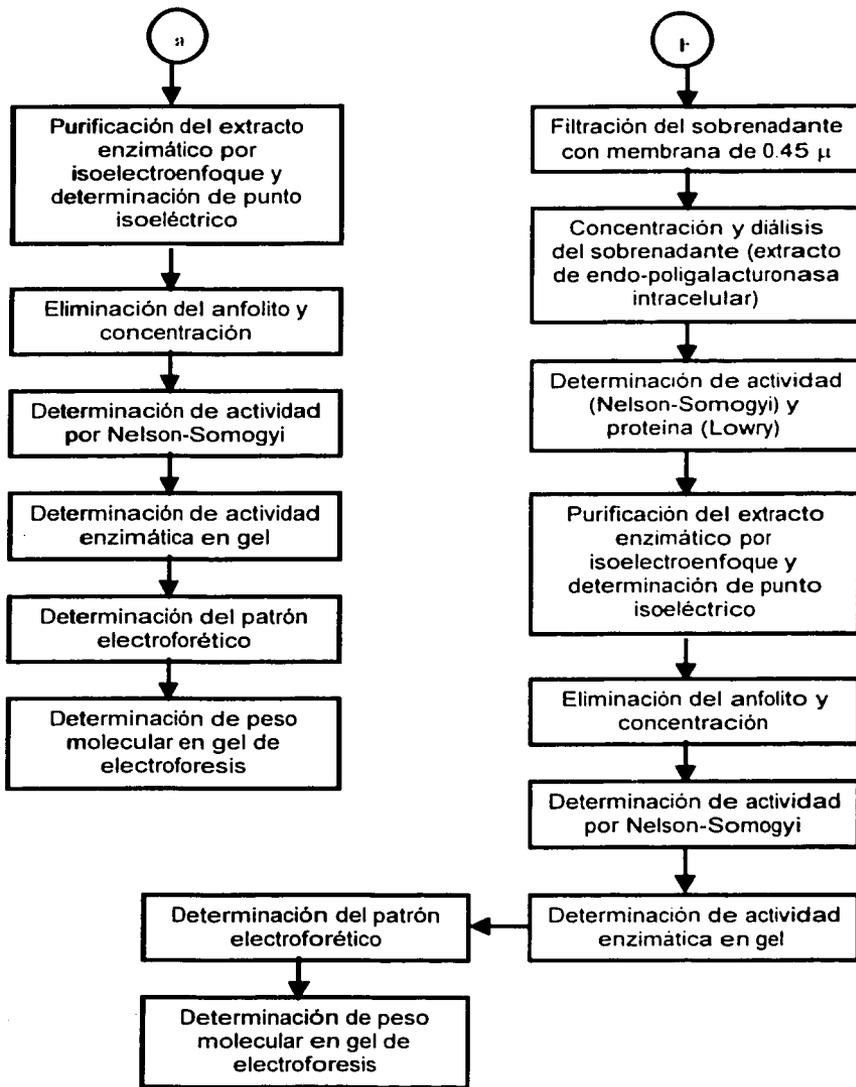
4. Objetivos

- Estudiar la síntesis de endo-poligalacturonasa intracelular en la cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278.
- Purificar parcialmente los extractos de endo-poligalacturonasas intracelular y extracelular de la cepa de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278, mediante el método de isoelectroenfoque.
- Caracterizar ambos extractos enzimáticos, determinando su punto isoelectrónico y su peso molecular.

5. Plan de trabajo



PLAN DE TRABAJO



6. Metodología

6.1. Condiciones de crecimiento y conservación del microorganismo

Para este estudio se utilizó *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278, que es una cepa que proviene del Departamento de Bioingeniería y Biotecnología del Centro de Investigaciones de Estudios avanzados, del Instituto Politécnico Nacional, México.

El microorganismo se mantuvo en tubos de agar papa dextrosa (Bioxon) a 4°C y se resembró cada 2 meses.

6.2. Condiciones de producción de endo-poligalacturonasa

6.2.1. Medio de cultivo

Composición del medio de cultivo que se empleó para producir la endo-poligalacturonasa:

0.2% de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) (Baker)
0.05% de sulfato de magnesio (MgSO₄) (Técnica Química S. A.)
0.05% de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) (Baker)
0.67% de base libre de nitrógeno para levaduras (YNB) (Difco)
1% de glucosa (Baker)
Agua destilada

Una vez mezclados todos los componentes del medio, se ajustó el pH a 5.0 con la adición de NaOH (Baker) o ácido acético diluido (Baker).

6.2.2. Condiciones de cultivo

Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con un volumen de trabajo de 50 mL, tapados con algodón. Se

incubaron a 30°C, con una agitación de 200 r.p.m. en una incubadora ambiental New Brunswick modelo G 24, por 24 horas.

6.3. Medición de biomasa

La biomasa se determinó midiendo la turbiedad de la suspensión celular a una longitud de onda de 650 nm y dicha lectura se correlacionó con una curva patrón de absorbancia vs. peso seco de levadura. Al término de la medición de biomasa, el cultivo fue centrifugado a 3,500 r.p.m., durante 30 minutos a 4°C, en una centrifuga refrigerada Beckman J2-1; ésto se hizo con el fin de separar la biomasa del sobrenadante. Posteriormente el paquete celular fue suspendido en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.6 y también se le determinó biomasa.

6.4. Obtención de las enzimas

6.4.1. Obtención del extracto de endo-poligalacturonasa extracelular

El sobrenadante obtenido de la centrifugación fue pasado a través de un sistema de filtración Millipore, utilizando para ello una membrana de 0.45 μ de diámetro de poro, con el objeto de eliminar cualquier residuo de células y cualquier basura o pelusa que pudiera estar presente en el mismo. El filtrado obtenido se utilizó como extracto crudo de la endo-poligalacturonasa extracelular.

6.4.2. Obtención del extracto de endopoligalacturonasa intracelular

Las células obtenidas de la centrifugación se lavaron tres veces de la manera siguiente: se resuspendieron en 300 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.6 (ver preparación en Anexo I) y se centrifugó en las condiciones que se mencionan en la sección 6.4.1, desechando después el sobrenadante.

Después de los tres lavados, las células volvieron a ser resuspendidas en 80 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.6, y se procedió a la medición de biomasa (ver sección 6.3.). Posteriormente se realizó la permeabilización de células. Para ello se tomó una alícuota de 10 mL de la suspensión de células y se colocó en un matraz aforado de 25 mL, al cual se le adicionaron 5 mL de alcohol isoamílico (Baker) y se aforó con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.6. Esta mezcla fue incubada por 1 hora a 28°C y 200 r.p.m. en una incubadora con agitación Lab-line Environ Shaker. El resto de la suspensión de células recibió el mismo tratamiento de permeabilización.

Posteriormente, se separó el alcohol isoamílico mediante embudos de separación, donde la fase superior (alcohólica) fue desechada y la inferior (acuosa) fue sometida a centrifugación (en las condiciones descritas anteriormente), con el fin de eliminar los restos celulares. Luego se llevó a cabo una evaporación del alcohol remanente en el líquido, utilizando para ello un rotavapor Ika-Heizbad HB-250. Esto se realizó con un baño de agua a 30°C y la operación duró aproximadamente 2 horas. El líquido que quedó después de la evaporación del alcohol, fue filtrado en un sistema de filtración Millipore, a través de membranas de 0.45 μ de diámetro de poro. El filtrado obtenido se utilizó como extracto crudo de la endo-poligalacturonasa intracelular.

6.5. Concentración de la endo-poligalacturonasa

Ambos extractos enzimáticos se concentraron mediante liofilización a - 50 °C y a un vacío de 133×10^{-1} mbar en una liofilizadora Labconco Freeze Dry System/Freezone 4.5, y luego fueron dializados durante 26 horas a 4°C, con el fin de eliminar el exceso de sales o azúcares que pudieran interferir en los análisis posteriores.

Ambos extractos se liofilizaron y dializaron 2 veces, obteniendo al final un volumen de 50 mL del extracto extracelular y 40 mL del extracto intracelular. Una vez que se determinó actividad enzimática por Nelson-Somogyi (ver sección 6.6.) y proteína (ver sección 6.7.), ambos

extractos fueron concentrados nuevamente y el polvo obtenido se resuspendió en 3 mL de agua desionizada. Estas suspensiones permanecieron en refrigeración hasta su análisis, y son los concentrados con los cuales se llevó a cabo todo el experimento.

6.6. Determinación de actividad de endo-poligalacturonasa

La determinación de la actividad enzimática, tanto para la enzima intracelular como para la extracelular, se llevó a cabo midiendo el aumento de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi (1944), debido a la acción de la endo-poligalacturonasa en una disolución de ácido poligalacturónico. La preparación de los reactivos utilizados en esta técnica se describe en el Anexo II.

La determinación se llevó a cabo de la siguiente manera: a un tubo de ensaye con 9 mL de solución de ácido poligalacturónico (Sigma) al 0.1% (preparado en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0) se le adicionó la solución de la enzima, cuyo volumen podía variar entre 0.1 y 1.0 mL y se completó el volumen del tubo a 10 mL con solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0 (ver preparación de la solución amortiguadora en el Anexo I).

Este tubo se mantuvo en un baño de agua de temperatura controlada (Haake C-10) a 30°C. Se tomaron alícuotas de 1.0 mL a los minutos 1, 5, 10 y 15, a partir del momento en que la enzima entró en contacto con el ácido poligalacturónico. Inmediatamente después, cada alícuota se mezcló con 1 mL del reactivo I de Nelson Somogyi, con lo cual se detuvo la reacción y se procedió según la técnica de Nelson-Somogyi. Para determinar la actividad en las fracciones obtenidas después del corrimiento en el Rotofor, las alícuotas se tomaron a los tiempos 15, 30, 45 y 60 minutos (para el extracto extracelular) y 30, 60, 90 y 120 minutos (para el extracto intracelular).

Cada determinación se hizo por duplicado y además se elaboró un blanco, adicionando 1mL de solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5.0 a un tubo que contenía 9.0 mL de solución de ácido

poligalacturónico 0.1%. Después se procedió de la misma manera que para las muestras.

6.6.1. Técnica para la determinación de azúcares reductores (Nelson-Somogyi, 1944)

En un tubo de ensaye se colocó 1mL de la muestra más 1 mL del reactivo I. Se incubó durante 20 minutos en un baño de agua en ebullición. Transcurrido este tiempo, el tubo se enfrió y se agregó 1 mL del reactivo II, se agitó vigorosamente, se agregaron 17 mL de agua destilada, se agitó y leyó en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a 520 nm.

6.6.2. Curva patrón para la determinación de azúcares reductores

Se elaboró una curva patrón con solución de ácido galacturónico (Sigma), cuyo rango de concentración fue de 0-500 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente se determinaron las unidades de actividad de endopoligalacturonasa (Upg), consideradas como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcar reductor por minuto a 30°C y a pH 5.0.

6.7. Determinación de proteína

Para la determinación de proteína de ambos extractos enzimáticos, se utilizó el método de Lowry (1951), el cual se basa en la formación del complejo cobre-proteína en condiciones alcalinas, seguida de una reacción de óxido-reducción con el reactivo de Folin (Hycel). La preparación de los reactivos utilizados se describe en el Anexo II.

La técnica se llevó a cabo como sigue:

- a) Se mezclaron 50 mL del reactivo A más 1mL del reactivo B y 1mL del reactivo C.

- b) Se tomaron 5 mL de la mezcla anterior y se adicionó 1 mL de la muestra problema
- c) Se dejó reposar 10 minutos en la oscuridad
- d) Se agregaron 0.5 mL del reactivo D
- e) Se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad
- f) Las muestras se leyeron en espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a una longitud de onda de 590 nm, contra un blanco de reactivos y agua.

6.7.1. Curva patrón para la determinación de proteína

Para la determinación de proteína, se elaboró una curva patrón con una solución de seroalbúmina bovina en agua, cuyo rango de concentración fue de 0-500 $\mu\text{g/mL}$.

6.8. Purificación parcial de los extractos de endo - poligalacturonasas y determinación de su punto isoelectrónico

La purificación parcial y la determinación del punto isoelectrónico de ambos extractos de endo-poligalacturonasas, se llevó a cabo mediante el método de isoelectroenfoque, para lo cual se utilizó el sistema Rotofor (BIO-RAD).

La separación de proteínas por isoelectroenfoque está basada en el hecho de que todas estas moléculas tienen una carga neta que depende del pH. La carga neta está determinada por la secuencia de aminoácidos de la proteína y por el pH del ambiente.

Lo que se utiliza en este sistema para establecer el gradiente de pH son unas sustancias llamadas anfólitos, que contienen pequeñas moléculas cargadas, que hacen que el pH se vaya incrementando del ánodo al cátodo. Cuando se aplica corriente al sistema, las proteínas migran, hasta que alcanzan el pH donde su carga neta es de cero. Al llegar a este punto ya no migran, sino que se concentran, pues han alcanzado su punto isoelectrónico (Buddecke, 1983).

El sistema Rotofor consta de dos cámaras: cámara del ánodo, en cuyo interior se colocó una solución de ácido fosfórico (H₃PO₄) (Baker) 0.1 N y la cámara del cátodo, que llevó dentro una solución de hidróxido de sodio (NaOH) (Baker) 0.1M.

Al terminar de ensamblar todo el equipo, se introdujo la muestra en la celda.

6.8.1. Preparación de las muestras para corrida en Rotofor

La preparación de las muestras que se introdujeron en la celda del Rotofor, se realizó como se indica en la siguiente tabla, para cada caso respectivamente:

Tabla 6.8.1.1.
Preparación de las muestras para el Rotofor

Componente	Endo- poligalacturonasa extracelular (mL)	Endo- poligalacturonasa intracelular (mL)
Anfolito	2.75	1.8
Extracto enzimático	2	3
Agua desionizada	50.25	50.2

6.8.2. Condiciones de corrida

Para el extracto intracelular se realizaron dos corridas en el Rotofor, una con anfolito de rango de pH de 3.8 – 9.5 y otra con anfolito de un rango de pH más estrecho (pH 4.9 – 7.9). Para el extracto extracelular, se realizó una corrida con el anfolito de pH 4.9 – 7.9.

Todas las corridas se realizaron en las condiciones que se describen a continuación: una vez colocada la muestra en la celda del Rotofor, se

eliminaron las burbujas de aire formadas en su interior. con el fin de evitar que éstas ocasionaran fluctuaciones en el voltaje debido a la discontinuidad que crean en el campo eléctrico.

Luego se encendió la fuente de poder (BIO-RAD Power Pac 3000), la cual fue programada para mantener un poder constante de 15 W. Durante toda la corrida, la temperatura del sistema fue mantenida en 4°C, con el fin de no desnaturalizar las enzimas durante el proceso. Para ello, se utilizó un baño recirculador de agua VWR Modelo 1160-A, en cuyo interior circulaba una solución de glicerol al 30% a esa temperatura.

Cada corrida duró aproximadamente 4 horas y, transcurrido este tiempo, se alcanzó un voltaje cercano a 700 V.

6.8.3. Medición de pH

Una vez llevada a cabo la corrida en el Rotofor, se colectaron las 20 fracciones en pequeños tubos de 5 mL. Posteriormente se midió el pH de cada una, con el fin de determinar el gradiente de pH formado durante la corrida.

6.8.4. Eliminación del anfolito y concentración de las fracciones del Rotofor

Debido a que la presencia del anfolito interfiere con la determinación de actividad enzimática, fue necesario eliminarlo. Para ello, las fracciones obtenidas en la corrida del Rotofor se dializaron y liofilizaron tal como se indica en la sección 6.5. Una vez concentradas las fracciones, cada una fue resuspendida en 200 μ L de agua desionizada y se conservaron en refrigeración hasta su análisis.

6.9. Determinación de actividad de endo-poligalacturonasa en las fracciones obtenidas en el Rotofor

La determinación de la actividad enzimática, tanto para las fracciones del extracto intracelular como para las del extracelular, se llevó a cabo midiendo el aumento de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi (1944) (como se describe en la sección 6.6.).

6.10. Determinación de actividad enzimática en geles de electroforesis

Para la determinación de actividad de endo-poligalacturonasa en las fracciones obtenidas en el Rotofor, se utilizó la técnica de Ried y Collmer (1985 y 1986) con algunas modificaciones.

6.10.1. Preparación de los geles de electroforesis

Para la elaboración de los geles, se montaron previamente las placas, las cuales constan de dos hojas de vidrio, cuyas dimensiones fueron de 72 x 101 mm, utilizando separadores de 0.75 mm y placa dentada del mismo espesor para formar los carriles.

Un gel de electroforesis consta de dos partes: el gel de concentración y el gel de separación.

El gel de concentración va en la parte superior de las placas de vidrio y sirve para concentrar la muestra colocada en cada carril y permitir así que todas las muestras corran al mismo tiempo. El gel de separación, que va abajo del gel de concentración, permite la separación de las proteínas presentes.

La preparación de los reactivos empleados en la electroforesis se describe en el Anexo III.

6.10.1.1. Gel de separación

Se prepararon 8 mL del gel de separación, cantidad suficiente para elaborar dos geles de electroforesis. Se utilizó una T=7.5%, tal como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 6.10.1.1.1.
Preparación del gel de separación con T=7.5%

Componente	Cantidad
Agua desionizada	3.88 mL
Solución amortiguadora de Tris-HCl, pH 8.8	2.080 mL
Solución de acrilamida/bis	2 mL
Persulfato de amonio 10%	40 µL
N, N, N', N'- Tetrametilendiamina (TEMED)	4 µL
Acido poligalacturónico	8 mg

En un matraz kitazato pequeño se adicionó la solución amortiguadora pH 8.8, el agua desionizada, la solución de acrilamida/bis y el ácido poligalacturónico, el cual es el sustrato de la endo-poligalacturonasa. La mezcla se degasificó durante 15 minutos, manteniéndola en agitación con una barra magnética y utilizando una bomba de vacío Koblenz, modelo 1500. Transcurrido este tiempo, se adicionó el persulfato de amonio al 10% e inmediatamente después el TEMED. Se mezcló todo cuidadosamente y la mezcla se colocó entre las placas de vidrio previamente montadas, cuidando de no provocar la formación de burbujas. Después de 5 minutos de adicionar la mezcla, se pusieron unas gotas de agua desionizada en la superficie para evitar resequead en el gel, la cual podría haber ocasionado una deformidad en el mismo. Este gel se dejó reposar aproximadamente 45 minutos para permitir la gelificación.

6.10.1.2. Gel de concentración

Se prepararon aproximadamente 4mL del gel de concentración, tal como lo describe la siguiente tabla (esta cantidad fue suficiente para preparar 2 geles de electroforesis).

Tabla 6.10.1.2.1.
Preparación del gel de concentración con T=4%

Componente	Cantidad
Agua desionizada	2.44mL
Solución amortiguadora de Tris-HCl, pH 6.8	1.040 mL
Acrilamida/bis	0.532 mL
Persulfato de amonio 10%	20 μ L
N, N, N', N'- Tetrametilendiamina (TEMED)	4 μ L

El agua desionizada, la solución amortiguadora y la solución de acrilamida/bis se colocaron en un matraz kitazato y la mezcla se degasificó por 15 minutos en la forma antes indicada.

Transcurrido el tiempo, se adicionó al matraz el persulfato de amonio al 10% e inmediatamente después el TEMED. La mezcla se agitó cuidadosamente y se colocó sobre el gel de separación, habiendo eliminado previamente el agua adicionada sobre el mismo. Inmediatamente después se colocó la placa dentada para formar los carriles. Este gel se dejó reposar por una hora, para asegurar la gelificación, colocando de vez en cuando gotas de agua desionizada sobre su superficie para evitar resequedad.

6.10.2. Preparación de las muestras

Para preparar las muestras a inyectar en los geles, se elaboró el colorante para la muestra, tal como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 6.10.2.1.
Colorante de la muestra

Componente	Cantidad
Agua desionizada	0.475 mL
Solución amortiguadora de Tris-HCl, pH 6.8	0.375 mL
Glicerol	0.1 mL
Azul de bromofenol 1% (w/v)	0.05 mL

Para la preparación de cada muestra, se colocaron 10 μ L de colorante y 15 μ L de la fracción del Rotofor ya concentrada.

Finalmente, de cada muestra se inyectaron 20 μ L en los geles de electroforesis.

6.10.3. Condiciones de electroforesis

Una vez preparadas las muestras, las placas de vidrio fueron colocadas en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN II Cell (BIO-RAD), en cuyo interior habían 300 mL de solución amortiguadora de corrida (ver preparación en el Anexo III). Posteriormente se inyectaron las muestras en los geles.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo utilizando una fuente de poder (BIO-RAD Power Pac 300) a 200V. El tiempo de corrida fue de aproximadamente 40 minutos, tiempo en el cual el frente formado por el colorante de la muestra alcanzó la parte final inferior del gel.

6.10.4. Reacción enzimática

Una vez terminado el corrimiento electroforético, el gel de sustrato fue lavado durante una hora con solución amortiguadora 5X de base-tris y glicina, pH 8.3 (de corrida), realizando tres cambios con el fin de eliminar el azul de bromofenol que podría interferir en la reacción enzimática. Después se colocó en una solución amortiguadora de acetatos 50mM-10mM EDTA, y se incubó a 30°C durante 5 minutos (para el caso de la enzima extracelular) y 30 minutos (para la enzima intracelular).

6.10.5. Tinción de los geles de actividad enzimática

Transcurrido el tiempo de incubación, los geles de sustrato se sumergieron durante una hora en una solución de rojo de rutenio (Sigma) al 0.02% preparada en agua desionizada. Posteriormente, se enjuagaron con agua desionizada para eliminar el exceso de colorante, y se observaron las bandas de actividad.

Las zonas que quedaron incoloras corresponden a las bandas de proteína que poseen actividad de endo-poligalacturonasa.

6.11. Electroforesis

Para la elaboración de los geles, preparación de muestras y electroforesis, se siguió el mismo procedimiento que se indica en la sección 6.10., con la diferencia de que al momento de preparar el gel de separación, no se adicionaron los 8 mg de ácido poligalacturónico.

6.11.1. Tinción de los geles

Una vez transcurrido el tiempo del corrimiento electroforético, los geles fueron teñidos mediante el método de tinción de plata de BIO-RAD, el cual permite visualizar las proteínas presentes en la muestra por su reacción con un complejo de plata similar al que desarrollaron Gottlieb y

Chavko (1987) para la detección de DNA en geles de agarosa. Se utilizó este método de tinción, porque es muy sensible, ya que es capaz de detectar hasta nanogramos de proteína.

El procedimiento a seguir fue el que se describe a continuación.

1.- Etapa de fijación - 20 minutos

Para ello, se preparó la solución fijadora – intensificadora como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 6.11.1.1.
Preparación de la solución fijadora – intensificadora para realizar la tinción de plata en geles de electroforesis

Reactivo	Cantidad (mL)
Metanol grado reactivo	200
Ácido acético grado reactivo	40
Concentrado fijador – intensificador	40
Agua desionizada	120
<i>Volumen total</i>	<i>400</i>

Los geles se sumergieron en esta solución en un contenedor apropiado y se mantuvieron en ligera agitación durante 20 minutos.

2.- Etapa de enjuague – 20 minutos

Se decantó la solución fijadora – intensificadora del recipiente. y los geles fueron enjuagados en 400 mL de agua desionizada, con ligera agitación. Después de 10 minutos, esta agua fue reemplazada por otros 400 mL de agua limpia desionizada. Los geles fueron enjuagados por otros 10 minutos, después de los cuales se decantó el agua.

3.- Etapa de tinción – 20 minutos

Para llevar a cabo esta etapa, se preparó la solución tintorial 5 minutos antes de que terminara la etapa de enjuague. Para ello, se colocaron 35 mL de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer, el cual contenía una barra agitadora magnética. Ya estando el agua en agitación, se adicionaron los siguientes reactivos en este orden: 5 mL de solución de complejo de plata, 5 mL de solución moderadora de reducción y 5 mL del reactivo revelador.

Justo antes del uso de esta solución, se agregaron al matraz 50 mL de solución aceleradora de revelado a temperatura ambiente. Todo se homogeneizó rápidamente y la mezcla se vació al recipiente que contenía los geles, después de lo cual éstos se mantuvieron en agitación moderada. Una vez que las bandas de proteína eran visibles, se decantó esta solución y se colocó en un contenedor plástico para su posterior confinamiento.

4.- Etapa de detención de la reacción de tinción – 15 minutos

Para detener la reacción de tinción, los geles se sumergieron por al menos 15 minutos en una solución de ácido acético (Baker) al 5% preparada en agua desionizada. Una vez detenida la reacción, los geles fueron enjuagados con agua desionizada por 5 minutos, después de lo cual ya estaban listos para ser analizados.

Nota: para evitar inconsistencias en la tinción, todos los contenedores utilizados, tanto de plástico como de vidrio, fueron lavados escrupulosamente con detergente para laboratorio y luego con una solución de ácido nítrico al 50%. Finalmente se enjuagaron bien con agua desionizada.

Las imágenes de los geles fueron digitalizadas en el sistema Gel Doc 1000 (BIO-RAD).

6.12. Determinación de Peso Molecular

La determinación de peso molecular de las muestras se llevó a cabo mediante electroforesis con SDS.

La preparación de los geles se realizó de la misma manera que en la sección 6.11., con la excepción de que en este caso, se cambió la cantidad de solución amortiguadora y se adicionó una solución de SDS al 10%: para el gel de separación se adicionaron 2 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl pH 8.8 y 80 μ L de solución de SDS al 10%, mientras que para el gel de concentración, se adicionó 1 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl pH 6.8 y 40 μ L de solución de SDS al 10%.

La muestra que se utilizó como patrón de peso molecular conocido, fue una mezcla de varias proteínas, cuyos pesos moleculares se muestran en la tabla 6.12.1.

Tabla 6.12.1.
Proteínas que conforman el patrón de peso molecular

Proteína	Peso molecular (Da)
Miosina	200, 000
β -galactosidasa	116, 250
Fosforilasa b	97, 400
Seroalbúmina	66, 200
Ovalbúmina	45, 000

El patrón de peso molecular tal y como se recibió del proveedor (BIO-RAD), fue diluido 1:20 con agua desionizada. Posteriormente, en un vial se depositó 1 μ L de esta dilución junto con 16 μ L de colorante para corrida de electroforesis, 4 μ L de solución de SDS 10% y 1 μ L de 2-mercaptoetanol. Luego, el vial se sumergió en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos.

La preparación de cada muestra problema se realizó como se indica en la sección 6.10.2.

La electroforesis se llevó a cabo de la misma manera que en la sección 6.10.3., a excepción de que en este caso, la solución amortiguadora de corrida contenía SDS (ver su preparación en el anexo III).

Una vez llevado a cabo el corrimiento electroforético, los geles fueron teñidos mediante el método de tinción de plata, para lo cual se siguió el mismo procedimiento que se indica en la sección 6.11.1.

6.12.1. Cálculo del peso molecular

Se calculó el peso molecular tanto para la endo-poligalacturonasa intracelular y extracelular, como para las demás proteínas presentes en las muestras. Para ello, primero se obtuvo el R_f de cada banda en todas las muestras problema y en el patrón de peso molecular, dividiendo la distancia de migración de cada una (medida desde la parte superior del gel hasta el centro de la banda) entre la distancia que recorre el frente de color (azul de bromofenol).

Con los datos del estándar de peso molecular, se graficó $\log PM$ vs R_f . Luego los R_f de las bandas de proteína correspondientes a las muestras problema fueron correlacionados con esta curva, obteniéndose de esta manera el peso molecular de cada proteína.

7. Resultados y discusión

7.1. Endo-poligalacturonasa intracelular

7.1.1. Determinación de proteína y actividad enzimática

La cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 ha sido reportada por García-Garibay y col. (1987b) como una excelente productora de pectinasa extracelular, pero no se ha reportado hasta la fecha actividad de pectinasa intracelular. Espinoza y col., (1992) trabajaron con 5 cepas de *K. marxianus* para evaluar la producción de lactasa, pectinasa e inulinasa, pero no detectaron actividad de pectinasa intracelular en ninguna de las cepas de estudio, considerando por lo tanto, que la actividad pectinolítica de esta levadura es exclusivamente extracelular. Otros autores que han estudiado la producción de endopoligalacturonasa, tampoco reportan actividad de la enzima intracelular.

Sin embargo, en el presente estudio se determinó la existencia de una enzima intracelular, ya que al realizar la determinación de actividad por el método de Nelson-Somogyi (ver sección 6.6.), se encontró que el concentrado intracelular tenía una actividad enzimática de 0.92 UPg/mL y 0.062 UPg/mg biomasa. Según la determinación de proteína por el método de Lowry (ver sección 6.7.), el concentrado tenía un contenido de proteína de 1.180 mg/mL. Este hallazgo permite afirmar que dicha levadura sí presenta actividad de pectinasa intracelular.

7.1.2. Separación de la enzima intracelular por isoelectroenfoque

En las primeras pruebas realizadas en este estudio para separar y determinar el punto isoelectrico a la endo-poligalacturonasa intracelular, se utilizó un anfolito con un rango de pH de 3.8-9.5. Después del corrimiento en el Rotofor, se midió el pH a cada una de las 20 fracciones obtenidas, se eliminó el anfolito y se concentraron las fracciones (ver sección 6.8.4. y 6.5.), para así poder realizar pruebas de actividad de endo-poligalacturonasa por el método de Nelson-Somogyi.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de pH y actividad enzimática obtenidos se muestran en la tabla 7.1.2.1.

Tabla 7.1.2.1.
Actividad enzimática y pH de las fracciones del Rotofor
con anfolito de pH 3.8 - 9.5

Nº de fracción	pH	Actividad enzimática (UPg/mL)
1	5	0
2	5	0
3	5	0
4	5	0.274
5	5	0.637
6	5	0.638
7	6	0.590
8	6	0.536
9	7	0.527
10	7	0.415
11	7	0.130
12	7	0.160
13	7	0
14	7	0
15	7	0
16	8	0
17	8	0
18	8	0
19	9	0
20	9	0

Los resultados de la tabla 7.1.2.1. revelaron que sólo las muestras de pH en un rango de 5-7 eran las que tenían actividad enzimática, siendo una de pH 5 la que presentó la mayor actividad (0.638 UPg). Las muestras que tuvieron valores de pH mayores a los del rango mencionado, no presentaron actividad enzimática. Estos datos dieron indicio de que el punto isoeléctrico de la enzima intracelular estaba cerca de pH 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de realizar una separación más fina de la enzima y para conocer con mayor exactitud el valor de su punto isoelectrico, se decidió utilizar un anfolito de rango de pH más estrecho (pH 4.9-7.9). En este caso ya no se determinó actividad enzimática a las muestras por Nelson-Somogyi, sino que se decidió hacerlo en gel de poliacrilamida.

Tabla 7.1.2.2.
pH de las fracciones del Rotofor
con anfolito de pH 4.9-7.9

No. de fracción	pH
1	4
2	4
3	5
4	5
5	5
6	5
7	6
8	6
9	6
10	6
11	7
12	7
13	7
14	7
15	7
16	8
17	8
18	8
19	9
20	9

7.1.3. Determinación de actividad de endo-poligalacturonasa en geles de poliacrilamida

Para saber qué fracción de las obtenidas después del corrimiento en el Rotofor presentaba actividad enzimática, se realizaron pruebas de actividad en geles de poliacrilamida, utilizando ácido poligalacturónico como sustrato de la enzima. Para teñir los geles se utilizó una solución de rojo rutenio, el cual tiñe sólo las partes donde no actúa la enzima, pues éste se liga al ácido poligalacturónico como tal. Las fracciones con actividad enzimática se detectaron como halos blancos, pues en esas zonas el sustrato ya había sido degradado y, por lo tanto, el colorante no se retuvo. El tamaño de la decoloración corresponde al grado de actividad.

Se decidió inyectar en estos geles 3 fracciones de pH 5 (fracciones 4-6), todas las de pH 6 (fracciones 7-10) y una de pH 7 (fracción 11) (ver tabla 7.1.2.2.). Además, se inyectó una muestra control, la cual corresponde al extracto enzimático que no fue sometido al proceso de separación por isoelectroenfoque. El gel obtenido se observa en la figura 7.1.3.1.

Figura 7.1.3.1.
Detección de endo-poligalacturonasa intracelular
en gel de poliacrilamida con rojo de rutenio

Fracción:	C	4	5	6	7	8	9	10	11	
Carril:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



En los carriles 3-10 se muestran las fracciones de endo-poligalacturonasa obtenidas en la separación por punto isoeléctrico:

2: muestra control; 3: fracción 4; 4: fracción 5; 5: fracción 6; 6: fracción 7; 7: fracción 8; 8: fracción 9; 9: fracción 10; 10: fracción 11.

En la figura 7.1.3.1. se observa que, tanto la muestra control como las fracciones del Rotofor, poseen 3 bandas de actividad. Aunque todas las fracciones inyectadas en el gel presentan halos blancos, el grado de decoloración es diferente en cada carril y, por lo tanto, la actividad enzimática no es igual en todas las muestras.

Es claro que la fracción 5 (la cual tuvo pH de 5) es la que tiene la mayor decoloración o la mayor actividad de endo-poligalacturonasa y, por lo tanto, la que contiene a la enzima en mayor concentración. Se observa que la fracción 4 (también de pH 5) tiene muy poca actividad y que a partir de la fracción 5, la actividad comienza a decaer conforme se incrementan los valores de pH de las fracciones. En la fracción 9 (pH 6) todavía se distinguen 3 bandas, pero en las fracciones 10 y 11 (pH 6 y 7 respectivamente), ya sólo se observan 2 bandas sumamente tenues, lo cual se debe a que en ellas la enzima se encuentra ya en muy bajas proporciones, por efecto del incremento de pH. Con respecto a las fracciones 1-3 (pH 4 y 5) y 12-20 (pH 7-9), éstas no presentaron decoloración alguna, es decir, no tuvieron actividad de endo-poligalacturonasa.

7.1.4. Análisis del patrón electroforético de las fracciones obtenidas en el Rotofor

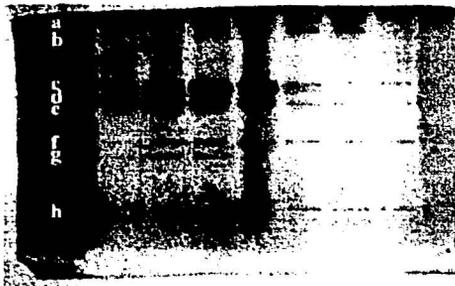
Las fracciones se corrieron en gel de electroforesis, con el fin de conocer el número de bandas de proteína que poseían y ver si existía alguna diferencia entre una fracción y otra, que indicara si realmente había ocurrido una separación de las proteínas presentes. Además, se inyectó en el gel una muestra control, la cual corresponde al extracto enzimático que no fue sometido al proceso de separación por isoelectroenfoque, y que permitió saber si las bandas de proteína que

aparecían en las fracciones del Rotofor eran las mismas que había en la muestra de partida.

En la figura 7.1.4.1. se muestra el gel obtenido. Las fracciones que se inyectaron fueron las mismas que en el caso anterior (fracciones 4-11).

Figura 7.1.4.1.
Electroforesis en gel de poliacrilamida de
las fracciones obtenidas en el Rotofor para
la endo-poligalacturonasa intracelular

Fración:	C	4	5	6	7	8	9	10	11	
Carril:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



En los carriles 3-10 se muestran las fracciones de endo-poligalacturonasa obtenidas en la separación por punto isoeléctrico:

2: muestra control; 3: fracción 4; 4: fracción 5; 5: fracción 6; 6: fracción 7; 7: fracción 8; 8: fracción 9; 9: fracción 10; 10: fracción 11.

A cada banda de proteína se le asignó una letra para poder identificarla y así comparar fácilmente una fracción con otra. A continuación se presenta una tabla que indica las bandas de proteína que presenta cada muestra.

Tabla 7.1.4.1.
Bandas de proteína que presentan las muestras
inyectadas en el gel de electroforesis

No. de fracción	pH	Bandas de proteína	No. de bandas
<i>Control</i>	---	a, b, c, d, e, f, g, h	8
4	5	a, c, d, e, f	5
5	5	a, c, d, e, f, g, h	7
6	5	a, b, c, d, e, f, g, h	8
7	6	a, b, c, d, e, f, h	7
8	6	a, b, c, d, e, f, h	7
9	6	a, b, c, d, e, f, h	7
10	6	a, c, e, f, h	5
11	7	a	1

En la figura 7.1.4.1. se observa que se llevó a cabo una purificación parcial de proteínas, ya que en ningún carril aparecen bandas aisladas, pero hay algunas bandas que aparecen en unos carriles y en otros no. También se observa que la intensidad de las bandas varía de carril a carril, lo cual significa que las proteínas se concentraron más en unas fracciones que en otras, por efecto del cambio de pH. A simple vista puede advertirse que todas las bandas que aparecen en las fracciones del Rotofor efectivamente corresponden a las que contiene la muestra control.

Llama la atención la banda a, ya que es la más intensa de todas y se encuentra en todas las fracciones; en las fracciones 4-10 se observa casi de la misma intensidad y, en la fracción 11 (pH 7), se ve todavía más intensa, lo cual significa que en esa fracción se concentró más. También resaltan las bandas c, d y e, ya que claramente se advierte que en la fracción 5 (pH 5) se concentraron más que en el resto de las fracciones, pues es ahí donde se observan con mayor intensidad. En lo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que respecta al resto de las bandas (b, f, g y h), éstas se observan muy tenues en todos los carriles en los que aparecen.

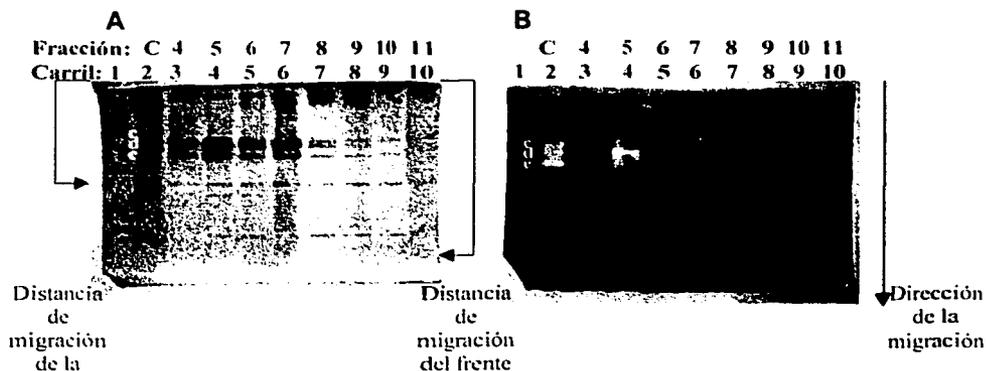
7.1.5. Identificación de las bandas de proteína que poseen actividad enzimática

Haciendo una comparación entre el gel en donde se detectaron las bandas de proteína y el gel en el cual se detectó la actividad enzimática, puede considerarse de primera instancia, que las bandas de proteína c, d y e son las mismas que se ven como 3 halos blancos en el gel de actividad, pues en ambos casos se observan 3 bandas muy cercanas entre sí que recorrieron prácticamente la misma distancia a lo largo de los geles. Para confirmar esta observación, se obtuvo el Rf de cada banda en cada carril, como se indica en la figura 7.1.5.1. Luego estos valores se compararon en la Tabla 7.1.5.1.

Figura 7.1.5.1.
Detección de endo-poligalacturonasa
Intracelular en gel de poliacrilamida

A. Proteína teñida con plata

B. Detección de endo-poligalacturonasa por tinción con rojo de rutenio



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$R_f = \frac{\text{distancia de migración de la proteína}}{\text{distancia de migración del frente de color}} \quad (\text{Ec. 7.1.5.1.})$$

Tabla 7.1.5.1.
Comparación del R_f de las bandas de
proteína con actividad enzimática

Muestra	Bandas	R _f de bandas de proteína	R _f de halos de actividad
Control	c	0.295	0.296
	d	0.318	0.343
	e	0.378	0.390
4	c	0.295	0.296
	d	0.318	0.343
	e	0.378	0.390
5	c	0.295	0.289
	d	0.318	0.335
	e	0.378	0.390
6	c	0.303	0.289
	d	0.325	0.335
	e	0.378	0.390
7	c	0.303	0.296
	d	0.325	0.343
	e	0.378	0.390
8	c	0.303	0.296
	d	0.333	0.343
	e	0.378	0.390
9	c	0.295	0.296
	d	0.318	0.343
	e	0.378	0.390
10	c	0.303	0.296
	d	----	----
	e	0.378	0.390

- La marca ---- indica que esa banda está ausente en la muestra (ver fig. 7.1.5.1.)

En esta tabla se puede observar que los Rf de las bandas de proteína c, d y e son muy similares a los de los halos de actividad enzimática. Además de esto, existen otras razones para pensar que las bandas c, d y e del gel de proteína corresponden a los 3 halos de actividad enzimática: en ambos geles las tres proteínas corren guardando la misma distancia entre ellas; además, en los dos se observa que las tres proteínas aparecen en casi todos los carriles, pero en la muestra control y en la 5 se ven mucho más intensas que en ninguna otra. Por lo tanto, puede afirmarse que las bandas de proteína c, d y e conforman la endopoligalacturonasa intracelular.

7.1.6. Determinación del punto isoelectrico de la endopoligalacturonasa intracelular

El punto isoelectrico de una proteína es el pH al cual la carga neta de la molécula es de cero. Al alcanzar este valor de pH, la proteína deja de migrar en el sistema, pues ya no hay cargas que la atraigan hacia el cátodo o hacia el ánodo, y es por esta razón que empieza a concentrarse en ese punto, lo cual le da oportunidad de separarse de las proteínas que la estén acompañando, que tengan un punto isoelectrico diferente. Tanto en el gel de proteína como en el gel de actividad (Fig. 7.1.5.1.), se puede observar claramente que las bandas c, d y e, las cuales corresponden a la endopoligalacturonasa intracelular, se concentraron más en la fracción No. 5 (pH 5), aunque no se separaron totalmente del resto de las proteínas. Por lo tanto, se puede decir que el valor del punto isoelectrico de la endopoligalacturonasa intracelular es de 5.

7.1.7. Determinación del peso molecular de la endopoligalacturonasa intracelular

En la electroforesis realizada para determinar peso molecular, se inyectó la muestra control, las fracciones del Rotofor y un patrón de proteínas de peso molecular conocido. El gel obtenido se muestra a continuación.

Figura 7.1.7.1.
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
de las fracciones del Rotofor para la
endo-poligalacturonasa intracelular

Fracción:	P	C	4	5	6	7	8	9	10	
Carril:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



En los carriles 4-10 se muestran las fracciones de endo-poligalacturonasa obtenidas en la separación por punto isoelectrico:

2: patrón de peso molecular; 3: muestra control; 4: fracción 4; 5: fracción 5; 6: fracción 6; 7: fracción 7; 8: fracción 8; 9: fracción 9; 10: fracción 10.

En la figura 7.1.7.1. se puede observar que el número de bandas de proteína que aparecen en cada muestra coincide con el patrón electroforético (figura 7.1.4.1.); sin embargo, es claro que el corrimiento no es igual, pues en el gel para determinación del peso molecular, las proteínas recorrieron una mayor distancia que en el otro. Esto era de esperarse, ya que en este caso se utilizó dodecil sulfato de sodio (SDS), con el fin de que las proteínas se vieran más separadas y definidas, para un cálculo de peso molecular más preciso.

El SDS es un detergente de carga negativa, que homogeneiza la carga de las proteínas, ocasionando que éstas sean menos voluminosas y que no haya atracción entre ellas, por lo cual corren con mayor facilidad a través del gel, generando bandas más definidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que el corrimiento no es el mismo, ambos geles son perfectamente comparables. Por lo tanto, se puede afirmar que las bandas c, d y e, corresponden también en este caso a la endopoligalacturonasa intracelular.

Se calcularon los R_f de las bandas de proteína presentes en la muestra patrón y de las muestras problema, siguiendo la ecuación 7.1.5.1. Los valores para las muestras patrón se presentan en la Tabla 7.1.7.1.

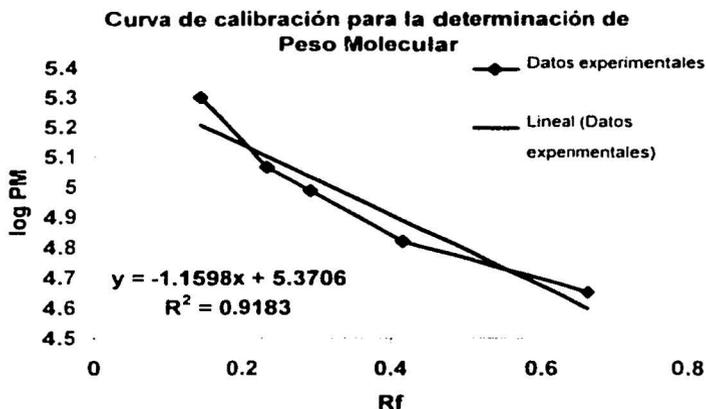
Tabla 7.1.7.1.
Patrones de peso molecular

No. banda	Patrón	PM (Da)*	R_f	log PM
1	Miosina	200,000	0.141	5.301
2	β -galactosidasa	116,250	0.233	5.065
3	Fosforilasa b	97,400	0.291	4.988
4	Seroalbúmina	66,200	0.416	4.820
5	Ovalbúmina	45,000	0.666	4.653

* Datos reportados por BIO-RAD

Graficando los datos de log PM vs R_f , se obtuvo la curva de calibración, de donde se desprendió la ecuación 7.1.7.1., con la cual se calculó el peso molecular de las muestras problema (Tabla 7.1.7.2.).

Figura 7.1.7.2.



$\log PM = -1.159 Rf + 5.370$

(Ecuación 7.1.7.1.)

Tabla 7.1.7.2.
Pesos moleculares de la endo-poligalacturonasa
Intracelular

Pesos Moleculares (kDa)								
Bandas de proteína	Control	Frac. 4	Frac. 5	Frac. 6	Frac. 7	Frac. 8	Frac. 9	Frac. 10
a	191,900	191,900	196,565	191,900	191,900	191,900	191,900	191,900
b	123,219	----	----	123,219	123,219	123,219	123,219	----
c	80,612	80,612	80,612	80,612	80,612	80,612	80,612	80,612
d	70,542	70,542	70,542	70,542	70,542	70,542	70,542	70,542
e	57,746	57,746	59,150	57,746	57,746	59,150	57,746	57,746
f	43,287	43,287	45,296	45,296	44,221	45,296	43,287	43,287
g	37,079	----	39,637	39,637	----	----	----	----
h	25,384	----	25,931	25,931	25,931	25,931	25,384	25,384

Nota:

- La marca ---- indica que no presentó banda de proteína. Los renglones sombreados señalan las bandas que corresponden a la endo-poligalacturonasa intracelular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, puede decirse que la endopoligalacturonasa intracelular consta de 3 isoenzimas, cuyo peso molecular es el obtenido en la fracción 5 (fracción en la que las tres proteínas están más concentradas). La isoenzima I tiene un peso molecular de 80, 612 Da, la isoenzima II de 70, 542 Da y la III de 59, 150 Da.

7.2. Endo-poligalacturonasa extracelular**7.2.1. Determinación de proteína y actividad enzimática**

En la determinación de actividad por el método de Nelson-Somogyi (ver sección 6.6.), se encontró que el extracto enzimático extracelular obtenido a partir de la cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 mostró una actividad enzimática mucho mayor que el extracto intracelular. Esto era de esperarse, ya que se ha reportado que dicha levadura es muy buena productora de pectinasa extracelular (García-Garibay y col., 1987b) y la enzima intracelular ni siquiera había sido detectada en trabajos anteriores (Espinoza y col., 1992).

A continuación se presenta una tabla comparativa de ambos extractos enzimáticos.

Tabla 7.2.1.1.
Comparación de ambos extractos enzimáticos

Extracto enzimático	Extracelular	Intracelular
Actividad enzimática (UPg/mL)	14.48	0.92
Actividad enzimática (UPg/mg biomasa)	4.08	0.06
Proteína (µg/mL)	182.99	1180.64
Actividad específica (UPg/mg proteína)	79.13	0.77
Volumen total (mL)	50	40
Actividad enzimática total (UPg)	724	36.8
% de actividad enzimática	95.16	4.83

7.2.2. Separación de la enzima extracelular por isoelectroenfoque

En el caso de la endo-poligalacturonasa extracelular, se utilizó solamente el anfolito de rango de pH de 4.9-7.9 para realizar la corrida en el Rotofor. Después se midió el pH a cada una de las 20 fracciones obtenidas, se eliminó el anfolito y se concentraron las fracciones (ver sección 6.8.4. y 6.5.), y se realizaron pruebas de actividad enzimática por el método de Nelson-Somogyi. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.2.2.1.

**Tabla 7.2.2.1.
Actividad enzimática de las fracciones del Rotofor
con anfolito de pH 4.9-7.9**

No. de fracción	pH	Actividad enzimática (Upp/mL)
1	4	---
2	4	---
3	5	14
4	5	26
5	5	44
6	5	135
7	5	141
8	6	---
9	7	---
10	7	---
11	7	---
12	7	0
13	7	0
14	7	0
15	8	0
16	8	0
17	8	0
18	9	0
19	10	0
20	13	0

No fue posible determinar actividad enzimática por Nelson-Somogyi a las fracciones de pH 4, la de pH 6 y las tres primeras de pH 7, debido a que las muestras fueron insuficientes. Sin embargo, los resultados obtenidos de las fracciones analizadas, indicaron que las fracciones de pH 5 eran las que tenían actividad enzimática. Las que tuvieron valores de pH de 7 en adelante, no presentaron actividad enzimática. Estos datos dieron indicio de que el punto isoeléctrico de la enzima extracelular, al igual que para la intracelular, era de pH 5.

7.2.3. Determinación de actividad de endo-poligalacturonasa en geles de poliacrilamida

Para corroborar los resultados obtenidos mediante el análisis por Nelson-Somogyi, se realizaron pruebas de actividad en geles de poliacrilamida, utilizando ácido poligalacturónico como sustrato de la enzima.

En la figura 7.2.3.1. se muestra el gel de actividad obtenido con las fracciones del Rotofor correspondientes a la endo-poligalacturonasa extracelular. Además, se inyectó una muestra control, la cual no fue sometida al proceso de separación por isoelectroenfoque.

Figura 7.2.3.1.
Detección de endo-poligalacturonasa extracelular
en gel de poliacrilamida con rojo de rubino

Fracción:	C	3	4	5	6	7	8	9	10	
Carril:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los carriles 3-10 se muestran las fracciones de endopoligalacturonasa obtenidas en la separación por punto isoelectrónico: **2: muestra control; 3: fracción 3; 4: fracción 4; 5: fracción 5; 6: fracción 6; 7: fracción 7; 8: fracción 8; 9: fracción 9; 10: fracción 10.**

En la figura 7.2.3.1. se observa que, tanto la muestra control como las fracciones del Rotofor, poseen 3 bandas de actividad. Aunque todas las fracciones inyectadas en el gel presentan halos blancos, el grado de decoloración es diferente en cada carril y, por lo tanto, la actividad enzimática no es igual en todas las fracciones.

Es claro que la fracción 7, la cual tuvo pH de 5, es la que tiene la mayor decoloración o la mayor actividad de endopoligalacturonasa y, por lo tanto, la que contiene a la enzima en mayor concentración. Se observa que la fracción 3 (también de pH 5) tiene muy poca actividad y que ésta se va incrementando hasta llegar a su máximo en la fracción 7, a partir de la cual la actividad comienza a decaer conforme se incrementan los valores de pH de las fracciones. En las fracciones 8 (pH 6), 9 y 10 (pH 7) ya sólo se observan 2 bandas sumamente tenues, lo cual se debe a que en estas fracciones la enzima se encuentra ya en muy bajas proporciones. Las fracciones 1 y 2 (pH 4), 11-14 (pH 7), 15-17 (pH 8), 18 (pH 9), 19 (pH 10) y 20 (pH 13) no tuvieron actividad enzimática en gel de poliacrilamida.

7.2.4. Análisis del patrón electroforético de las fracciones obtenidas en el Rotofor

Las fracciones se corrieron en gel de electroforesis con el fin de conocer el número de bandas de proteína que poseían y ver si existía alguna diferencia entre una fracción y otra, que indicara si realmente había ocurrido una separación de las proteínas presentes. Además, se inyectó en el gel una muestra control, la cual corresponde al concentrado enzimático que no fue sometido al proceso de separación por isoelectroenfoque, y que permitió saber si las bandas de proteína que aparecían en las fracciones del Rotofor eran las mismas que había en la muestra de partida.

Se decidió inyectar en este gel de electroforesis las mismas fracciones que en el gel de actividad ezimática.

Figura 7.2.4.1.
Electroforesis en gel de poliacrilamida
de las fracciones obtenidas en el Rotofor
para la endo-poligalacturonasa extracelular

Fracción:	C	3	4	5	6	7	8	9	10	
Carril:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



En los carriles 3-10 se muestran las fracciones de endo-poligalacturonasa obtenidas en la separación por punto isoeléctrico:
2: muestra control; 3: fracción 3; 4: fracción 4; 5: fracción 5; 6: fracción 6; 7: fracción 7; 8: fracción 8; 9: fracción 9; 10: fracción 10.

A cada banda de proteína se le asignó una letra para poder identificarla y así comparar fácilmente una fracción con otra. A continuación se presenta una tabla que indica las bandas de proteína que presenta cada muestra.

Tabla 7.2.4.1.
Bandas de proteína que presentan las
muestras inyectadas en el gel de electroforesis

No. de fracción	pH	Bandas	No. de bandas
Control	-----	a, b, c	3
3	5	b, c	2
4	5	a, b, c	3
5	5	a, b, c	3
6	5	a, b, c	3
7	5	a, b, c	3
8	6	a, b	2
9	7	a, b	2
10	7	a, b	2

En la figura 7.2.4.1. se observa que se llevó a cabo una purificación parcial de proteínas, ya que en ningún carril aparecen bandas aisladas. También se observa que la intensidad de las bandas varía de carril a carril, lo cual significa que las proteínas se concentraron más en unas fracciones que en otras, por efecto del cambio de pH.

A simple vista puede advertirse que las tres bandas de proteína que aparecen en las fracciones del Rotofor efectivamente corresponden a las que contiene la muestra control. Es claro que estas tres proteínas se concentraron más en la fracción 7 (pH 5) que en el resto de las fracciones, pues es ahí donde se observan con mayor intensidad.

7.2.5. Identificación de las bandas de proteína que poseen actividad enzimática

Haciendo una comparación entre el gel en donde se detectaron las bandas de proteína y el gel en el cual se detectó la actividad enzimática, puede considerarse de primera instancia, que las bandas de proteína a, b y c son las mismas que se ven como 3 halos blancos en el

gel de actividad, pues en ambos casos se observan 3 bandas muy cercanas entre sí que recorrieron prácticamente la misma distancia a lo largo de los geles.

Para confirmar esta observación, se obtuvo el Rf de cada banda en cada carril, tal como se indica en la figura 7.1.5.1. y siguiendo la ecuación 7.1.5.1. Luego estos valores se compararon en la Tabla 7.2.5.1.

Figura 7.2.5.1.
Detección de endo-poligalacturonasa
Extracelular en gel de poliacrilamida

A. Proteína teñida con plata

B. Detección de endo-poligalacturonasa por tinción con rojo de rutenio

A

Fracción:	C	3	4	5	6	7	8	9	10	
Carril:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



B

	C	3	4	5	6	7	8	9	10	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7.2.5.1.
Comparación del Rf de las bandas de
proteína con actividad enzimática

Muestra	Bandas	Rf de bandas de proteína	Rf de halos de actividad
Control	a	0.431	0.369
	b	0.477	0.407
	c	0.530	0.446
3	a	-----	-----
	b	0.477	0.415
	c	0.530	0.453
4	a	0.424	0.369
	b	0.477	0.415
	c	0.530	0.453
5	a	0.424	0.369
	b	0.477	0.415
	c	0.530	0.453
6	a	0.431	0.369
	b	0.469	0.415
	c	0.522	0.453
7	a	0.424	0.361
	b	0.477	0.415
	c	0.530	0.461
8	a	0.431	0.369
	b	0.469	0.415
	c	-----	-----
9	a	0.431	0.369
	b	0.469	0.415
	c	-----	-----
10	a	0.431	0.369
	b	0.469	0.415
	c	-----	-----

En esta tabla se puede observar que los Rf de las bandas de proteína a, b y c son similares a los de los halos de actividad enzimática, aunque existe entre ellos cierta diferencia. Esta diferencia podría deberse a que

los halos de actividad son muy anchos y difusos, mientras que las bandas de proteína están bien definidas, lo cual ocasiona errores al momento de medir las distancias recorridas por las bandas. Además, podría haber ciertas diferencias en el corrimiento debido a que los geles no se prepararon ni se corrieron juntos, sino que cada uno pertenece a una corrida diferente.

Aunque los R_f no son iguales en un gel y otro, es evidente que las bandas de proteína a, b y c corresponden a los 3 halos de actividad enzimática, ya que en ambos geles se observan sólo tres proteínas que corren guardando aproximadamente la misma distancia entre ellas; además, en los dos se observa que las tres bandas aparecen en la muestra control y en las fracciones 4-7, pero en la muestra control y en la 7 se ven más intensas que en las otras. Por lo tanto, puede afirmarse que las bandas a, b y c conforman la endo-poligalacturonasa extracelular.

7.2.6. Determinación del punto isoeléctrico de la endo-poligalacturonasa extracelular

Tanto en el gel de proteína como en el gel de actividad enzimática (Fig. 7.2.5.1.), se puede observar claramente que las bandas a, b y c, las cuales corresponden a la endo-poligalacturonasa extracelular, se concentraron más en la fracción No. 7 (pH 5). Por lo tanto, se puede decir que el valor del punto isoeléctrico de la endo-poligalacturonasa extracelular es de 5, al igual que para la enzima intracelular.

7.2.7. Determinación de peso molecular de la endo-poligalacturonasa extracelular

En la electroforesis realizada para determinar peso molecular, se inyectó la muestra control, las fracciones del Rotofor y un patrón de proteínas de peso molecular conocido. El gel obtenido se muestra a continuación.

Figura 7.2.7.1.
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
de las fracciones del Rotofor para la
endo-poligalacturonasa extracelular

Fracción:	P	C	3	4	5	6	7	8	9	
Carril:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



En los carriles 4-10 se muestran las fracciones de endo-poligalacturonasa obtenidas en la separación por punto isoeléctrico:

2: patrón de peso molecular; 3: muestra control; 4: fracción 3; 5: fracción 4; 6: fracción 5; 7: fracción 6; 8: fracción 7; 9: fracción 8; 10: fracción 9.

En la figura 7.2.7.1. se observa que el número de bandas de proteína que aparecen en cada muestra coincide con el patrón electroforético (figura 7.2.4.1.); sin embargo, es claro que el corrimiento no es igual, pues en el gel para determinación del peso molecular, las proteínas recorrieron una mayor distancia que en el otro. Esto era de esperarse, ya que en este caso se utilizó dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual es un agente que ocasiona que las proteínas sean menos voluminosas, porque elimina la atracción entre ellas.

A pesar de que el corrimiento no es el mismo, ambos geles son perfectamente comparables. Por lo tanto, se puede afirmar que las bandas a, b y c corresponden a la endo-poligalacturonasa extracelular.

Se calcularon los R_f de las bandas de proteína presentes en la muestra patrón y de las muestras problema, siguiendo la ecuación 7.1.5.1. Los valores para las proteínas patrón se presentan en la Tabla 7.2.7.1.

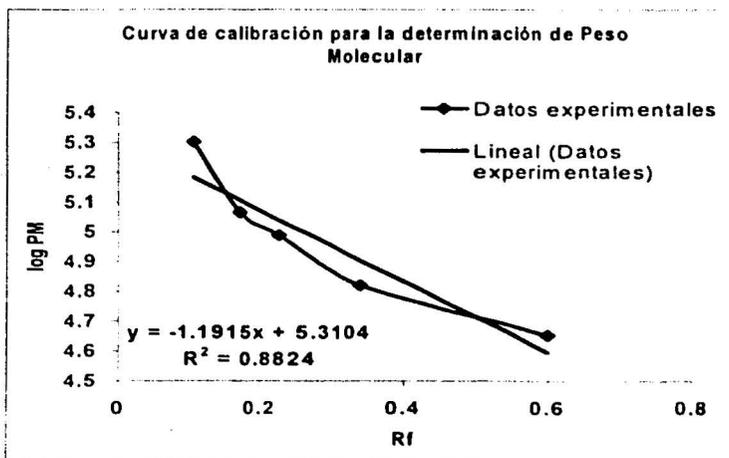
Tabla 7.2.7.1.
Patrones de peso molecular

No. banda	Patrón	PM (Da)*	Rf	log PM
1	Miosina	200,000	0.107	5.301
2	β -galactosidasa	116,250	0.171	5.065
3	Fosforilasa b	97,400	0.228	4.988
4	Seroalbúmina	66,200	0.342	4.820
5	Ovalbúmina	45,000	0.600	4.653

* Datos reportados por BIO-RAD

Graficando los datos de log PM vs Rf, se obtuvo la curva de calibración, de donde se desprendió la ecuación 7.2.7.1., con la cual se calculó el Peso Molecular de las muestras problema (Tabla 7.2.7.2.).

Figura 7.2.7.2.



$\log PM = -1.191 Rf + 5.310$

(Ecuación 7.2.7.1.)

**Tabla 7.2.7.2.
Pesos moleculares de la endo-poligalacturonasa
extracelular**

Pesos Moleculares (Da)								
Bandas de proteína	Control	Frac. 3	Frac. 4	Frac. 5	Frac. 6	Frac. 7	Frac. 8	Frac. 9
a	38,642	-----	40,265	39,391	39,391	39,391	38,642	39,391
b	35,786	35,786	35,106	35,106	35,106	35,106	35,106	35,106
c	31,805	32,422	31,805	31,805	31,805	31,805	-----	-----

Nota:

La marca ---- indica que no presentó banda de proteína

De acuerdo con los resultados obtenidos, puede decirse que la endo-poligalacturonasa extracelular consta de 3 isoenzimas, cuyo peso molecular es el obtenido en la fracción no. 7 (fracción en la que las tres proteínas están más concentradas). La isoenzima I tiene un peso molecular de 39,391 Da, la isoenzima II de 35,106 Da y la III de 31,805 Da.

Es importante mencionar que estos pesos moleculares corresponden a aproximadamente la mitad de los pesos moleculares encontrados para las isoenzimas intracelulares.

8. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que:

- Se encontró que la cepa *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 si tiene actividad de endo-poligalacturonasa intracelular, lo cual difiere de lo reportado por Espinoza y col. (1992), quienes trabajaron con 5 cepas de esta levadura (incluyendo la que se utilizó en este estudio) y en ningún caso detectaron actividad de endo-poligalacturonasa intracelular. Esto significa que no toda la enzima producida por la levadura es excretada, sino que parte de ella es retenida en el interior de la célula.
- Aunque sólo se llevó a cabo una purificación parcial de las enzimas intra y extracelular, es claro que ambas están formadas por tres isoenzimas de diferente peso molecular.
- El punto isoeléctrico de las 3 isoenzimas encontradas, tanto intracelulares como extracelulares, tiene un valor de 5.
- Es muy importante recalcar que las tres isoenzimas que conforman la endo-poligalacturonasa intracelular tienen aproximadamente el doble de peso molecular que las de la enzima extracelular, ya que presentan valores de 59, 150 a 80, 612 Da, mientras que para la segunda se presentan valores de 31, 805 a 39, 391 Da.
- El hecho de haber encontrado que la pectinasa intracelular tiene un mayor peso molecular que la extracelular, sugiere que posiblemente la enzima sufre algún cambio en su estructura que disminuye su masa, para poder ser transportada al exterior de la célula. El mecanismo de excreción de esta enzima prácticamente no ha sido estudiado; sin embargo, es probable que sea similar al de la inulinasa, la cual es excretada como un dímero, mientras que la enzima periplásmica es una proteína tetramérica (Rouwenhorst y col., 1990). Esto podría comprobarse analizando la conformación de esta enzima.

9. Bibliografía

1. Barnby, F., Morpeth, F., Pyle, D. (1990). Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 12 (Nov): 891-897.
2. Blanco, S. G. (1979). Obtención de fructosa a partir de hidrólisis de inulina de agave por diversos métodos. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Química. México, D.F.
3. Buddecke, E. (1983). Elementos de Bioquímica. pp. 164-166. 1a edición. Ediciones Omega. Barcelona, España.
4. Call, H., Emeis, C. (1983). Characterization of an endopolygalacturonase of the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J. Food Biochem.* 7(2): 59-85.
5. Castillo, F. (1990). Lactose metabolism by yeast. In yeast: Biotechnology and Biocatalysis. Verachtert, H. y De Mot R. (Ed). Marcel Dekker. Nueva York.
6. Chaplin, M., Bucke, C. (1990). *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. Gran Bretaña.
7. Cruz-Guerrero, A., García-Peña, I., Bárzana E., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (1995). *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase Hyperproducing strain. *J. Ferment. Bioeng.* 80 (2): 159-163.
8. Cruz-Guerrero, A., Bárzana, E., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (1998). Dissolved oxygen threshold for the repression of endopolygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Proc. Biochem.* 34: 621-624.

9. Demain, A. L., Phaff, H. J. (1954). Hydrolysis of the oligogalacturonides and pectic acid by yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.* 210:381-393.
10. Espinoza, P., Bárzana, E., Garcia-Garibay, M., and Gómez-Ruiz, L. (1992). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. *Biotechnol. Lett.* 14 (11): 1053-1058.
11. Fennema, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. Segunda edición. p. 418. Edit. Acribia, Zaragoza, España.
12. Fons G. T. V., Rob H. (1980). Solubilization of apple cell walls with polysaccharide degrading enzymes. *J. Appl. Biochem.* 2: 452-468.
13. Gainvors, A., Frézier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M., Belarbi, A. (1994). Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast.* 10: 1311-1319.
14. Garcia-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Bárzana. E. (1987a). Simultaneous production of single cell protein and pectinase from whey. *Proceeding of the 1987 Food Processing Waste Conference, Atlanta USA.*
15. Garcia-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. and Bárzana. E. (1987b). Studies on the simultaneous production of single-cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Lett.*, 9 (6): 411-416.
16. Garcia-Garibay, M. (1992). Recuperación de enzimas intracelulares de interés industrial, β -galactosidasa de levadura. *Ciencia.* 43: 23-33.
17. Garcia-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L; Bárzana E. (1993). Single-cell protein. *En. Food science, food technology and nutrition.* Macrae, R., Robinson, R. K., Sadler, M. J. (ed). pp. 4135-4141. Academic Press.

18. Gerhartz, W. (1990). Enzymes in industry. pp. 43-61, 126, 127. Edit. VCH. Germany.
19. Giraud, J., Galzy, P. (1990). Inulin conversion by yeast. In *Yeast: Biotechnology and Biocatalysis*. (Verachtert, H.). Marcel Dekker. Nueva York. 225-296.
20. Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Bárzana E., (1988). Utilization of Endo-Polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of Apple juice. *J. Food Sci.* 53(4): 1236, 1237, 1240.
21. Gotlieb, M. and Chavko, M., (1987). *Analytical Biochemistry*, 165: 33-37.
22. Grootwassink J. W. D. and Fleming S. E. (1980). Non-specific β -fructofuranosidase (inulinase) from *K. fragilis*. Batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 45-53.
23. Grootwassink, J., Hewitt, G. (1983). Inducible and Constitutive formation of inulinase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129:31-41.
24. Harsa, S., Zaror, C., Pyle, D. (1993). Production of polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. Fermentation: preliminary process design and economics. *Proc. Biochem.* 28:187-195.
25. Kobayashi, Y., Matsuo, R. (1979). Biochemical pulping. III. Macerating activity of endo-polygalacturonase produced by *Saccharomyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* 43 (6): 1369-1370.
26. Kreger-van Rij, N. (1984). *The yeasts a taxonomic study*. 3rd. Ed. Elsevier. Amsterdam. 233-238.

27. Kurtzman, C., Robnett, C. (1991). Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaromyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*. 7: 61-72.
28. Lachance, M. (1993). *Kluyveromyces*: systematics since 1970. *Antonie van Leeuwenhoek*. 63: 95-104.
29. Lee C. K. and Lindley M. G. (1982). Developments in food carbohydrate. Applied Science. London. Chapter 2: 300-345.
30. Lehninger, A. L. (1991). Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2a edición. Ediciones Omega. Barcelona.
31. Lim, J., Yamasaki, Y., Suzuki, Y., Ozawa, J. (1980). Multiple forms of endo-polygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* 44(3):473-480.
32. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Radall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
33. Luh, B. S., Phaff H. J. (1951). Studies on Polygalacturonase of certain yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 33:212-227.
34. Luh, B. S., Phaff, H. J. (1954). End products and mechanism of hydrolysis of pectin and pectic acid by yeast polygalacturonase. *Arch. Biochem. Biophys.* 51: 102-113.
35. Mahoney, R. R., Whitaker, J. R., Nicherson, T. A. (1975). Selection of strains, grown conditions and extract on procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* 58: 1620-1629.
36. Mayrath, J., Bayer, K. (1979). Biomass from whey. En. *Economic Microbiology*. Vol. 4. Rose, A. (ed). Academic Press. Londres.

37. McMillan., G. P., Johnston, D. J., Pérombelon, M. C. M. (1992). Purification to homogeneity of extracellular polygalacturonase and isoenzymes of pectate lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by column chromatography. *J. Appl. Bacter.* 73: 83-86.
38. Moussa E. and Baratti J.C. (1987). Purification properties and comparison of invertases, exoinulinases and endoinulinases of *A. ficuum*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 26: 13-20.
39. Negoro, H.(1978). Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. *Ferment. Technol.* 56:102-107.
40. Nelson N.(1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153(2):375-380.
41. Ozawa, J., Okamoto, K., Hayashi, T. (1961). Pectin polygalacturonase of *Saccharomyces fragilis*. *Chem. Abstr.* 55: 2799d.
42. Pasculli, R., Geraeds, C., Voragen, F., Pilnik, W. (1991). Characterization of Polygalacturonases from Yeast and Fungi. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 24: 63-70.
43. Pelczar M. J., Chan E. C. S. (1991). *Elementos de Microbiología.* Primera edición. p. 235, 236 y 241. Edit. Mc Graw Hill. México.
44. Phaff, H., Demain, A. (1956). The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.* 218:875-886.
45. Phaff, H. (1966). $\alpha(1-4)$ polygalacturonide glycanohydrolase (endopoligalacturonase) from *Saccharomyces fragilis*. *Meth. Enzymol.* 8: 636-641.
46. Reed, G., Nagodawithana, T. (1991). *Yeast technology.* 2nd. Ed. AVI. Nueva York.

47. Ried, J. L. and Collmer, A. (1985). Activity Stain for rapid characterization of Pectic Enzymes in isoelectric focus and Sodium Dodecil Sulfate-Polyacrilamide Gels. *Appl. Environm. Microbiol.* 50(3): 615-622.
48. Ried, J., L., Collmer, A. (1986). Comparison of pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. And Environ. Microbiol.* 52 (2): 305-310.
49. Rosane, F., Rose A. (1994). Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *J. Appl. Bacteriol.* 76(1):62-67.
50. Rouwenhorst, R., Hensing, M., Verbakel, J., Van Dijken, J. (1990). Estructure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* cbs 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(11): 3337-3345.
51. Sakai, T., Okushima, M., Yoshitake, S. (1984). Purification, crystallization and some properties of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* 48(8): 1951-1961.
52. Sánchez-Font, L., Castillo, F. J. (1980). Producción, extracción y caracterización parcial de β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* crecida en suero de leche. *Acta Cient. Venez.* 31: 154-159.
53. Scopes, R. K. (1994). *Protein purification, Principles and Practice*. 3rd edition. p.p. 250-307. Springer-Verlag. New York.
54. Smith, J. (1988). *Enzyme Technology*. In: *Biotechnology*. Edward Arnold. Inglaterra.
55. Smith, A., Pyle, D. (1990). Two-dimensional electrophoretic analysis of endopolygalacturonases produced by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Food Biochem.* 14:273-281.

BIBLIOGRAFÍA

56. Snyder, H., Phaff, H. (1960). Studies on β -fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 26: 433-452.
57. Suckling, C. (1990). *Enzyme chemistry. Impact and applications*. 2nd edition. Edit. Chapman and Hall. London.
58. Vandame, E., Derycke, D. (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. *Adv. in Appl. Microbiol.* 29: 139-176.
59. Voragen, F. G. J., Heutink, R., Pilnik, W. (1980). Solubilization of apple cell walls with polysaccharide - degrading enzymes. *J. Appl. Biochem.* 2: 452.
60. Wimborne, M., Rickard, P. (1978). Pectinolytic Activity of *Saccharomyces fragilis*. *Cult. In Contr. Environm. Biotechnol. Bioeng.* 20: 231-242.
61. Yamasaki M., Kato A., Shang-Young Ch., Arima K. (1967). Pectic enzymes in the clarification of apple juice. II.- The Mechanism of Clarification. *Agr. Biol. Chem.* 31(5): 552-560.

10. Anexos

Anexo I

Preparación de las soluciones amortiguadoras de fosfatos y acetatos

- **Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.6**

Solución básica.

- 8.7 g de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) (Baker)
- 0.1 g de azida de sodio (Sigma)

Se mezclaron los reactivos y se llegó a un aforo de 500 mL con agua destilada.

Solución ácida.

- 6.8 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) (Baker)
- 0.1 g de azida de sodio (Sigma)

Se mezclaron los reactivos y se llegó a un aforo de 500 mL con agua destilada.

Se adicionó lentamente y con agitación la solución básica a la ácida, hasta alcanzar un pH de 6.6.

- **Solución amortiguadora de acetatos, 0.1 M, pH 5.0**

Solución básica.

- 6.8 g de acetato de sodio ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) (Baker)
- 0.1 g de azida de sodio (Sigma)

Se mezclaron los reactivos y se llegó a un aforo de 500 mL con agua destilada.

Solución ácida.

- 2.848 mL de ácido acético (CH_3COOH) (Baker)
- 0.1 g de azida de sodio (Sigma)

Se mezclaron los reactivos y se llegó a un aforo de 500 mL con agua destilada.

Se adicionó lentamente y con agitación la solución básica a la ácida, hasta alcanzar un pH de 5.0.

Anexo II

Preparación de los reactivos para la determinación de actividad de endo-poligalcturonasa por el método de Nelson-Somogyi

Reactivo 1

- **Solución A:** en 800 mL de agua destilada se disolvieron: 25g de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) (Baker), 25g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Baker), 20g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) (Baker) y 200g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) (Baker). Se aforó a un litro.
- **Solución B:** en 200 mL de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (Baker) y se disolvieron 30g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Baker).

Para preparar el reactivo se mezclaron 1 mL de la solución B y 25 mL de la solución A.

Reactivo 2.

- **Solución A:** en 450 mL de agua destilada se disolvieron: 21 mL de ácido sulfúrico concentrado

(H₂SO₄) (Baker), 25g de molibdato de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) (Baker).

- **Solución B:** en 25 mL de agua destilada se disolvieron 3g de arseniato de sodio heptahidratado (NaHAsO₄·7H₂O) (Baker).

Se mezclaron lentamente y con agitación las soluciones y se aforaron a 500 mL. Posteriormente se calentó a 55°C durante 30 min.

Preparación de los reactivos para la determinación proteína por el método de Lowry

Reactivo A: Carbonato de sodio (Na₂CO₃) (Baker) al 2% en NaOH (Baker) 0.1 N

Reactivo B: Sulfato de cobre (CuSO₄) (Baker) al 1%

Reactivo C: Tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) (Baker) al 2%

Reactivo D: Reactivo de Folin (Hycel) 1:1 con agua destilada (preparado al momento de utilizarse)

LA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Anexo III

Preparación de los reactivos para electroforesis (BIO-RAD)

- 1) **Solución de acrilamida / bis T=30% y C=2.67%**, donde T se define como el contenido de acrilamida y bisacrilamida: $\%T = (\text{g acrilamida} + \text{g bisacrilamida} / \text{volumen total}) \times 100$. C se define como la relación de bisacrilamida / acrilamida: $\%C = (\text{g bisacrilamida} / \text{g acrilamida} + \text{g bisacrilamida}) \times 100$. Se pesaron 14.6 g de acrilamida y 0.4 g de N'N'-bis-metilen-acrilamida, se disolvieron en 35 mL de agua desionizada y se aforó a 50 mL.
- 2) **Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 (para el gel de separación)**. Se pesaron 18.15 g de base-Tris y se aforó a 100 mL con agua desionizada, se ajustó a pH 8.8 con HCl 6 N.
- 3) **Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 (para el gel de concentración)**. Se pesaron 6.0 g de base-Tris y se aforó a 100 mL con agua desionizada, se ajustó a pH 6.8 con HCl 6 N.
- 4) **Persulfato de amonio al 10%**. Se disolvió 0.1 g en 1 mL de agua desionizada. Este reactivo se preparó al momento de su utilización.
- 5) **Colorante azul de bromofenol**. Se mezcló 0.01 g de azul de bromofenol y 172.5 μL de NaOH (Baker) 0.1 M y se aforó a 25 mL con agua desionizada.
- 6) **Solución amortiguadora 5X, pH 8.3**. Para elaborar esta solución, se disolvieron 9.0 g de base-tris y 43.2 g de glicina, en 600 mL de agua desionizada.
Para cada corrida, se mezclaron 60 mL de la solución amortiguadora 5X con 240 mL de agua desionizada. En el caso de las corridas en las que se requirió el uso de SDS, se adicionaron 0.3 g de SDS en esta mezcla.