

ENSAYO SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES DE LA PECTINESTARASA DE LOS FRUTOS DE NARANJA

MIRIAM NUÑEZ¹, LILIANE BREUILS² Y M. SOUTY²

RESUMEN

El estudio se desarrolló con el objetivo de conocer las condiciones más adecuadas para la extracción y medición de la actividad de la enzima pectinesterasa en naranja. Para esto se utilizó pulpa de naranja madura y se ensayaron diferentes concentraciones de NaCl, utilizando como disolución extractiva a pH ácido ($\approx 4,1$) y casi neutro ($\approx 7,5$), así como varios tiempos de extracción. Además se estudió la cinética de la reacción a través de la variación de la actividad con el tiempo de reacción y se determinó la Km del extracto crudo, mediante la variación de la actividad de la enzima en función de la concentración de sustrato. Los resultados obtenidos mostraron que la desorción de la enzima se vio favorecida cuando se hizo la extracción de 4 °C, durante 20 minutos con solución de NaCl 2 %. La máxima actividad se obtuvo cuando se utilizó como sustrato pectina 1 %, aunque una actividad relativa de 87 % se alcanzó con pectina 0,5 %. La reacción resultó de orden cero hasta los 30 minutos de reacción.

INTRODUCCION

La pectinesterasa, pectinmetilesterasa o pectasa (EC 3.1.1.11), es la principal enzima péctica de los cítricos. Ella deesterifica los grupos carboxilos metilados del ácido poligalacturónico y causa la precipitación de las sales de calcio de los ácidos pectínicos (Ting y Attaway, 1971).

Lehninger (1981) plantea que para determinar cuantitativamente la actividad de una enzima es necesario conocer, entre otras, la estequiometría global de la reacción catalizada, el valor de Km para el sustrato, el pH óptimo, una zona de temperatura en que sea estable y muestre actividad elevada y un procedimiento analítico sencillo para determinar la desaparición del sustrato o la aparición de los productos de la reacción.

En el caso de los frutos cítricos, se ha establecido por varios autores que el pH óptimo oscila entre 7 y 7,5 (Hungria, 1985); sin embargo, las concentraciones de sustrato más comúnmente utilizadas han sido pectina 1 % (Ratner et al., 1969 y Nagy et al., 1985) y 0,5 % (Mac Donnell et al., 1945).

En relación con la temperatura, algunos autores utilizan 30 °C (Nagel y Patterson, 1967 y Ratner et al., 1969), mientras Nagy et al. (1985) utilizaron 22 °C. Miriam Núñez (1987) encontró que temperaturas entre 25 y 35 °C resultaron adecuadas para medir la actividad de esta enzima en frutos de lima Fersa.

Luego, con estos antecedentes y teniendo en cuenta lo importante que resulta conocer la variación de la actividad de esta enzima con la maduración del fruto, en nuestras condiciones, fue que se decidió acometer el presente trabajo, cuyo objetivo fundamental fue establecer las condiciones más adecuadas para la extracción y medición de la actividad de la pectinesterasa en frutos de naranja.

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana.

²Station de Technologie des Produits Végétaux, INRA, Avignon. Francia.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Tecnología y Bioquímica Aplicada de la Estación de Tecnología de Productos Vegetales del INRA, ubicada en Avignon, Francia. Para el mismo se utilizaron frutos maduros de naranja Valencia Late, a los cuales se les separó la pulpa, que se congeló con N_2 líquido y se trituró posteriormente, utilizando un molino de bolas. La pulpa molida se conservó congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización.

Para la extracción de la enzima se utilizó solución de NaCl en una proporción 1:10 en relación con la muestra. El pH de la extracción fue el natural de la pulpa y un pH casi neutro (7,4 - 7,6). La temperatura de extracción fue $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en todos los casos y para determinar el tiempo de extracción adecuado, se probaron tiempos de 10, 20, 30 y 60 minutos.

La cinética de la reacción se conoció siguiendo el consumo de NaOH 0,02 N con el tiempo, el cual osciló entre 5 y 50 minutos. La actividad enzimática se midió manteniendo en todos los casos el pH en 7,5 con NaOH 0,02 N durante 10 minutos, utilizando un titrmetro automático METROHM, ROUCAIRE. El sustrato empleado fue solución al 1 % de pectina RUBAN' BRUN en NaCl 0,15 N (excepto para la determinación de la K_m) y la temperatura de la reacción osciló entre 25 y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La actividad se expresa en U.P.E./g/minutos que representa los microequivalentes de ester hidrolizados por gramo de pulpa y por minuto a la temperatura seleccionada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Extracción de la enzima

Para determinar las mejores condiciones para la extracción de la enzima, se probaron diferentes concentraciones de la disolución extractiva a dos pH, así como diferentes tiempos de extracción.

Concentración de la disolución extractiva y pH de extracción

En la Figura 1 se muestra la variación de la actividad enzimática en función de la concentración de NaCl a dos pH diferentes, es decir, al pH natural de la pulpa (3,96 - 4,11) y a pH casi neutro (7,4 - 7,6). Se puede observar que hubo una respuesta favorable cuando aumentó la concentración del electrolito hasta 0,15 N, fundamentalmente cuando la extracción se hizo a pH casi neutro. No se encontraron apenas diferencias a partir de esta concentración. Con el pH ácido no hubo una variación notable de la actividad en las concentraciones ensayadas.

Estos resultados confirman los expuestos anteriormente por Mac Donnell et al. (1945); Pouse et al. (1962) y Bella Körner et al. (1980), quienes han utilizado soluciones de NaCl 0,15 N; 0,34 N (2 %) y 0,25 N, respectivamente, para extraer la enzima en frutos de naranja.

En cuanto al pH, se puso de manifiesto la ventaja de ajustar el mismo antes de proceder a la extracción de la enzima, lo que favoreció la desorción de la misma. De acuerdo con Kertsz (1955), la pectinesterasa es fuertemente adsorbida en los constituyentes celulares insolubles en agua de las plantas; por eso un medio de extracción ajustado a pH 6 ó 7 o una disolución al 10 % de NaCl o la combinación de ambos, son necesarios para obtener la enzima del tejido triturado.

Tiempo de extracción

En la Tabla I se presentan los resultados obtenidos, los cuales demuestran que la máxima actividad se obtuvo con 30 minutos de agitación. No obstante, es interesante destacar que a los 10 y 20 minutos se obtuvieron actividades relativas del 98 y 99,9 %, respectivamente, indicando que un tiempo de 20 minutos resulta adecuado para extraer la enzima a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

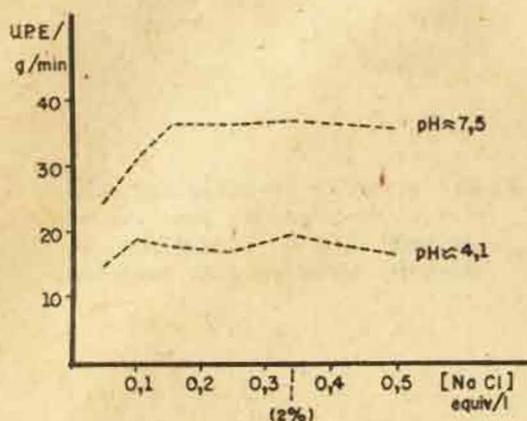


Figura 1. Variación de la actividad de la pectinesterasa con la concentración de NaCl a dos pH diferentes.

Tabla I. Variación de la actividad de la pectinesterasa en pulpa de naranja en función del tiempo de extracción.

Tiempo de extracción	UPE/ml/min.	UPE/g/min.	Actividad relativa (%)
10 min.	0,969	30,376	98,09
20 min.	0,972	30,955	99,96
30 min.	1,025	30,967	100
60 min.	0,916	28,359	91,58

Por otra parte, la actividad decayó al alargar el tiempo de extracción a 1 hora, lo cual contrasta con Bella Körner et al. (1980), quienes utilizaron un tiempo de extracción de 2 horas en pulpa de naranja. Estas diferencias en comportamiento pueden estar relacionadas con la proporción muestra: disolución extractiva, que fue de 1:10 en este trabajo, mientras que dichos autores emplearon una relación 1:1. Awad (1985), trabajando con proporciones similares a esta, utilizó un período de desorción de 10 minutos a una temperatura de 5 °C.

Los resultados obtenidos indican que la desorción de la pectinesterasa en frutos de naranja se ve favorecida cuando se utiliza una disolución extractiva de NaCl 2 % y la extracción se realiza a pH 7,5, temperatura de 4 °C durante 20 minutos.

Medición de la actividad enzimática

Partiendo del hecho de que el pH óptimo resultó 7,5 y que temperaturas entre 25 y 35 °C resultan adecuadas para medir la actividad de la enzima en los frutos cítricos (Miriam Núñez, 1987), la atención se centró en determinar la cinética de la reacción y la concentración de sustrato más adecuada para efectuar la medición.

Tiempo de reacción

Como se puede apreciar en la Figura 2, la respuesta fue lineal hasta los 30 minutos, indicando que la velocidad de la reacción durante ese intervalo de tiempo fue constante, es decir, que la reacción es de orden cero, luego resulta adecuada la selección de cualquier tiempo durante ese rango, para medir de forma cuantitativa la actividad de la enzima.

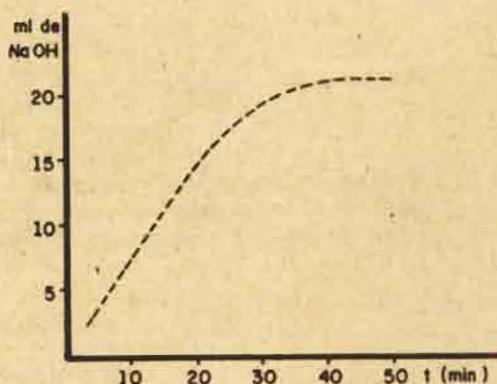


Figura 2. Variación de la actividad de la P.M.E. (expresada como volumen de NaOH 0,02 N consumidos) en función del tiempo de reacción.

Concentración óptima del sustrato

La variación de la actividad enzimática con la concentración de pectina se muestra en la Figura 3, en la cual se observa que a pesar de trabajarse con extractos crudos, se obtuvo la curva típica de saturación de la enzima ajustable a la ecuación descrita por Michaelis-Menten.

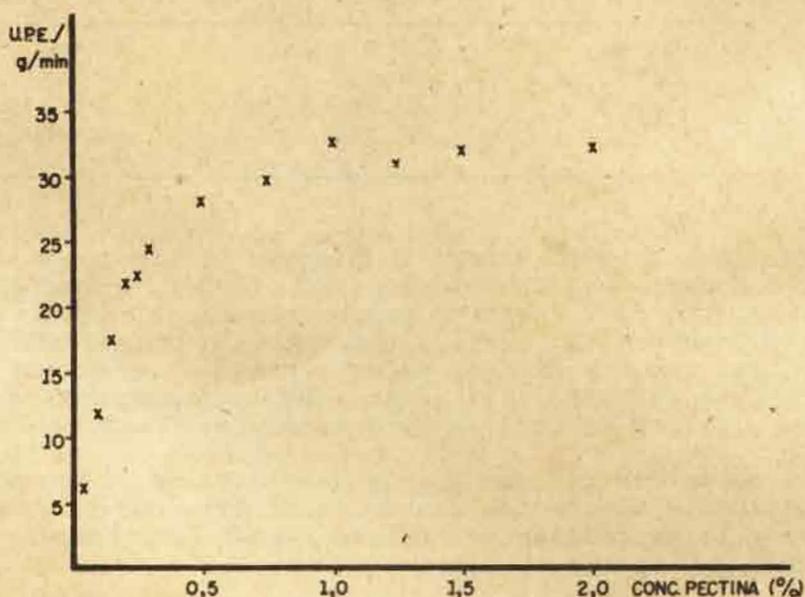


Figura 3. Variación de la actividad de la P.M.E. con la concentración de pectina.

Es de destacar que la máxima actividad se obtuvo con pectina 1 %, sin embargo el 87 % de esta actividad se alcanzó al utilizar pectina 0,5 %. Estos resultados explican el uso indistinto de una u otra concentración; así, mientras Hujjatullah (1964), Brady (1976), Robertson (1976), Pressey y Avants (1982) y Nagy et al. (1985) utilizaron pectina 1 % para medir la actividad enzimática en frutos de naranja, limón, toronja, plátano y tomate, otros autores como Pressey y Avants (1972), Dahodwala et al. (1974); Awad y Young (1980), Mc Feeters et al. (1985) y Dörreich et al. (1986) emplearon pectina 0,5 %.

Sobre la base de los datos obtenidos, se procedió al cálculo de la concentración de sustrato, en la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima (K_m), mediante los métodos de Lineweaver-Burk y Eadie-Hofstee, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.

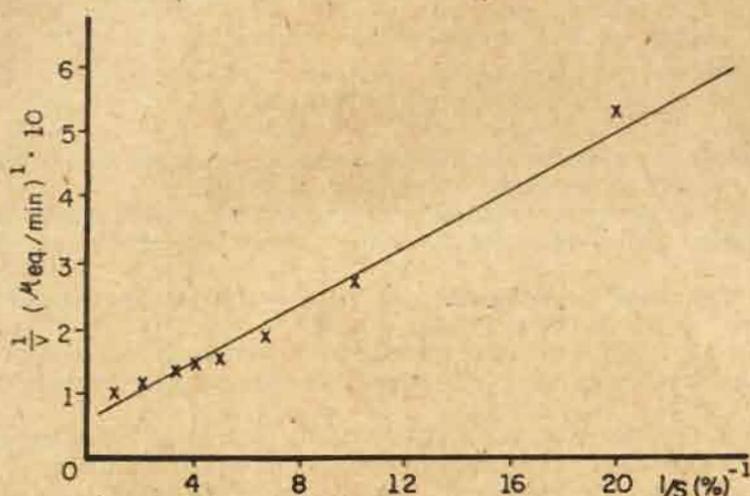
a) METODO DE LINEWEAVER - BURK

$k_m = 0,387$

$Y = 0,0576 + 0,0223 X$

$V_m = 17,36$

$r = 0,984^{**}$



b) METODO DE EADIE - HOFSTEE

$k_m = 0,1497$

$Y = 11,1019 - 0,1497 X$

$V_m = 11,10$

$r = -0,977^{**}$

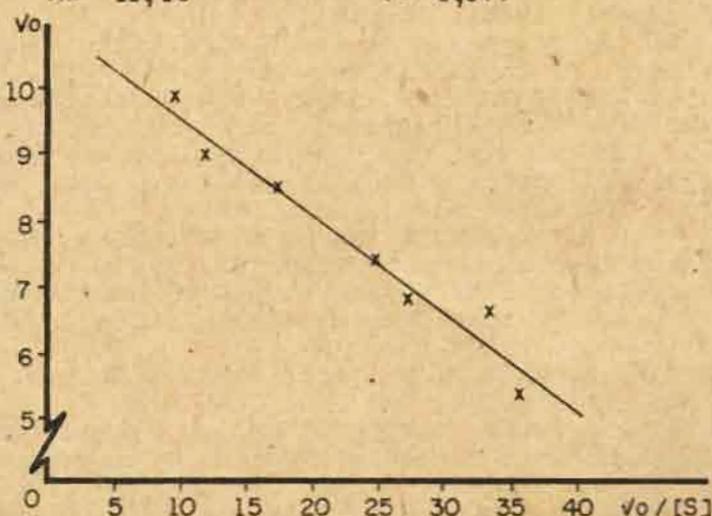


Figura 4. Cálculo de la K_m del extracto crudo de pectinesterasa en naranja, según métodos de Lineweaver-Burk y Eadie-Hofstee.

En la Figura 4 se observa el ajuste altamente significativo a la linealidad ($r = 0,98$), que se obtuvo al plotear el inverso de la velocidad contra el inverso de la concentración de sustrato.

La K_m calculada por este método fue de $0,387 \%$, casi cinco veces superior a la encontrada por Mac Donnell (1945) ($K_m = 0,08 \%$), al estudiar las propiedades de la pectinesterasa de la naranja. En el caso del otro método, la K_m obtenida fue de $0,1497$, valor similar al informado por Mac Donnell (1945), si se considera que se trabajó con el extracto crudo y no con la enzima purificada. La diferencia entre los valores de la K_m , por los dos métodos, puede atribuirse a lo planteado por Lehninger (1981), en cuanto a que el método de Eadie-Hofstee no solamente da los valores de V_{max} y de K_m en forma sencilla, sino que también amplía las desviaciones del carácter lineal, que pueden no aparecer en una representación doble recíproca.

Haciendo un análisis integral de los resultados obtenidos, se puede señalar que la actividad de la enzima pectinesterasa se vio favorecida al utilizar como sustrato una concentración de pectina 1 % en NaCl 0,15 N. Además, el tiempo de reacción puede variar entre 5 y 30 minutos en dependencia del número de muestras a medir, por lo que se seleccionó un tiempo de 10 minutos para mantener el pH en 7,5 a una temperatura de 25 - 30 °C.

REFERENCIAS

- AWAD; M. Persimmon Pectin Methylesterase: Extraction and Variation during Ripening. *J. Food Science* 50 :1 643 - 1 645, 1985.
- AWAD, M. AND R. E. YOUNG. Avocado Pectin Methylesterase Activity in Relation to Temperature, Ethylene and Ripening. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 105 :638-641, 1980.
- BRADY, C. J. The Pectinesterase of the Pulp of the Banana Fruit. *Aust. J. Plant Physiol.* 3 :163-172, 1976.
- DAHODWALA, S.; A. HUMPHREY AND M. WEIBEL. Pectic Enzymes: Individual and Concerted Kinetic Behavior of Pectinesterase and Pectinase. *J. Food Sci.* 39 :920-926, 1974.
- DORREICH, K.; H. OMVAN AND K. GIER SCHNER. Einige ergebnisse der auftrennung lines handels-pectinenzympräparates in diskrete Enzyme. II. Isolierung, reingung un charakterisierung der Pectinesterase. *Lebensm. Wiss. Technol.* 19 :464-468, 1986.
- HUJJATULLAH, S. Studies on Isolation and Purification of Pectinesterase from Wastes of the Fruit Processing Industries. *Pakistan J. Sci. Res.* 16 :94-98, 1964.
- HUNGRIA, OMIKK. Biochemical and Physiological Characteristics of Citrus Fruits, a review. Budapest, 1985. 28 p.
- KERTSZ, Z. I. Pectic Enzymes. En: Methods in Enzymology. Ed. by Sidney P. Colowich and N. O. Kaplan. New York, 1955. Vol. 1, Cap. 18.
- KORNER, BELLA; G. ZIMMERMANN Y Z. BERK. Orange Pectinesterase Purification, Properties and Effect on Cloud Stability. *J. Food Sci.* 45 :1 203 - 1 206, 1980.
- LEHNINGER, A. L. Enzimas: cinética e inhibición. En su: Bioquímica; las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da. Ed. La Habana. Editorial Pueblo y Educación, 1981. Cap. 8.
- MAC DONNELL, L. R.; E. T. JANSEN AND H. LINWEAPER. The Properties of Orange Pectinesterase. *Archiv. Biochim.* 6 :389-401, 1945.
- MC FEETERS, R. F.; H. P. FLEMING AND R. L. THOMPSON. Pectinesterase Activity, Pectin Methylation and Texture Changes during Storage of Blanched Cucumber Slices. *J. Food Sci.* 50 :201-205, 1985.
- NAGEL, C. V. AND M. E. PATTEPSON. Pectic Enzymes and Development of Pear. *J. Food Sci.* 32 (3) :294-297, 1967.
- NAGY, S.; M. MARSHALL; W. F. WARDOWSKI AND R. L. ROUSEFF. Post-harvest Increment of Robinson Tangerines as Affected by Harvest Date, Pectinesterase Activity and Calcium Content. *J. Hort. Science* 60 :137-140, 1985.
- NUÑEZ, MIRIAM. Montaje y puesta en práctica de las técnicas para la determinación de la composición bioquímica de los frutos cítricos. La Habana: INCA, 1987. (Informe de etapa 407-03-01).
- PRESSEY, R. AND J. K. AVANTS. Multiple Forms of Pectinesterase in Tomatoes. *Phytochemistry* 11 :3 139 - 3 142, 1972.
- PRESSEY, R. AND J. K. AVANTS. Pectic Enzymes in Long Keeper Tomatoes. *Hort. Science* 17 :398-400, 1982.
- RATNER, A.; R. GOREN AND S. P. MONSELISE. Activity of Pectinesterase and Cellulase in the Abscission Zone of Citrus Leaf Explants. *Plant Phys.* 44 : 1 717 - 1 723, 1969.
- ROBERTSON, G. L. Pectinesterase in New Zealand Grapefruit. *J. Sci. Food Agric.* 27 :261-265, 1976.
- ROUSE, A. H.; C. D. ATKINS AND E. L. MOORE. Seasonal Changes Occurring in the Pectinesterase Activity and Pectic Constituents of the Component Parts of Citrus Fruits. I. Valencia Oranges. *J. Food Sci.* 27 :419-425, 1962.
- TING, S. V. AND J. A. ATAWAY. Citrus Fruit. En: The Biochemistry of Fruits and Their Products. Ed. by a . Hulme. London: Academic Press, 1971. Vol. II. Cap. 3.

ABSTRACT

AN ASSAY ON SOME PECTINOESTERASE PROPERTIES OF ORANGE FRUITS

This study was aimed at finding the most adequate conditions for extracting and measuring pectinesterase enzyme activity in orange fruits. For this purpose, fruit pulp from ripened oranges was used to test different NaCl Concentrations, it being used as extractive dissolution with an acid ($\approx 4,1$) and almost neutral pH ($\approx 7,5$) as well as several extracting times. On the other hand, reaction kinetics was studied through activity variation with reaction time, besides determining Km for crude extract by means of enzymatic activity variation in relation to substrate concentration. Results have confirmed that enzymatic disorption was enhanced by the extraction with NaCl 2 %, at 4 °C for 20 minutes. The maximum activity was achieved by using pectine 1 % as a substrate; however, a relative activity of 87 % was recorded with pectine 0,5 %. Reaction got the zero order until 30 minutes.

Manuscrito recibido el 4/VII/88.