



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**



**CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**

**Hidrólisis enzimática del ácido poligalacturónico con una endopoligalacturonasa de levadura: Cinética y distribución de masas moleculares.**

**Tesis:**

***Presentada en Opción al Título Académico de  
Máster en Biotecnología: MENCIÓN INDUSTRIAL***

**Autor:**

**Lic. YUNIESKY DEL TODO MARTÍNEZ**

**Tutor:**

**Dr. C. MANUEL DE JESÚS SERRAT DÍAZ**

**SANTIAGO DE CUBA, JULIO 2012**

# Dedicatoria



## **DEDICATORIA**

*A mi Madre y a mi Novia por estar siempre atentas de mis preocupaciones y ayudarme en los momentos importantes cuando más lo necesitaba.*

*A mis tías por ayudarme en todo y complacer mis caprichos.*

*A mi hijo y mi hermano para que aprendan que las cosas se logran con inteligencia, sacrificio y perseverancia.*

# Agradecimientos



## **AGRADECIMIENTOS**

*El agradecimiento es un sentimiento puro y sincero que sale desde lo más profundo del corazón y se expresa por todas aquellas pequeñas y grandes cosas que suceden a menudo por la gracia de Dios y las dádivas de la vida. Es una virtud poder decir gracias a personas tan importantes que en el de cursar de la vida marcan una pauta y le dan colores con diferentes tonalidades a nuestra página de la vida. De esta forma quiero dejar plasmado esta frase **¡MIL GRACIAS!** a personas que brindaron apoyo incondicional y que extendieron su mano, justo en el momento que más necesitaba ayuda de las cuales tengo momentos muy agradables. Especialmente a:*

**Mi tutor Manuel Serrat**, que es la persona más importante en este trabajo, al cual respeto y admiro mucho por su elevada calidad personal, profesional y científica del cual no tengo palabras para expresar. Mostrando siempre:

- *Apoyo incondicional en incalculables y extenuantes horas de trabajo.*
- *Profesionalismo y paciencia ilimitada al transmitir sus conocimientos y experiencia investigativas.*
- *Confianza y entrega por acogerme como un hermano y más que esto como UN HIJO ADULTO, siempre emitiendo sus buenos consejos y críticas oportunas que servirán para hacer las cosas mejor en mi vida personal y profesional.*
- *Rectitud, exigencia y respeto al mostrarme que los hombres tienen carácter y deben fallar.*
- *Servidumbre, aspecto este que me ganado con mi sacrificio y esmero siempre respondiendo ¡A SUS ÓRDENES JEFE!*

**Emilia La Rubia** por su inmensa ayuda y paciencia en mis constantes molestias, siendo siempre incondicional.

**Anita** por ser mi confidente personal y mi alegría en momentos de angustias y fallas experimentales.

**Daysita** por sus valiosos y oportunos consejos en momentos que me encontraba sin solución alguna a imprevistos y problemitas.

**Miladis y Migdalia** por estar allí siempre prestas a molestarlas.

A todos los trabajadores del CEBI que siempre me sonreían dándome aliento en los momentos difíciles.

# Resumen



## **RESUMEN**

Los oligogalacturónidos se erigen como prometedoras biomoléculas para uso agrícola, en la biotecnología vegetal y en la elaboración de alimentos funcionales, debido a su potente y diversa actividad biológica, la cual depende, fundamentalmente, de su grado de polimerización. El establecimiento de condiciones óptimas para su obtención requiere del conocimiento de la cinética y modo de acción de la enzima utilizada. En este trabajo se presenta la cinética de la hidrólisis enzimática del ácido poligalacturónico (PGA) con una endopoligalacturonasa (endoPG) de levadura, así como la caracterización de la distribución de masas moleculares en el hidrolizado. Los resultados muestran que la hidrólisis transcurre a velocidad máxima hasta un 25 % de hidrólisis, disminuyendo luego progresivamente. En el hidrolizado sólo se detectan moléculas comprendidas entre los grados de polimerización 2 y 8, estando particularmente enriquecido en el tetrámero (70 % (m/m)) y empobrecido en el dímero y en las especies con talla  $\geq 6$ , al compararlo con la distribución más probable. La predicción del grado de avance de la reacción de hidrólisis del PGA con la endoPG se realizó con un error mínimo (4%), teniendo en cuenta las condiciones experimentales establecidas para la determinación de la actividad enzimática endoPG y la cuantificación de la concentración másica del PGA. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de ataque preferencial en la enzima y sientan las bases para el desarrollo de un modelo estructurado que permita predecir la cinética y distribución de masas moleculares durante la depolimerización del PGA.

# Abstract



## **ABSTRACT**

The oligogalacturonides stand as promising biomolecules for agricultural use, in plant biotechnology and the development of functional foods, due to its potent and diverse biological activity, which largely depends on its degree of polymerization. Establishing optimum conditions for their production requires the knowledge of the kinetics and mode of action of the enzyme used. This research presents the kinetics of enzymatic hydrolysis of polygalacturonic acid (PGA) with a yeast endopolygalacturonase (endoPG) as well as the characterization of the molecular weight distribution in the hydrolyzate. The results show that hydrolysis proceeds at a high speed up to 25% hydrolysis, after decreasing progressively. In the hydrolyzate are detected molecules only between the polymerization degree of 2 to 8, being particularly enriched in the tetramer (70% (w/w)), and impoverished in the dimer and in species which size  $\geq 6$ , when compared with the most probable distribution. Predicting the progress of the PGA hydrolysis reaction with endoPG was performed with minimal error (4%), taking into account the experimental conditions established for determination of enzyme activity endoPG and quantifying the mass concentration of PGA. These results suggest the existence of a preferential attack mechanism in the enzyme, and set the basis for the development of a structured model to predict the kinetics and molecular weight distribution during the depolymerization of PGA.

# Índice



<b>INDICE</b>	<b>Pág.</b>
1.- <b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
2.- <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
2.1- <b>Sustancias pécticas. Distribución en la naturaleza.</b>	<b>4</b>
2.2- <b>Composición química y función biológica.</b>	<b>4</b>
2.3- <b>Clasificación de las sustancias pécticas.</b>	<b>4</b>
2.4- <b>Obtención de pectinas. Usos.</b>	<b>6</b>
2.5- <b>Pectina como fuente de sustancias biológicamente activas.</b>	<b>6</b>
2.6- <b>Obtención de oligogalacturónidos de pectina.</b>	<b>6</b>
2.7- <b>Enzimas pécticas. Clasificación. Aplicaciones.</b>	<b>7</b>
2.8- <b>Poligalacturonasas.</b>	<b>9</b>
2.9- <b>Antecedentes sobre modelos de hidrólisis para endohidrolasas.</b>	<b>10</b>
3.- <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
3.1- <b>Determinaciones analíticas.</b>	<b>11</b>
3.2- <b>Preparación y semipurificación de la enzima.</b>	<b>11</b>
3.3- <b>Determinación de la actividad enzimática endoPG.</b>	<b>11</b>
3.4- <b>Hidrólisis enzimática del PGA.</b>	<b>12</b>
3.5- <b>Fraccionamiento del hidrolizado mediante cromatografía de filtración en gel.</b>	<b>13</b>
3.6- <b>Determinación de la distribución de pesos moleculares en el hidrolizado.</b>	<b>13</b>
3.7- <b>Análisis estadístico.</b>	<b>13</b>
4.- <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>14</b>
4.1- <b>Cinética de la hidrólisis enzimática del ácido péctico.</b>	<b>14</b>
4.2- <b>Planteamiento y análisis del modelo teórico para la distribución de pesos moleculares en el curso de la hidrólisis enzimática.</b>	<b>16</b>
4.2.1- <b>Planteamiento del modelo teórico.</b>	<b>16</b>
4.2.2- <b>Evaluación de la sensibilidad del modelo.</b>	<b>20</b>
4.2.3- <b>Estimación experimental del grado de avance de la reacción.</b>	<b>22</b>
4.3- <b>Determinación de la concentración másica del polímero.</b>	<b>23</b>
4.4- <b>Predicción del grado de avance de la reacción.</b>	<b>25</b>
4.5- <b>Fraccionamiento de la mezcla de OG presentes en el hidrolizado enzimático.</b>	<b>28</b>
4.6- <b>Distribución de pesos moleculares en el hidrolizado.</b>	<b>28</b>
5.- <b>CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
6.- <b>RECOMENDACIONES</b>	<b>33</b>
7.- <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>34</b>
8.- <b>ANEXOS</b>	

# Introducción

## 1.- INTRODUCCIÓN

Las sustancias pécticas constituyen un componente principal de las paredes celulares vegetales y desempeñan, junto a la lignina, la función de garantizar la coherencia e integridad de los tejidos, embebiendo en su estructura las microfibrillas de celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993). Están conformadas básicamente por cadenas lineales de residuos de ácido D-galacturónico, unidos por enlaces  $\alpha$ -(1→4)-glicosídicos y parcialmente esterificados con metanol (Caffall y Mohnen, 2009; Mohnen, 2008; Pérez *et al.*, 2000).

Recientemente se ha demostrado que los oligómeros de ácido poligalacturónico (PGA), componente mayoritario derivado de la pectina, con grado de polimerización entre 9 y 16 presentan actividad biológica en plantas y prometen ser de gran utilidad en la agricultura (Moscatiello *et al.*, 2006). Estos actúan como reguladores endógenos que intervienen en el desarrollo, síntesis y acción de las hormonas y estimulan la diferenciación celular de diferentes especies vegetales (Aziz *et al.*, 2004; Baldan *et al.*, 2003; Camejo *et al.*, 2010; Denoux *et al.*, 2008; Droillard *et al.*, 1997; Galleti *et al.*, 2008; Reymond *et al.*, 1996). En nuestro país, se ha evaluado exitosamente la aplicación de una mezcla de oligogalacturónidos (OG), conocida como *Pectimorf*, en varios cultivos de interés económico, así como en la micropropagación de tejidos vegetales, observándose variados efectos tales como elicitación de las respuestas defensivas de las plantas frente a patógenos, estimulación de la rizogénesis, etc. (Cabrera, 1999; González *et al.*, 2004).

También se les atribuye a los oligogalacturónidos actividad benéfica sobre las bifidobacterias (valor prebiótico) y constituyen una importante fuente de fibra dietética (Lang y Dornenburg, 2000). Otros fragmentos de la molécula de pectina han mostrado una actividad farmacológica (mitogénica) (Dongowski *et al.*, 2002; Kiyohara *et al.*, 1996; Ridley *et al.*, 2001).

La degradación natural de las sustancias pécticas tiene lugar por la acción de las enzimas pécticas o pectinasas. Estas enzimas se clasifican en esterases, que son las encargadas de desesterificar la molécula de pectina y depolimerasas, las cuales atacan la cadena principal. Estas últimas se clasifican, según su mecanismo de acción, en hidrolasas (poligalacturonasas (PG) y pectina hidrolasas) y liasas (pectina y pectato liasas) (De Vries y Visser, 2001; Sieiro *et al.*, 2012). A su vez, las depolimerasas se clasifican en exo o endo enzimas, según sea el ataque a la cadena por el extremo no reductor o al azar, respectivamente, siendo estas últimas las más importantes, ya que promueven una rápida disminución del peso molecular de la molécula de pectina con una mínima liberación de extremos reductores (De Gregorio, 2002; Fogarty y Kelly, 1983; Ribeiro, 2010).



En la obtención de oligogalacturónidos biológicamente activos es conveniente utilizar preparados enzimáticos puros de endopoligalacturonasa (endoPG), debido a su modo de ataque al azar sobre el esqueleto de homogalacturonano de la molécula de pectina. Esto trae como ventajas que se obtenga el producto con un elevado rendimiento y pureza. Investigadores del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente han obtenido resultados promisorios en el desarrollo de una tecnología para la obtención de preparados virtualmente puros de endoPG, mediante el empleo de una cepa de levadura autóctona, la *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, en un proceso concomitante con la producción de etanol (Serrat *et al.*, 2004; Serrat *et al.*, 2011; Vallejo *et al.*, 2012).

Una próxima etapa encaminada, la obtención de estas biomoléculas implicaría el desarrollo de los reactores enzimáticos apropiados (p. ej. mediante la inmovilización de la endoPG) y el establecimiento de las condiciones operacionales que permitan alcanzar los máximos rendimientos de OG de una talla determinada. Hasta el presente, esto último se ha realizado de forma empírica, para el caso de la obtención del *Pectimorf*, usando un preparado enzimático comercial de origen fúngico donde coexisten actividades endoPG y exoPG (Cabrera, 1999), lo que dificulta su generalización a la obtención de OG con otras características o cuando se emplean otros preparados enzimáticos.

La aplicación de modelos matemáticos para la descripción de los procesos de hidrólisis con endoglicohidrolasas ha sido descrita por varios autores (Carbonell *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2008; Sendra y Carbonell, 1998; Wojciechowski *et al.*, 2001). Estos modelos, de modo general, asumen el cumplimiento de la cinética de Michaelis-Menten para la reacción enzimática, suponen que la velocidad de la reacción sólo es afectada por la concentración de enlaces disponibles para la hidrólisis y su validez está limitada a grados de avance de la reacción pequeños. Estos planteamientos adolecen de no considerar la influencia del grado de polimerización (gp) del sustrato en la velocidad de la reacción, aspecto este de extrema importancia cuando se trata de la obtención de OG de pequeña talla, la cual requiere de grados de avance de la reacción elevados (>20 %).

Atendiendo a estas limitaciones, la presente investigación estuvo dirigida al estudio de la cinética de la hidrólisis enzimática del PGA con la endoPG de la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011, así como de la distribución de masas moleculares en el hidrolizado enzimático.

## **DISEÑO TEÓRICO**

### **Necesidad social.**

El tránsito hacia una agricultura orgánica y sostenible demanda del desarrollo de nuevos productos, capaces de sustituir los agroquímicos tradicionales sin



comprometer los rendimientos productivos. En tal sentido, los oligómeros del PGA, producto natural que puede obtenerse a partir de desechos agrícolas (p.ej., industrias del cítrico y el café), de conocido efecto bioestimulante y protector de los cultivos agrícolas, constituyen un elemento a considerar para la satisfacción de esta necesidad.

**Problema.**

Las endoPG hidrolizan el PGA mediante un mecanismo de ataque al azar, pero se desconoce su modo de acción sobre oligómeros de pequeño o mediano tamaño y, por tanto, la distribución de pesos moleculares en hidrolizados para grados de hidrólisis medios y avanzados.

**Hipótesis.**

Si se dispone de un modelo teórico apropiado para la distribución de pesos moleculares en hidrolizados enzimáticos de PGA, entonces la comparación de los resultados predichos por el modelo con los observados experimentalmente para las fracciones de menor grado de polimerización, permitirá establecer consideraciones acerca del modo de acción de la endoPG sobre oligómeros de pequeño y mediano tamaño.

**Objetivo general.**

Establecer consideraciones acerca de la cinética, modo de acción, sustrato y productos de la hidrólisis enzimática del PGA con la endoPG de *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011.

**Objetivos específicos.**

1. Estudiar la cinética de hidrólisis del PGA con la endoPG de *K. marxianus* CCEBI.
2. Desarrollar un modelo teórico para la distribución más probable de pesos moleculares durante la hidrólisis del PGA con una endoPG.
3. Establecer las condiciones experimentales apropiadas para la predicción del grado de avance de la reacción durante la hidrólisis enzimática del PGA con una endoPG.
4. Obtener la distribución de pesos moleculares del hidrolizado enzimático de PGA mediante cromatografía de filtración en gel.
5. Establecer consideraciones acerca del modo de acción de la endoPG de *K. marxianus* CCEBI mediante la comparación de la distribución de pesos moleculares observada con aquella predicha por el modelo de distribución más probable.

# Revisión Bibliográfica

## **2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1- Sustancias pécticas. Distribución en la naturaleza.**

Las sustancias pécticas son heteropolisacáridos complejos, de naturaleza ácida, universalmente distribuidos en el reino vegetal. Ocupan la llamada lámina media de los tejidos vegetales, embebiendo en su estructura las microfibrillas de celulosa y son las encargadas de garantizar la integridad y coherencia de tales tejidos (Carpita y Gibeaut, 1993). Son el componente principal (25-30 %) de la pared celular primaria de las dicotiledóneas, gimnospermas y monocotiledóneas no gramíneas, apareciendo en menor proporción (aproximadamente un 10 %) en las gramíneas (Ramírez y Reinaldo, 2002).

### **2.2- Composición química y función biológica.**

Químicamente, las sustancias pécticas están conformadas por dos regiones diferentes bien definidas. Las llamadas regiones “lisas” u homogalacturonano, están constituidas por una cadena lineal de residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -(1→4) glicosídicos. Las moléculas de ácido D-galacturónico pueden estar parcialmente esterificadas con metanol y ocasionalmente acetiladas por las posiciones C-2 ó C-3. Las regiones “lisas” constituyen la fracción principal de la molécula de pectina (Pérez *et al.*, 2000) y son interrumpidas a intervalos por las llamadas regiones “peludas” o ramificadas. En estas últimas se distinguen dos estructuras distintas: el xilogalacturonano, constituido por un esqueleto de galacturonano sustituido por D-xilosa y el ramnogalacturonano I (Caffall y Mohnen, 2009; Mohnen, 2008).

En el ramnogalacturonano I alternan residuos de ácido D-galacturónico con residuos de l-ramnosa, unidos por enlaces  $\alpha$ -(1→2)-glicosídicos. A su vez, las moléculas de l-ramnosa pueden estar sustituidas en la posición C-5 por cadenas laterales, altamente ramificadas, ricas en l-arabinosa (poliarabinano) o cadenas lineales ricas en D-galactosa (poligalactano) (Caffall y Mohnen, 2009; Rombouts y Pilnik, 1989). Las cadenas de arabinanosa están conformadas por una cadena principal de residuos de l-arabinosa unidos por enlaces  $\alpha$ -(1→5)-glicosídicos, los que pueden estar sustituidos en C-3 por cadenas de l-arabinosa. (Caffall y Mohnen, 2009; Mohnen, 2008).

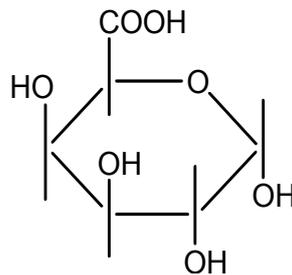
### **2.3- Clasificación de las sustancias pécticas.**

Las sustancias pécticas han sido clasificadas por la American Chemical Society (USA) en protopectinas, ácidos pectínicos (pectinas) y ácidos pécticos (pectatos). Las primeras son insolubles en agua y probablemente se trate de moléculas de pectina altamente entrecruzadas con la matriz de celulosa y hemicelulosa mediante enlaces covalentes, mientras que las dos últimas son

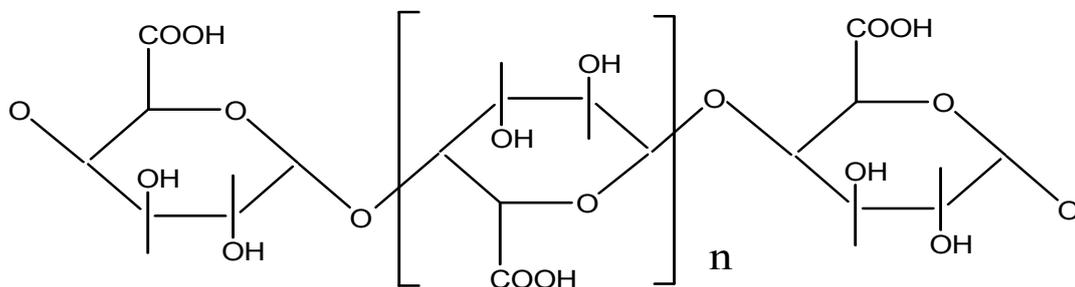
completa o parcialmente solubles en agua. Atendiendo al grado de esterificación (GE) las pectinas se clasifican como de bajo metoxilo (LM), si GE es inferior o igual al 50 % y de alto metoxilo (HM) si GE es superior al 50 % (Serra *et al.*, 1992; Sieiro *et al.*, 2012).

Las sustancias pécticas varían considerablemente en cuanto a su masa molecular, GE y contenido de azúcares neutros dependiendo de la fuente de origen y del estado de maduración del fruto. Sus pesos moleculares se encuentran entre los 25000 y 360000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , en tanto el GE puede variar entre el 30 y 95 % (Caffall y Mohnen, 2009; Mohnen, 2008; Serra *et al.*, 1992; Sieiro *et al.*, 2012).

El PGA es un derivado de la pectina consistente en fragmentos puros de homogalacturonano desesterificados, con un GE inferior al 10 %. Está constituido sólo de unidades de ácido anhidrogalacturónico unidos mediante enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glicosídicos. De los tres isómeros de los ácidos galacturónicos (D, L y D-L) sólo la forma D se ha encontrado en productos naturales. En las Figuras No. 1 y 2 se muestran las estructuras del PGA y del ácido galacturónico, su unidad constitutiva.



**Figura No. 1. Proyección de Howarth del ácido D-galacturónico.**



**Figura No. 2. Estructura simplificada del ácido poligalacturónico (Kertesz, 1964).**

#### **2.4- Obtención de pectinas. Usos.**

Las pectinas se obtienen de materiales vegetales que tienen un alto contenido de éstas, tales como manzana, café y algunos cítricos, como el limón, toronja y lima; (Herbstreith, 2001). Las pectinas, en la actualidad, son ingredientes muy importantes en la industria de los alimentos, donde son usadas para hacer gelatinas, helados, salsas. También se emplean en otras industrias, como la farmacéutica, que requieren modificar la viscosidad de sus productos (Alkorta *et al.*, 1998; Sieiro *et al.*, 2012).

#### **2.5- Pectina como fuente de sustancias biológicamente activas.**

Los OG con gp entre 9 y 16 han mostrado ser los más potentes inductores de respuestas defensivas (Aziz *et al.*, 2004; Camejo *et al.*, 2010; Darvill *et al.*, 1992; Denoux *et al.*, 2008; Falasca *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2004; Navazio *et al.*, 2002; Van Cursem y Messiaen, 1994). No obstante, los OG pequeños también pueden generar respuestas defensivas en plantas. Por ejemplo, en la papa, donde los oligogalacturónidos con gp entre 2-4 inducen la resistencia contra *Erwinia carotovora*, en tanto aquellos con gp menor que 8 pueden provocar la muerte de las células vegetales durante el decaimiento del tejido inducido por *E. carotovora* en esta planta (Weber *et al.*, 1996). Además, se ha comprobado experimentalmente que pueden sustituir parcial o totalmente las hormonas tradicionales de los esquemas de micropropagación de diferentes cultivos (Cabrera, 1999).

Por otro lado, a los OG se les atribuye actividad benéfica sobre las bifidobacterias (valor prebiótico) y constituyen una importante fuente de fibra dietética. En este sentido, se usan como aditivos alimentarios en la producción de alimentos infantiles. (Dongowski *et al.*, 2002; Lang y Dörnenburg, 2000). Tienen también aplicaciones como biorremediadores en el tratamiento de terrenos contaminados por metales pesados, debido a que poseen la propiedad de reaccionar y formar complejos estables con estos metales. Estos agentes de quelación orgánicos se combinan con los iones metálicos del suelo, como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ , en una relación estequiométrica metal-ligando 1:1, facilitando su solubilidad y transporte y disminuyendo su toxicidad (Cartaya y Reynaldo, 2005).

#### **2.6- Obtención de oligogalacturónidos de pectina.**

En Cuba, el procesamiento de los frutos cítricos genera un gran volumen de residuos que constituye la fuente más preciada, a nivel internacional, para la preparación de la pectina de alta calidad (Cabrera, 1999; Sieiro *et al.*, 2012).

El diseño de una estrategia adecuada para la preparación de OG a partir de pectina comercial cubana requiere de un conocimiento de la composición de los

polisacáridos pécticos en este producto (Cabrera, 1999). La hidrólisis enzimática constituye la vía más adecuada para obtener OG a partir de pectina. (Bélafi-Bakó *et al.*, 2007; Coté y Hahn, 1994). Los métodos químicos para la obtención de oligogalacturónidos no son idóneos debido a que son costosos por los reactivos, agresivos para el medio ambiente y se obtienen bajos rendimientos.

La acción de las enzimas endoPG sobre los polisacáridos pécticos ocurre paulatinamente, liberándose en el transcurso de la reacción fragmentos pécticos y OG, los cuales pueden ser degradados a tri, di o monogalacturónidos en dependencia de las condiciones de la reacción y del modo de acción de las enzimas utilizadas (Thibault, 1983). Este comportamiento condiciona la necesidad de estudiar el modo de acción de las enzimas utilizadas para la hidrólisis y de seleccionar las condiciones de reacción adecuadas para obtener una alta proporción de los OG de interés en la mezcla de reacción. Dado el amplio espectro de actividad biológica de estos, las posibilidades de su preparación a partir de desechos de la actividad citrícola y cafetalera, constituyen alternativas promisorias dentro de los conceptos contemporáneos de una agricultura ecológica y auto-sustentable.

Cabrera (1999) obtuvo OG mediante hidrólisis enzimática con una enzima comercial (Pectinex Ultra Spl, Novo Enzyme A/S, USA). Esta enzima comercial de origen fúngico tiene la desventaja de ser una mezcla de varias pectinasas lo cual hace muy engorroso trabajar con ellas, debido a la variedad de subproductos indeseados que se acumulan en el medio de reacción. El estudio de la cinética de hidrólisis se basó en el seguimiento de la disminución de la viscosidad de la mezcla de reacción en el tiempo y posterior análisis cromatográfico de los productos de hidrólisis (Cabrera, 1999). En este trabajo no se utilizó ningún modelo matemático para simular la hidrólisis enzimática dirigida a la obtención de estos oligogalacturónidos biológicamente activos.

### **2.7- Enzimas pécticas. Clasificación. Aplicaciones.**

Las enzimas que participan en la degradación natural de la pectina se agrupan bajo el nombre genérico de enzimas pécticas o pectinasas. Las más conocidas y estudiadas de estas enzimas son aquellas que actúan sobre las regiones lisas, las cuales han sido clasificadas por la *Enzyme Commission* (E.C.) de la IUPAC-IUB según se muestra en la Tabla No. 1. Las enzimas pécticas se encuentran de manera natural en frutas y vegetales, siendo también producidas por microorganismos fitopatógenos, bacterias, levaduras y hongos. Estas enzimas juegan un importante rol en la naturaleza, en la maduración de los frutos, abscisión de hojas y patogénesis de plantas (Pariza y Foster, 1983).

Por su forma de atacar al sustrato, se dividen en dos grupos principales: esterasas y depolimerasas.

**Esterasas:** Se describe solamente a la pectina esterasa (E.C. 3.1.1.11), la cual degrada los enlaces metiléster del C-6 de las unidades de ácido metilgalacturónico de la pectina, reduciendo el contenido de metóxilo de las sustancias pécticas, al tiempo que se produce metanol y ácido anhidrogalacturónico:

**Depolimerasas:** Atacan las uniones glicosídicas  $\alpha$ -(1→4) de las sustancias pécticas. Esta despolimerización puede ser a través de un mecanismo de hidrólisis, promovido por las poligalacturonasas, o de  $\beta$ -eliminación, catalizado por las liasas.

**Tabla No. 1. Clasificación de las enzimas pécticas.**

Nombre recomendado (Según E.C.)	Nombre habitual	Sustrato	Enlace afectado
<b>Enzimas desesterificantes</b>			
Polimetilgalacturonato esterasa	Pectina esterasa	Pectina	Al azar
<b>Enzimas depolimerizantes</b>			
<b>❖ Hidrolasas</b>			
Endopoligalacturonasa	Poligalacturonasa	Pectato	Al azar
Exopoligalacturonasa 1	Poligalacturonasa	Pectato	Último de la cadena
Exopoligalacturonasa 2	Poligalacturonasa	Pectato	Penúltimo de la cadena
Endopolimetilgalacturonasa	Pectina hidrolasa	Pectina	Al azar
Exopolimetilgalacturonasa	Pectina hidrolasa	Pectina	Último de la cadena
<b>❖ Liasas</b>			
Endopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	Pectato	Al azar
Exopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	Pectato	Penúltimo de la cadena
Endopolimetilgalacturonato liasa	Pectina liasa	Pectina	Al azar
Exopolimetilgalacturonato liasa	Pectina liasa	Pectina	Último de la cadena

E.C.: *Enzyme Commission* (IUPAC-IUB). Fuente: Serra *et al.*, 1992. Sieiro *et al.*, 2012.

**Poligalacturonasas:** Se clasifican en endopoligalacturonasas (E.C. 3.2.1.15) y exopoligalacturonasas (E.C. 3.2.1.67). Las exo-enzimas atacan el extremo no reductor de las moléculas de pectina y ácidos poligalacturónicos; como

resultado de la hidrólisis se produce ácido galacturónico. Las endo-enzimas actúan de una forma aleatoria, fundamentalmente en el interior de la cadena, provocando la fragmentación de los sustratos (las pectinas y ácidos poligalacturónicos) y por consiguiente causando disminución de la viscosidad en soluciones de sustancias pécticas. Este tipo de enzimas (endo) por su acción catalítica presentan una mayor aplicación en la industria de alimentos y bebidas (Fogarty y Kelly, 1983).

**Liasas:** Están dentro del grupo de las depolimerasas. Catalizan la formación de un doble enlace entre los carbonos C-4 y C-5, mediante un mecanismo de transeeliminación ( $\beta$ -eliminación). Las liasas que atacan a la pectina se llaman endo-polimetilgalacturonato liasas (endo-PMGL) o endo-pectinaliasa, exopolimetilgalacturonato liasa (exo-PMGL) o exopectina liasa y a las liasas que actúan sobre los ácidos poligalacturónicos se les denominan endopoligalacturonato liasa (endo-PGL) o endopectato liasa, exopoligalacturonato liasa (exo-PGL) o exopectato liasa (Fogarty y Kelly, 1983; Sieiro *et al.*, 2012).

Estas enzimas son usadas para la producción de azúcares fermentables a partir de la biomasa de plantas, para la extracción, clarificación y despectinización de zumos de frutas (incluido el mosto de uvas); maceración de frutas, vegetales y extracciones de azúcares (Brown, 1981; de Gregorio *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2002; Fernández-González *et al.*, 2004; Fogarty y Kelly, 1983; Grassin *et al.*, 1996; Hoondal *et al.*, 2002; Iconomou *et al.*, 2010; Kashyap *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2010; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006; Rombouts, 1989; Sarioglu *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2003).

Nuevas y prometedoras aplicaciones de las enzimas pécticas están relacionados con la obtención de hidrolizados y fragmentos de pectinas con actividad biológica (Serrat *et al.*, 2004).

### **2.8- Poligalacturonasas.**

Las poligalacturonasas son enzimas que hidrolizan el esqueleto no metilado del homogalacturonano, mediante el ataque a los enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídicos que unen a las unidades de ácido D-galacturónico. Según Aguilar y Huitron (1993), esta enzima puede hidrolizar cualquier enlace de la cadena y producir oligómeros de ácido galacturónico de diferente tamaño. Las poligalacturonasas se caracterizan por su acción depolimerizante sobre el PGA y las pectinas de bajo grado de metoxilación (Voragen *et al.*, 1995).

Las poligalacturonasas son la clase más abundante y estudiada de enzimas pécticas, encontrándose ampliamente distribuidas en plantas y microorganismos. A estas enzimas se les atribuye numerosas funciones en plantas. Se considera que están asociados a los procesos de abscisión de

órganos (Bonghi *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1994), maduración de los granos de polen y crecimiento del tubo polínico (Pressey, 1996) y a la maduración y deterioro de frutos (Rose *et al.*, 1998). Al parecer, las poligalacturonasas también están involucradas en los procesos de crecimiento (Sitrit *et al.*, 1996) y en los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos (Bergey *et al.*, 1999; D'Ovidio *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2003; Schacht *et al.*, 2011). Otra función recientemente atribuida es su participación en los procesos de simbiosis planta-microorganismo, como se ha reportado para el par *Rhizobium-legumbre* (Muñoz *et al.*, 1998).

En la Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, se ha informado que una levadura de la especie *Kluyveromyces marxianus*, aislada de los residuales del beneficio húmedo del café, presentan una alta actividad endoPG extracelular, siendo esta la proteína mayoritaria en el medio de cultivo (Serrat *et al.*, 2002).

### **2.9- Antecedentes sobre modelos de hidrólisis para endohidrolasas.**

En la actualidad se encuentran publicados diversos modelos para describir la degradación enzimática de polímeros naturales. Sendra *et al.* (1998) diseñaron un programa de cómputo que simula la depolimerización en tiempo "real" para una muestra polidispersa de almidón por una endoenzima específica. Mahammad *et al.* (2006) propusieron un modelo matemático basado en la cinética de Michaelis-Menten y desarrollado para predecir los cambios en la distribución de pesos moleculares durante la depolimerización enzimática de la goma galactomanana. La cinética total de la reacción enzimática puede ser representada en términos de parámetros cinéticos que son función de los parámetros de Michaelis-Menten para enlaces individuales. La depolimerización se asume que sigue un mecanismo aleatorio de escisión de los enlaces, en el cual la enzima ataca al sustrato de forma también aleatoria provocando una sola ruptura de enlace cada vez.

Todos estos modelos presentan el inconveniente de ser complejos, debido a que requieren del conocimiento de los parámetros cinéticos del sistema enzima-sustrato, pero tienen la ventaja de que pueden describir la cinética del proceso para condiciones de sustrato no saturante, donde la reacción deja de ser de orden cero. Recientemente Nikolic' y Mojovic (2007) describen la hidrólisis enzimática de la pectina de manzana controlando como parámetro principal el incremento de grupos terminales y la disminución de la viscosidad relativa. Otro modelo, desarrollado por Hunt *et al.* (2006) se basa exclusivamente en la arquitectura del subemplazamiento de la enzima y las energías de enlace concomitantes. Esto posibilita la predicción de la evolución de las cantidades relativas de productos durante la digestión de mezclas arbitrarias de sustratos oligoméricos y poliméricos.

# Materialiales y Métodos

### **3.- MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1- Determinaciones analíticas.**

El contenido de extremos reductores en el PGA y sus hidrolizados se determinó por el método colorimétrico de Somogyi-Nelson (Nelson, 1957; Somogyi, 1952), mientras que la concentración másica en las soluciones de PGA, en los hidrolizados de PGA y en las fracciones cromatográficas se determinó colorimétricamente mediante el ensayo colorimétrico del Carbazol (Bitter y Muir, 1962; Dekker y Richards, 1972). En ambos ensayos se utilizó como estándar ácido galacturónico (Sigma) en el rango de 20-100  $\mu\text{g/mL}$  (mediciones realizadas en un Espectrofotómetro UV-Visible RAYLEIGHT, China). Las curvas de calibración utilizadas en ambos métodos y su correspondiente análisis pueden verse en los Anexos 2 (Carbazol) y 3 (Somogyi-Nelson).

Para el caso de las soluciones de PGA, su concentración másica también fue determinada potenciométricamente (Potenciómetro Consort, CS, 61, Alemania). Para ello, el PGA se precipitó cuantitativamente con un exceso de HCl 1 mol/L y se valoró potenciométricamente con NaOH 0,02 mol/L. El primer salto de pH corresponde al exceso de HCl y el segundo a los grupos carboxilos del PGA.

#### **3.2- Preparación y semipurificación de la enzima.**

El crudo enzimático de endoPG se obtuvo a partir de un cultivo microaerófilo de la cepa de levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 (Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba) en medio extracto de levadura-glucosa, según describen Serrat *et al.* (2004). Una vez centrifugado (Centrifuga Refrigerada HEAL FORCE®, Neofuge 15, China), el cultivo durante 2 minutos para separar la biomasa, se filtró el sobrenadante a través de un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA). Del filtrado se tomaron 5 mL, se incubaron en hielo durante 10 minutos y se precipitó la enzima mediante la adición de etanol helado para una concentración del 75 % (v/v). Se centrifugó durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol absoluto y por último se disolvió en 5 mL de buffer acetato 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 5 (Agitador Magnético, IKA®-NERKE B-16, Alemania). Se conservó en refrigeración a 4 °C (Refrigerador, Antillano, Cuba).

#### **3.3- Determinación de la actividad enzimática endoPG.**

Se siguió el procedimiento descrito por Serrat *et al.* (2002). Para ello, se utilizó como sustrato ácido poligalacturónico (sal sódica; Sigma, St. Louis, MO) al 0,5 % (m/v) en buffer acetato de sodio, 50 mM, pH 5,0. La actividad enzimática se estimó de la pendiente de la recta de regresión de la concentración de extremos

reductores frente al tiempo de reacción. El incremento en el poder reductor del sustrato se evaluó mediante el método de Somogyi (1952) según la modificación desarrollada por Nelson (1957). La mezcla de reacción estuvo conformada por 400  $\mu\text{L}$  de sustrato y 100  $\mu\text{L}$  de una dilución apropiada de la enzima en agua destilada. Una unidad de actividad endoPG se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  de extremos reductores (expresados como ácido galacturónico) bajo estas condiciones.

### **3.4- Hidrólisis enzimática del PGA.**

Se utilizó como sustrato ácido péctico a una concentración de 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en buffer acetato 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 5). La reacción se efectuó en un matraz de 500 mL de capacidad, provisto de tapa esmerilada y esterilizado (Autoclave Vertical, BK-75, URSS), al cual se le añadió 200 mL del sustrato (previamente esterilizado por filtración) y la cantidad requerida de enzima para obtener una actividad de 0,2 U/mL en la mezcla de reacción, ambos preincubados a 37 °C durante 15 minutos (Baño de María, MLW, Alemania y Termostato, MLW, Alemania). La reacción enzimática se desarrolló en reposo a 37 °C. Se tomaron muestras de la mezcla de reacción (5 mL) a diferentes intervalos de tiempo, bajo condiciones de asepsia. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición sucesiva 1/10 volumen de hidróxido de sodio 0,2 mol/L y 1/10 volumen de tampón fosfato 100 mM (pH 7,5), incubándose durante 10 minutos a 100 °C para la inactivación de la enzima y se guardaron en congelación (-20 °C) para la posterior determinación del contenido de azúcares reductores, según el método de Somogyi-Nelson (1952-1957).

Cuando se prepararon hidrolizados para un grado de hidrólisis específico (2-22 %), se utilizó un volumen de sustrato de 2 mL y se ajustó la actividad enzimática en la mezcla de reacción según los requerimientos del experimento (0,01-1 U/mL). El tiempo de reacción (Cronómetro, España) se fijó para tener el grado de avance de la reacción deseado, según la Ecuación (1) (Dumé, 2007). La reacción se detuvo del mismo modo descrito en el párrafo anterior.

$$t = \frac{p \cdot C_m}{A \cdot M_1} \quad (1)$$

Donde  $t$  es el tiempo de reacción, en minutos;  $p$  el grado de avance de la reacción;  $C_m$  la concentración másica del PGA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  $A$  la actividad enzimática en la mezcla de reacción (U/mL) y  $M_1$  la masa molar de la unidad repetida en el PGA (176,2  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ).

### **3.5- Fraccionamiento del hidrolizado mediante cromatografía de filtración en gel.**

A una columna de Sephadex G-75 (Pharmacia, Suecia) de (17×1) cm, previamente equilibrada con buffer acetato de sodio 50 mmol·L<sup>-1</sup> (pH 5), se le aplicaron 500 µL del hidrolizado correspondiente al final de la reacción enzimática (Gradientador, PHARMACIA EMC-01, Suecia) y se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 5 mL·h<sup>-1</sup> (Bomba Peristáltica, LKB 2132 MICRPERPEX, USA). Se colectaron fracciones de 0,5 mL hasta alcanzar un volumen total de la columna (Colector de fracciones, LKB 2212 HELRAC, USA).

### **3.6- Determinación de la distribución de pesos moleculares en el hidrolizado.**

A cada una de las fracciones de la cromatografía de filtración en gel se les determinó la concentración másica de ácidos urónicos según el método del Carbazol y la concentración de extremos reductores (expresada como concentración másica de ácido anhidrogalacturónico) según el método de Somogyi-Nelson, utilizando en ambos casos ácido galácturónico (Sigma) como estándar. El gp promedio en número ( $X_n$ ) y la fracción en peso ( $W_i$ ) correspondientes a cada una de las fracciones se calcularon según:

$$X_n = \frac{\text{concentrac ión másica de ácidos urónicos } (\mu\text{g/mL})}{\text{concentrac ión de extremos reductores } (\mu\text{g/mL})} \quad (2)$$

$$W_i = \frac{c_i \cdot V_f}{c_o \cdot V_h} \quad (3)$$

Donde  $c_i$  corresponde a las concentraciones másicas de ácidos urónicos en cada una de las fracciones;  $V_f$  es el volumen de la fracción;  $c_o$ , la concentración másica del polímero en la mezcla de reacción y  $V_h$  el volumen de hidrolizado aplicado a la columna.

### **3.7- Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó con ayuda del paquete estadístico especializado Statgraphics Centurion XV (Stat Point, Inc., USA) y el Microsoft Excel (Microsoft, USA). Se realizaron análisis de regresión lineal simple, comparación de rectas de regresión y análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA I). Cuando fue necesario se utilizó la prueba de rangos múltiples de DUNCAN para la comparación de medias. Los datos se presentan como el valor de la media  $\pm$  desviación estándar. El error acumulativo en las magnitudes calculadas se estimó como el error máximo, aplicando la teoría general de errores según se describe en Alzola (1983).

# Resultados y Discusión

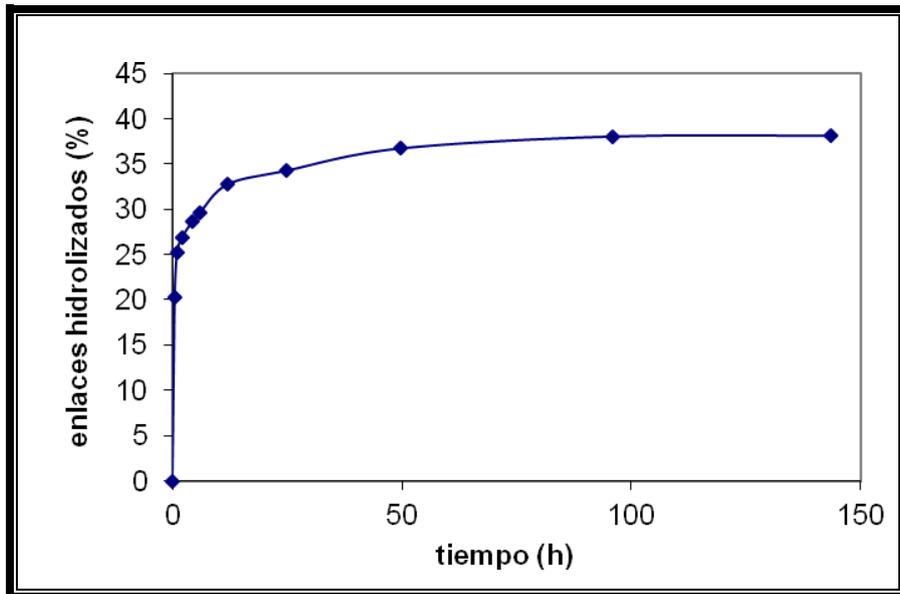
## **4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1- Cinética de la hidrólisis enzimática del ácido péctico.**

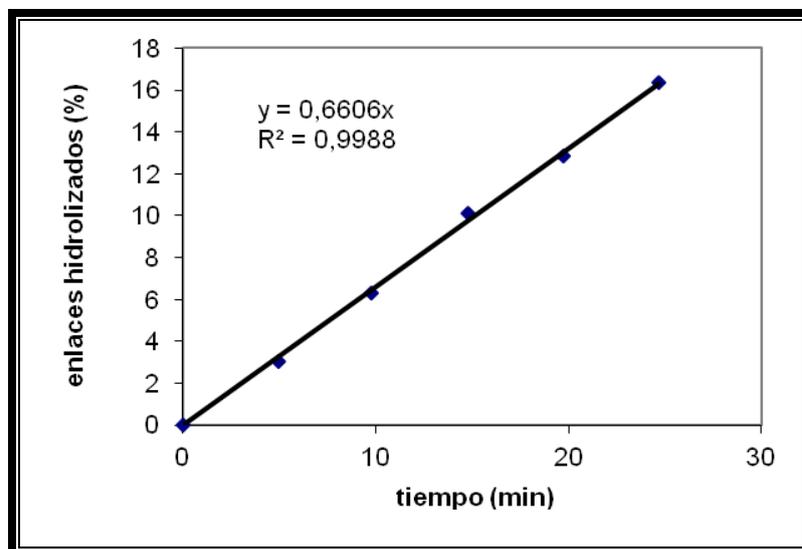
Como puede observarse en la Figura No. 3, la reacción transcurre muy rápidamente durante la primera hora, alcanzándose un 25 % de hidrólisis, disminuyendo luego la velocidad de forma moderada hasta alcanzarse el 33 % de hidrólisis, momento a partir del cual la reacción procede con extrema lentitud, cesando cuando aproximadamente el 38 % de los enlaces han sido escindidos. Aunque la forma hiperbólica de la curva y la presencia de tres fases es coincidente con lo reportado por Luh y Phaff (1954) para la poligalacturonasa de *Saccharomyces fragilis*, existen diferencias en cuanto al inicio, duración de estas fases y a la terminación de la reacción enzimática.

De estos resultados puede inferirse que para fragmentos pécticos con  $gp > 4$  (lo que corresponde a un 25 % de hidrólisis), la reacción transcurre a su máxima velocidad, disminuyendo considerablemente la eficiencia catalítica a partir de este momento, para llegar a ser especialmente lenta cuando el  $gp \approx 3$ . La disminución de la velocidad de reacción no puede ser atribuida a la pérdida de actividad enzimática en el curso de la reacción, ya que no fueron observados cambios apreciables de actividad bajo estas condiciones en 14 días (dato no mostrado).

Teniendo en cuenta que los OG de mayor interés como bioestimulantes en la agricultura corresponden a fracciones cuyo  $gp$  se encuentra entre 9 y 16, lo que representa un grado de hidrólisis del 6-11 %, se estudió el comportamiento de la reacción para esta etapa, la cual tuvo lugar en los primeros 30 minutos. Resulta de gran interés el hecho de que el grado de hidrólisis se incrementó linealmente en el tiempo, o sea, que la reacción transcurre a velocidad constante y máxima durante toda la etapa ( $V_m = 0,2 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ ), en la cual se alcanza un grado de hidrólisis del 25 % (observe la Figura No. 4). Este valor de  $V_m$  corresponde con el de la actividad enzimática estimado para el ensayo (0,2 U/mL). El comportamiento observado nos permite predecir con facilidad el tiempo de reacción necesario para alcanzar un  $gp$  promedio deseado, lo que resulta muy conveniente desde el punto de vista práctico. Por otro lado, sugiere que la actividad de la enzima es prácticamente independiente del  $gp$  promedio del sustrato hasta  $gp = 4$ , o sea, que se trata de una enzima con características de oligohidrolasa.



**Figura No. 3. Cinética de la hidrólisis enzimática del ácido péctico. Actividad poligalacturonasa: 0,2 U/mL, concentración de ácido péctico: 20 g/L.**



**Figura No. 4. Cinética de la hidrólisis enzimática del ácido péctico. Etapa lineal rápida de la reacción. Actividad poligalacturonasa: 0,2 U/mL, concentración de ácido péctico: 20 g/L.**

#### **4.2- Planteamiento y análisis del modelo teórico para la distribución de pesos moleculares en el curso de la hidrólisis enzimática.**

La hidrólisis de un polímero catalizada por una endohidrolasa conduce a la formación de una mezcla productos de hidrólisis de diferente grado de polimerización, los cuales se van acumulando de diferente manera, de acuerdo con el modo de acción de la enzima (Sendra y Carbonell, 1998). Es por ello, que abordar el estudio cinético de estas reacciones entraña gran complejidad debido a que, en principio, para cada especie molecular hay una velocidad específica determinada. En este sentido, la utilización de modelos que nos permitan describir la composición de la mezcla de reacción resulta de gran importancia.

##### **4.2.1- Planteamiento del modelo teórico.**

El grado de avance de la reacción es un parámetro que describe la cinética de una reacción, y se refiere a la fracción molar de los reaccionantes que se han transformado en producto.

Para el caso particular de la reacción de hidrólisis de un polímero de condensación, como es el caso del PGA, este puede expresarse como:

$$p = \frac{Eh}{Eo} \quad (4)$$

Donde **p** es el grado de avance de la reacción; **Eh**, el número de enlaces hidrolizados y **Eo**, el número total de enlaces disponibles para la hidrólisis al inicio de la reacción.

**Eo** puede calcularse si se conocen el número de moléculas al inicio de la reacción (**No**) y su grado de polimerización promedio (**Xo**), según la siguiente expresión:

$$Eo = (Xo - 1) \cdot No \quad (5)$$

Como por cada enlace hidrolizado se forma una nueva molécula, entonces el número de enlaces hidrolizados (**Eh**) va a ser igual al incremento del número de moléculas en la mezcla de reacción, dado por:

$$Eh = N - No \quad (6)$$

Donde **N** corresponde al número de moléculas a un tiempo de reacción **t**.

Sustituyendo en la Ecuación (4) **Eh** y **Eo** por las expresiones (5) y (6), respectivamente, tenemos:



$$p = \frac{N - N_0}{N_0(X_0 - 1)} \quad (7)$$

El número de unidades monoméricas existentes en cualquier instante es  **$N_0 X_0$** . Al inicio de la reacción ( **$t=0$** ), la probabilidad ( **$P(0)$** ) de que una unidad monomérica no se encuentre enlazada por su grupo hidroxilo hemiacetalico será igual a la razón entre el número de moléculas existentes a  **$t=0$**  y el número de unidades monoméricas totales:

$$P(0) = \frac{N_0}{N_0 X_0} = \frac{1}{X_0} \quad (8)$$

Dicha probabilidad a un instante de tiempo  **$t$**  cualquiera ( **$P(t)$** ) será igual a:

$$P(t) = \frac{N}{N_0 X_0} \quad (9)$$

Si denotamos dicha probabilidad como  **$P$**  simplemente y la expresamos en función del avance de la reacción, despejando  **$N$**  de la Ecuación (7), tenemos:

$$P = \frac{1 + p(X_0 - 1)}{X_0} \quad (10)$$

Como la hidrólisis transcurre al azar, entonces  **$p$**  también va a ser igual a la probabilidad de que un enlace haya sido hidrolizado, de modo que  **$P$**  será proporcional al avance de la reacción.

En tanto,  **$1-P$**  será la probabilidad de que una unidad monomérica se encuentre enlazada por su grupo hidroxilo hemiacetalico a un instante dado de la reacción enzimática.

En una especie molecular dada, de grado de polimerización  **$X$** , estarán presentes  **$X-1$**  enlaces sin hidrolizar, cuya probabilidad de existencia será:

$$(1-P)^{X-1}$$

Pero para que esta especie exista, se requiere que una de sus unidades monoméricas no se encuentra enlazada por su extremo reductor, cuya probabilidad de existencia es  **$P$** ; por tanto, la probabilidad de tener una especie de tamaño  **$X$**  en la mezcla de reacción vendrá dada por:

$$n_x = (1 - P)^{X-1} \cdot P \quad (11)$$

Donde  $n_x$ , será la probabilidad de encontrar una especie de tamaño  $X$  en la mezcla de reacción, la que a su vez será igual a su fracción molar.

En la práctica resulta más conveniente conocer la fracción en peso, en lugar de la fracción molar. La fracción en peso de una especie de tamaño " $X$ " vendrá dada por:

$$W_x = \frac{m_x}{m_o} \quad (12)$$

Donde  $W_x$  es la fracción en peso de la especie de tamaño " $X$ ";  $m_x$ , será igual a la masa de la especie de tamaño de " $X$ " y  $m_o$ , la masa total del polímero en la mezcla de reacción. Las magnitudes  $m_o$  y  $m_x$  pueden expresarse en función del número de moléculas y de su grado de polimerización:

$$m_o = N_o \cdot X_o \cdot M_1 \quad (13)$$

$$m_x = N_x \cdot X \cdot M_1 \quad (14)$$

Siendo  $M_1$  la masa molecular de la unidad repetida y  $N_x$  el número de moléculas de tamaño " $X$ " en la mezcla de reacción.

Sustituyendo las expresiones para  $m_x$  y  $m_o$  en la Ecuación (12), obtenemos:

$$W_x = \frac{N_x \cdot X}{N_o \cdot X_o} \quad (15)$$

Como por definición,  $n_x$  (fracción molar) viene dada por:

$$n_x = \frac{N_x}{N} \quad (16)$$

Donde  $N$  es el número total de moléculas en la mezcla de reacción, entonces nos queda que:

$$N_x = n_x \cdot N \quad (17)$$

Despejando  $N$  de la Ecuación (7) para ponerlo en la función de  $p$ , tenemos:

$$N = N_o(1 + p(X_o - 1)) \quad (18)$$

Sustituyendo (18) en (17):

$$N_x = n_x \cdot N_o(1 + p(X_o - 1)) \quad (19)$$

Sustituyendo ahora (19) en (15), nos queda:

$$W_x = \frac{nx \cdot (1 + p(X_0 - 1))X}{X_0} \quad (20)$$

Y de la definición de **P** dada en la ecuación (10), nos queda la siguiente expresión para la fracción en peso de la especie molecular de tamaño "**X**"

$$W_x = P \cdot X \cdot nx \quad (21)$$

Sustituyendo (11) en (21).

$$W_x = P^2 \cdot X \cdot (1 - P)^{X-1} \quad (22)$$

De este modo, **W<sub>x</sub>** dependerá del tamaño de la especie en cuestión (**X**) y de la probabilidad de que una unidad monomérica no se encuentre enlazada por su grupo hidroxilo hemiacetalico (**P**), la cual es a su vez directamente proporcional al grado de avance de la reacción (**p**) para un polímero de grado de polimerización inicial **X<sub>0</sub>**.

Si lo que interesa maximizar es la suma de las fracciones en peso de las especies comprendidas en un rango particular de grado de polimerización, efectuando los arreglos pertinentes en (22) tenemos:

$$W_x = \frac{P^2}{1 - P} \cdot x(1 - P)^x \quad (23)$$

Entonces:

$$\sum_{x=1}^n W_x = \frac{P^2}{1 - P} \cdot \sum_{x=1}^n x \cdot (1 - P)^x \quad (24)$$

Y finalmente tenemos que:

$$\sum_{x=1}^n W_x = \left[ 1 - (1 + n \cdot P) \cdot (1 - P)^n \right] \quad (25)$$

Y de (25) podemos obtener la fracción en peso para las especies cuya talla es igual o mayor que **n**, la cual será:

$$\sum_{x=n}^{\infty} W_x = (1 + n \cdot P) \cdot (1 - P)^n \quad (26)$$

En tanto, para las especies comprendidas entre **X<sub>1</sub>** y **X<sub>2</sub>** será:

$$\sum_{X=X_1}^{X_2} W_x = \left[ (1 + X_1 \cdot P) \cdot (1 - P)^{X_1} - (1 + X_2 \cdot P) \cdot (1 - P)^{X_2} \right] \quad (27)$$

#### 4.2.2- Evaluación de la sensibilidad del modelo.

De acuerdo con la Ecuación (22), la demostración experimental de la validez del modelo requerirá de métodos apropiados para la determinación de  $P$ , la cual depende del grado de avance de la reacción ( $p$ ) y de la masa molecular inicial del polímero ( $X_0$ ). Debido a que el modelo parte del supuesto de una sola especie molecular y no de una mezcla de especies de diferente talla, como ocurre en la realidad, resulta conveniente conocer el grado de polidispersión del polímero, como una medida aproximada del ancho de la distribución de pesos moleculares ( $\Delta X_0$ ).

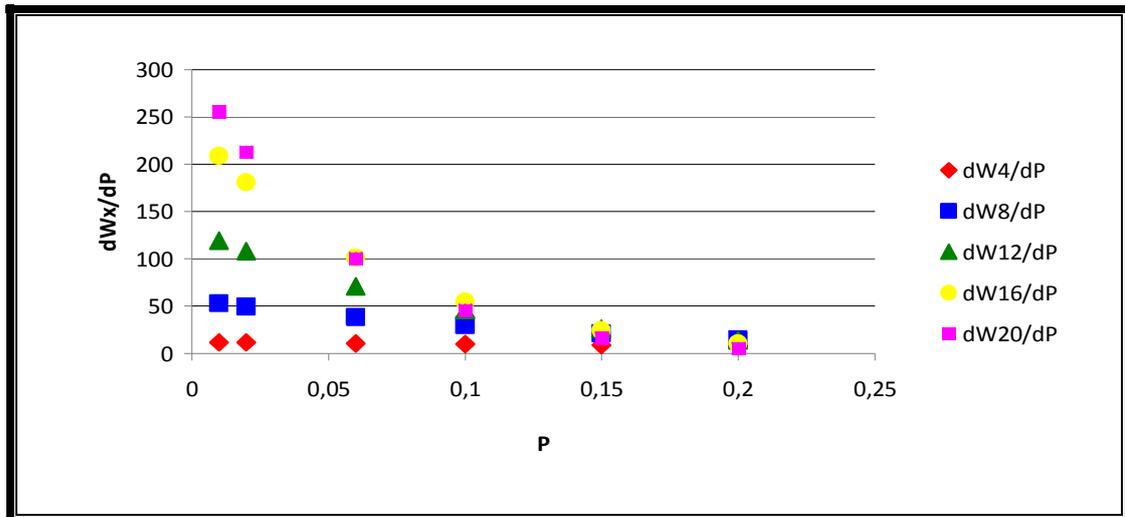
De la evaluación del error en la estimación de  $W_x$  ( $dW_x/dP$ ) con respecto a  $P$  para especies con grados de polimerización comprendidos entre 4 y 20 (rango dentro del cual se encuentran mayoritariamente las especies con actividad biológica) se puede observar que para  $P = 0,15-0,2$  el error es mínimo y prácticamente independiente del grado de polimerización de la especie considerada (observe la Figura No. 5). Este error se incrementa progresivamente en la medida que disminuye  $P$ , siendo más afectada la estimación mientras mayor es el grado de polimerización de la especie considerada.

De la definición de  $P$  Ecuación (10), se tiene que la misma es función de  $p$  y  $X_0$ . Diferenciando parcialmente para estas variables se tiene que:

$$\frac{dP}{dp} = 1 - \frac{1}{X_0} \approx 1 \quad (28)$$

$$\frac{dP}{dX_0} = \frac{1}{X_0^2} (p - 1) \approx 0 \quad (29)$$

De las anteriores expresiones se deriva que la magnitud  $P$  prácticamente es insensible al valor de  $X_0$  considerado (Ecuación 29) e igual al grado de avance de la reacción (Ecuación 28). Por lo cual constituye éste un parámetro fundamental sobre el cual se debe prestar especial cuidado al realizar su determinación experimental.



**Figura No. 5.** Dependencia del error en la estimación de  $W_x$  ( $dW_x/dP$ ) con respecto a  $P$ . ( $dW_i/dP$ ), error en la estimación de la fracción en peso de la especie de grado de polimerización  $i$ .

#### 4.2.3- Estimación experimental del grado de avance de la reacción.

De la definición del grado de avance de la reacción (Ecuación 7), sustituyendo el número de moléculas (**N**) por la concentración molar (**C**), tenemos:

$$p = \frac{C - C_0}{C_0(X_0 - 1)} \quad (30)$$

Como  $X_0 \gg 1$  y la concentración másica del polímero (**Cm**) es igual a  $C_0 X_0 M_1$ , de la expresión (30) se obtiene:

$$C - C_0 = \frac{p \cdot C_m}{M_1} \quad (31)$$

De los resultados obtenidos al estudiar la cinética de hidrólisis del PGA, se tiene que la concentración molar de extremos reductores se incrementa de forma lineal con el tiempo de reacción (*observe la Figura No. 4*), según:

$$C = C_0 + A \cdot t \quad (32)$$

Por lo que:

$$C - C_0 = A \cdot t \quad (33)$$

Igualando **C - C<sub>0</sub>** de las ecuaciones 31 y 33:

$$p = \frac{A \cdot t \cdot M_1}{C_m} \quad (34)$$

Por lo que la estimación de **p** a partir de datos experimentales estará afectada por la exactitud y precisión en la medición del tiempo de reacción, la determinación de la actividad enzimática y de la concentración másica del polímero. La menor contribución a la estimación del valor de **p** radica en la medición del tiempo de reacción (a menos que se utilicen actividades enzimáticas muy altas). En tanto, la determinación de la actividad enzimática se realiza con una precisión muy elevada bajo las condiciones experimentales previamente establecidas (Dumé, 2007), lo cual se corroboró en esta investigación (*observe el Anexo- 1*). De esta forma, queda por determinar la influencia que sobre la estimación de **p** tienen la exactitud y precisión en la determinación de la concentración másica del polímero (PGA).

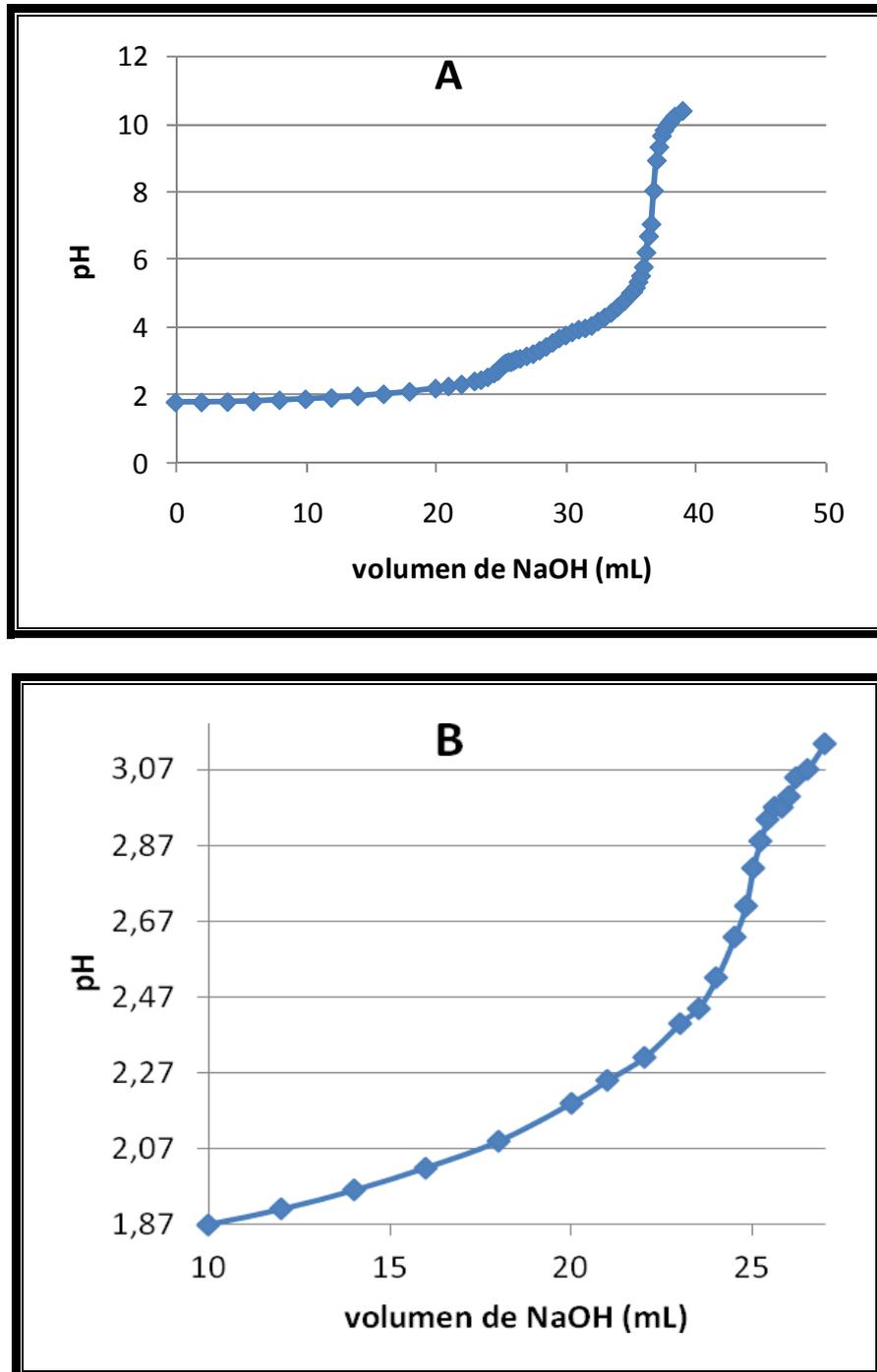
#### **4.3- Determinación de la concentración másica del polímero.**

En la determinación de la concentración másica del polímero (PGA), al inicio de la reacción y en sus hidrolizados, se utilizó el ensayo colorimétrico del Carbazol, según el procedimiento descrito por Bitter y Muir (1962), para la determinación de ácidos urónicos. Este método posee una elevada sensibilidad y especificidad, que lo hacen recomendable para los propósitos de este estudio. Para la estimación de las concentraciones de ácidos urónicos totales se utilizó una curva de calibración empleando como patrón ácido galacturónico (Sigma) (observe Anexo- 2). La determinación de la concentración de ácidos urónicos totales a partir de una dilución 1/250 de la solución de PGA 20 g/L (concentración aproximada) por el método de Carbazol mostró un valor de  $12100 \pm 410 \mu\text{g/mL}$  (ER = 3,4 %), lo que corresponde a una pureza del 60,5 %, muy distante del especificado por el fabricante (mín. 85 %). Un resultado similar ha sido observado al comparar curvas patrón de ácidos poliurónicos (hialurónico, heparina, condroitina y dermatana) con respecto a la del ácido D-galacturónico (Cesaretti *et al.*, 2003).

Por este motivo se procedió a determinar la concentración de ácidos urónicos totales mediante valoración potenciométrica, una vez precipitado cuantitativamente el PGA con HCl 1 mol/L. En la Figura No. 6 se muestra la curva de valoración del PGA (promedio de dos mediciones independientes), donde el primer salto corresponde a la valoración del exceso de HCl (Figura No. 6 B) y el segundo a la valoración de los grupos carboxilos del PGA (Figura No. 6 A). De este modo se obtuvo una concentración de ácidos urónicos totales de  $16770 \pm 35 \mu\text{g/mL}$  (ER = 0,2 %), lo que corresponde a una pureza del 83,9 %, en adecuada correspondencia con lo referido por el fabricante.

Teniendo en cuenta que el grado de polimerización promedio en número del PGA se estimó en 119 y que el patrón empleado en la curva de calibración es el monómero, se supuso la existencia de una influencia significativa del grado de polimerización sobre la señal analítica del método del Carbazol. De ser cierta esta suposición, entonces sería necesario establecer correcciones a las determinaciones sobre la base del grado de polimerización promedio, aspecto este de crucial importancia al cuantificar ácidos urónicos en hidrolizados de PGA.

Para comprobar esta hipótesis se prepararon hidrolizados al 2,5 y 15 % de hidrólisis a partir de PGA 20 g/L y se determinó el contenido de ácidos urónicos totales mediante el ensayo del Carbazol a los hidrolizados y al PGA sin hidrolizar. Los resultados, expresados como porcentajes de recobrado, asumiendo la pureza del PGA determinada previamente por el método potenciométrico, se presentan en la Figura No. 7.



**Figura No. 6. Valoración potenciométrica del PGA. (A) Curva de valoración mostrando los dos saltos de pH. (B) porción de la curva donde aparece el primer salto de pH (punto final para el exceso de HCl).**

Los resultados muestran que no existe diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre la muestra sin hidrolizar (muestra-control) y el hidrolizado con un grado de avance de reacción del 2%; sin embargo, sí existe diferencias significativas entre la muestra control y los hidrolizados con grados de avance de reacción 5% y 15% y, a su vez, entre los tres hidrolizados. Un resumen del análisis estadístico puede verse en la sección de Anexos (observe Anexo- 4).

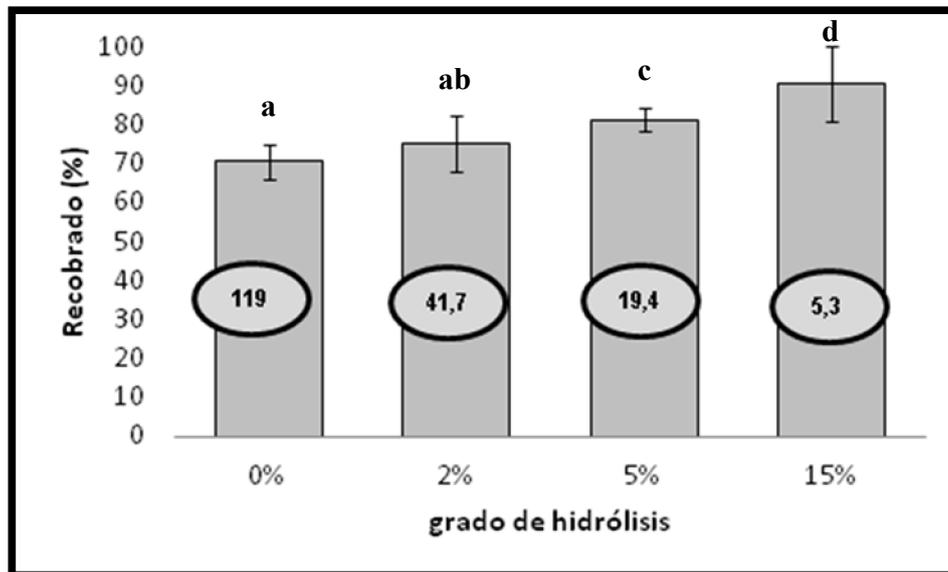
El comportamiento observado indica la existencia de una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la señal analítica del Carbazol con el incremento del grado de polimerización promedio del PGA, probablemente relacionada con aspectos cinéticos de la reacción de formación de color entre las galacturonolactonas y el Carbazol. En este sentido, la diversidad de conformaciones probables se incrementa exponencialmente con el aumento del grado de polimerización, lo que puede explicar esta disminución en la velocidad de reacción y, por tanto, del recobrado observado.

Un análisis de los datos permite establecer una correlación empírica entre el recobrado y el logaritmo natural del grado de polimerización (observe la Figura No. 8). Lo adecuado del ajuste ( $R^2 = 0,987$ ), sugiere el empleo de esta correlación para la corrección de los datos experimentales obtenidos durante el análisis de muestras de PGA de diferentes grados de polimerización.

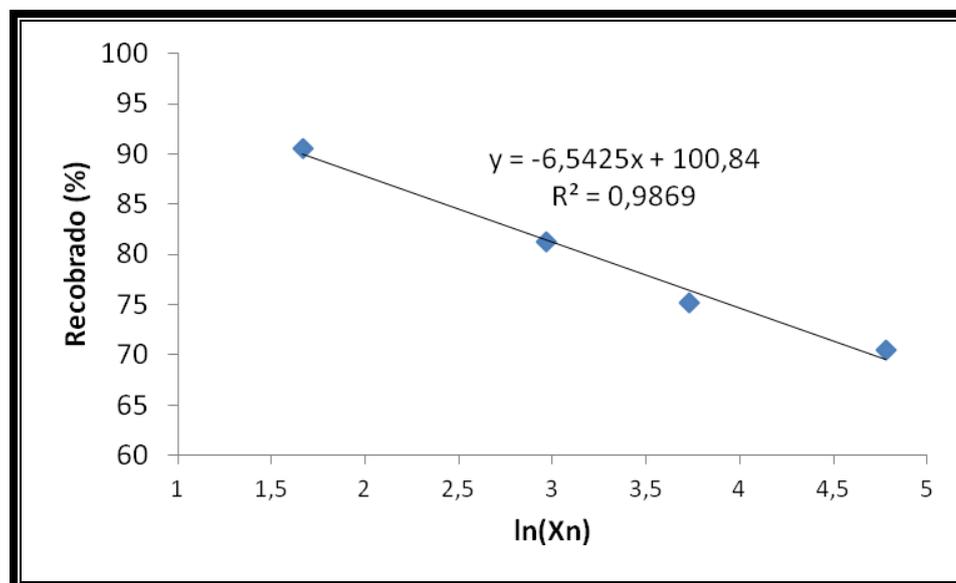
#### **4.4- Predicción del grado de avance de la reacción.**

Una vez ajustadas las condiciones para una determinación exacta y precisa de las variables con mayor incidencia en la estimación del grado de avance de la reacción, se decidió evaluar la capacidad predictiva disponible bajo las citadas condiciones. Para ello se diseñó un experimento bifactorial que contempló como factores la actividad enzimática en la mezcla de reacción (0,01; 0,1 y 1 U/mL) y el grado de avance de la reacción (6 niveles entre 1 y 22 %).

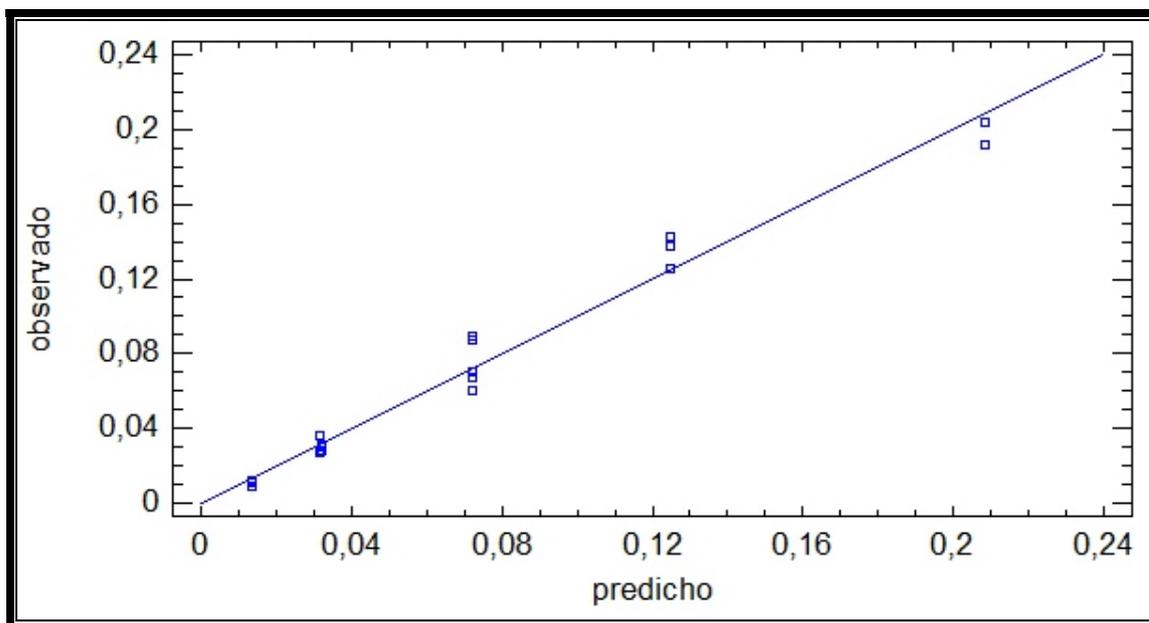
En la Figura No. 9 se presenta el gráfico de paridad para los valores de  $p$  observados experimentalmente frente a los estimados a partir de las condiciones experimentales impuestas en cada caso. Como se observa los datos correlacionan fuertemente entre sí ( $R = 0,989$ ) y se distribuyen aleatoriamente muy próximos a la diagonal. El mejor ajuste corresponde a una recta que pasa por el origen (intercepto no significativo;  $p > 0,05$ ), con pendiente 0,96, solo un 4 % inferior a la diagonal  $y = X$ . Cuando el grado de avance de la reacción estimado es mayor al 20 %, existe una aparente tendencia a obtener valores observados por debajo de lo previsto, lo cual puede sugerir que para estos progresos de reacción, la eficiencia catalítica comienza a disminuir como consecuencia de la considerable disminución en la masa molecular del sustrato. Estos resultados presentan gran valor práctico, pues nos permiten predecir con facilidad un grado de avance de la reacción deseado a partir de determinadas condiciones experimentales de partida.



**Figura No. 7.** Recobrado en el ensayo del Carbazol para muestras de PGA a diferentes grados de hidrólisis. Encerrados en círculos se muestran los valores de  $X_n$ ; barras de error indican la desviación estándar; letras diferentes señalan diferencias significativas ( $p$ -valor < 0,05) entre muestras.



**Figura No. 8.** Correlación entre el recobrado en el ensayo del Carbazol para hidrolizados de PGA y el logaritmo del grado de polimerización promedio de las muestras.



**Figura No. 9. Correlación entre los valores observados y predichos para el grado de avance de la reacción.**

#### **4.5- Fraccionamiento de la mezcla de OG presentes en el hidrolizado enzimático.**

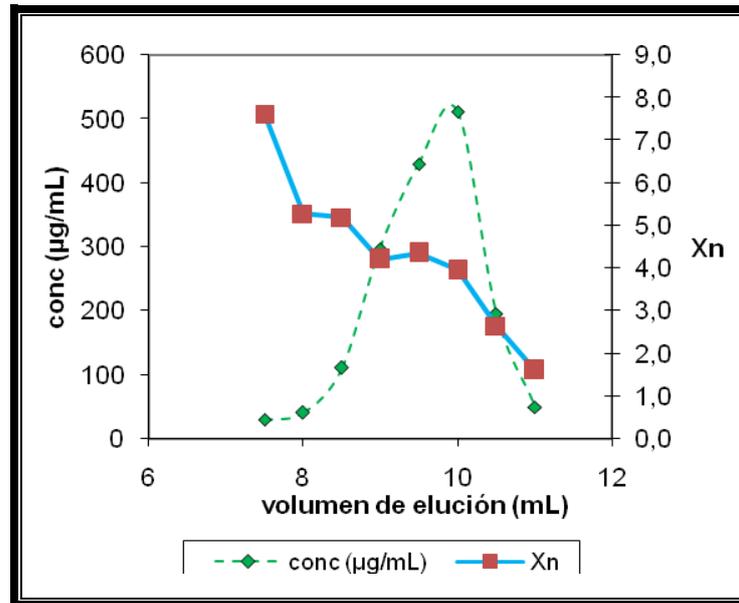
Para la elección de la matriz de filtración en gel se tuvo en cuenta los rangos de fraccionamiento referidos por el fabricante (Pharmacia, Suecia) para las matrices de Sephadex, que para los propósitos de este estudio resultó ser la G-25. Sin embargo, con esta matriz prácticamente la totalidad del hidrolizado eluyó en el volumen de exclusión, sin producirse fraccionamiento (dato no mostrado). Se ha referido que los ácidos pectínicos en soluciones acuosas presentan conformaciones extendidas (alargadas) (Owens, 1946), con un volumen hidrodinámico mucho mayor que el que tendría una molécula de similar peso molecular enrollada al azar.

Al aplicarse el hidrolizado sobre una columna de Sephadex G-75, el perfil de elución mostró la presencia de ácidos urónicos en las fracciones comprendidas entre los 6 y 11 mL (*observe la Figura No. 10*), lo que corresponde con casi todo el rango útil de fraccionamiento de la columna, indicando que la matriz y las condiciones experimentales utilizadas fueron las óptimas. El hidrolizado de ácido péctico eluyó formando un pico único (aparente), con un pequeño “hombro”. Los gp promedio de las fracciones estuvieron en el rango de 2 a 8 (*observe la Figura No. 10*), obteniéndose fracciones prácticamente puras del dímero, trímero, tetrámero y pentámero. Las moléculas con  $gp \geq 6$  no pudieron ser resueltas bajo estas condiciones, en tanto no se observó la presencia del monómero como producto de la reacción enzimática. Esto último concuerda con estudios realizados para otras glicohidrolasas (Sendra y Carbonell, 1998).

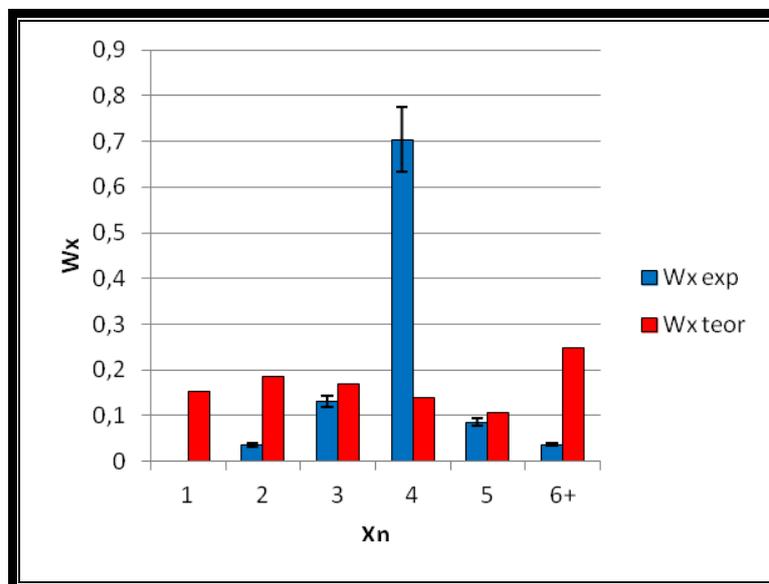
#### **4.6- Distribución de pesos moleculares en el hidrolizado.**

En la Figura No. 11 se presentan las distribuciones de masas moleculares experimentales y teóricas. Esta última se construyó sobre la base de la distribución más probable desarrollada en este trabajo, asumiendo igual probabilidad de hidrólisis para todos los enlaces disponibles (Sendra y Carbonell, 1998). Como puede observarse, existe una acumulación preferencial de fragmentos con  $gp = 4$ , los cuales llegan a representar el 70 % (m/m) de todas las especies presentes. La abundancia del trímero y el pentámero se corresponden bastante bien con la distribución teórica, en tanto, el dímero y las especies con  $gp \geq 6$  presentan abundancias significativamente inferiores.

Estos resultados concuerdan muy bien con la cinética de esta reacción enzimática, caracterizada por una disminución progresiva en la velocidad de reacción para grados superiores al 20 %, lo cual sugiere una disminución en la eficiencia catalítica de la enzima sobre especies cuyo gp sea menor o igual que 5.



**Figura No. 10.** Perfil de elución del hidrolizado de ácido péctico en Sephadex G-75. Buffer de elución: acetato 50 mM, pH 5; flujo: 5 mL·h<sup>-1</sup>. Conc (µg/mL), concentración de ácidos urónicos; Xn, gp promedio en número.



**Figura No. 11.** Distribución de pesos moleculares (como fracciones en peso) experimental ( $W_x \text{ exp}$ ) y teórica ( $W_x \text{ teor}$ ). Barras de error corresponden al error máximo en la determinación (10 %).

Esto explica muy bien la acumulación observada para fragmentos con gp igual a 4 y, como consecuencia de ello, una presencia muy deprimida de las especies de menor tamaño, no llegando a formarse cantidades detectables del monómero como producto de la hidrólisis.

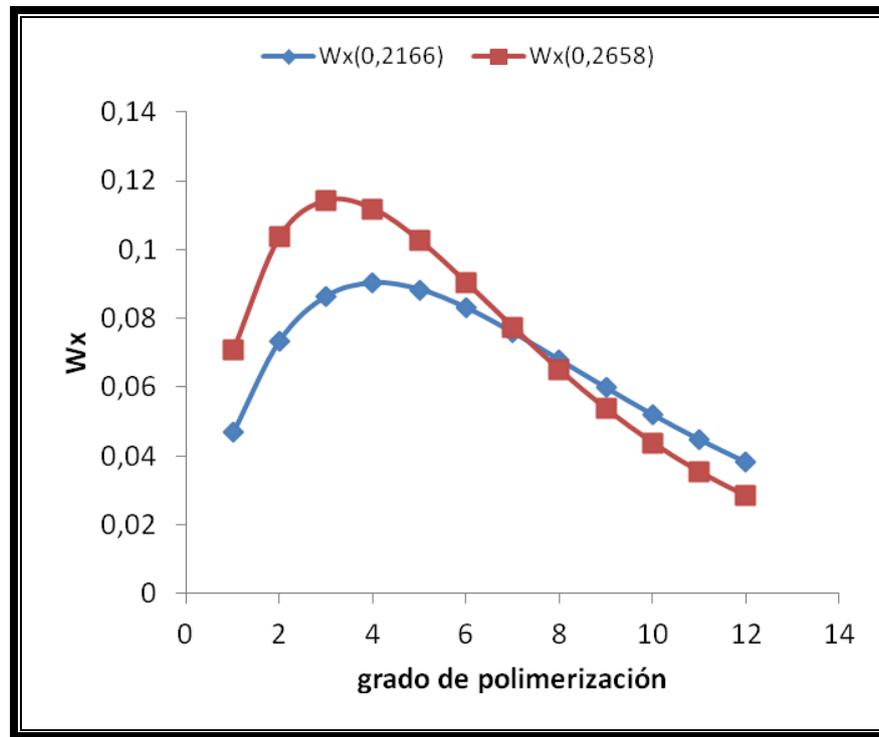
Los resultados apuntan a que la hidrólisis del ácido péctico por la endopoligalacturonasa de *K. marxianus* CCEBI 2011 no corresponde a un verdadero mecanismo de ataque al azar, sino que la probabilidad del ataque muestra preferencia por un sub-emplazamiento determinado, lo cual se hace evidente solo para avances de la reacción grandes (Sendra y Carbonell, 1998). Un resultado similar refieren Pagés *et al.* (2000) al mapear el subemplazamiento de la endoPG II de *Aspergillus niger*.

Se infiere, de la distribución de pesos moleculares, que la hidrólisis del pentámero y del hexámero, procede mucho más lentamente que para las especies de mayor tamaño, al estar limitada a la formación de los pares dímero-trímero o trímero-trímero y dímero-tetrámero, respectivamente. Esto reduce la acción de la enzima a uno o dos sitios de ataque de entre 4 y 5 posibilidades, respectivamente, lo cual incide directamente en la constante de velocidad de la reacción. Este comportamiento resulta similar al observado para las  $\alpha$ -amilasas durante la hidrólisis del almidón (Wojciechowski *et al.*, 2001).

Al evaluar la cinética de hidrólisis del PGA se encontró que para valores de  $p > 0,2$  aproximadamente, la velocidad de la reacción comenzaba a disminuir. Esto podría explicarse como consecuencia de la disminución del número de enlaces hidrolizables presentes en el sustrato "natural", cuyo grado de polimerización debe tener un valor inferior límite, a partir del cual la pérdida en la eficiencia catalítica de la enzima se hace evidente.

Para investigar a qué talla de oligogalacturónido corresponde este sustrato, se determinó, a partir del modelo de distribución más probable, cuáles especies comenzaban a disminuir su fracción másica a partir de este grado del hidrólisis "crítico"  $p = 0,22$  (*observe la Figura No. 12*). Como puede verse, a partir de este instante, las especies del octámero, y fundamentalmente el nonámero, la concentración másica comienza a disminuir progresivamente. De modo que el sustrato "natural" de la endopoligalacturonasa de *K. marxianus* debe tener una talla no menor al octámero.

Los resultados aquí presentados y discutidos sientan las bases para el desarrollo de un modelo estructurado que nos permita predecir la distribución de especies moleculares en el curso de la hidrólisis del ácido péctico. Este modelo a su vez, servirá de fundamento para el diseño del biorreactor y el establecimiento de las condiciones operacionales óptimas para la producción a escala comercial de OG biológicamente activos, maximizando la concentración de las especies comprendidas en el rango de gp deseado.



**Figura No. 12.** Distribución más probable para los oligómeros de PGA con grado de polimerización entre 1 y 12 para  $P$  igual a 0,2166 (color azul) y 0,2658 (color rojo).

# Conclusiones



## **5.- CONCLUSIONES**

1. La endoPG de *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 hidroliza al PGA a velocidad máxima y constante hasta que se ha alcanzado el 25 % de hidrólisis disminuyendo luego progresivamente hasta detenerse cuando se ha hidrolizado el 38 % de los enlaces disponibles.
2. El modelo teórico de distribución más probable para hidrolizados de PGA con endoPGs es función del grado de avance de la reacción y del gp de la especie considerada y es particularmente sensible a la disminución del grado de avance de la reacción, para valores de éste menores que 0,15, incrementando la sensibilidad con el aumento del gp.
3. La intensidad de la señal analítica en el ensayo colorimétrico del Carbazol para ácidos urónicos es dependiente del gp promedio de los ácidos urónicos presentes, disminuyendo linealmente con el incremento del logaritmo natural del gp.
4. La predicción del grado de avance de la reacción de hidrólisis del PGA con una endoPG puede realizarse con un error mínimo (4 %) si se tienen en cuenta las condiciones experimentales establecidas para la determinación de la actividad enzimática endoPG y la cuantificación de la concentración másica del PGA.
5. El método de cromatografía de filtración en gel utilizando la matriz Sephadex G-25 posibilita resolver los oligogalacturónidos comprendidos entre los grados de polimerización 1 y 5 permitiendo de este modo obtener la distribución de pesos moleculares para hidrolizados de PGA con grados de hidrólisis avanzados.
6. La distribución de pesos moleculares en los hidrolizados enzimáticos de PGA a tiempo infinito muestra una acumulación preferencial del tetrámero, ausencia de monómero, disminución del dímero y de especies con  $gp \geq 6$ , al compararse con la distribución más probable. Este comportamiento está relacionado con la incapacidad de la enzima para hidrolizar especies con  $gp \leq 4$  y a la disminución de su eficiencia catalítica para especies con  $gp < 8$ .

# Recomendaciones



## **6.- RECOMENDACIONES**

- ✦ Desarrollar un modelo estructurado para la despolimerización del PGA con la endoPG de *Kluyveromyces marxianus* y aplicarlo al diseño de un reactor enzimático para la obtención de oligogalacturónidos biológicamente activos.

# Bibliografía

## 7. - BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Aguilar G, Huitron C. "Conidial and mycelial-bound exo-pectinase of *Aspergillus*". *Microbiology Letters* 1993, 108: 127-132.
- ❖ Alkorta I, Garbisu C, Llama M, Serra J. "Industrial applications of pectic enzymes: a review". *Process Biochemistry* 1998, 33: 21-28.
- ❖ Aziz A, Heyraud A, Lambert B. "Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*". *Planta* 2004, 218: 767-774.
- ❖ Baldan B, Bertoldo A, Navazio L, Mariani P. "Oligogalacturonide-induced changes in the developmental pattern of *Daucus carota* L. somatic embryos". *Plant Science* 2003. 165 (2): 337-348.
- ❖ Bélafi-Bakó K, Eszterle M, Kiss K, Nemestóthy N, Gubicza L. "Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor". *Journal of Food Engineering* 78 2007, 438-442
- ❖ Bergey D, Orozco-Cárdenas M, De Muora D, Ryan C. "A wound-and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves". *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 1756-1760.
- ❖ Bitter T, Muir M. "A modified uronic acid carbazole reaction". *Anal Biochem* 1962, 4: 330-334.
- ❖ Bonghi C, Rascio N, Ramina A, Casadoro G. "Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach". *Plant Mol. Biol* 1992, 20: 839-848.
- ❖ Cabrera J. "Obtención de (1,4)  $\alpha$ -D-oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria citrícola". Tesis Doctoral, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de Las Lajas, Cuba, 1999.
- ❖ Caffall K y Mohnen D. "The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides". *Carbohydrate Research* 2009, 344: 1879-1900.
- ❖ Camejo D, Martí M, Jiménez A, Cabrera J, Olmos E, Sevilla F. "Effect of oligogalacturonides on root length, extracellular alkalization and O<sub>2</sub> accumulation in alfalfa". *J Plant Physiol* 2010, PMID 21074893.
- ❖ Carbonell J *et al.* "A Monte Carlo simulation of the depolymerization of linear homopolymers by endo-enzymes exhibiting random-attack probability and single-attack mechanism: Application to the (1→3),

- (1→4)-β-D-glucan/ Endo-(1→3), (1→4)-β-D-glucanase system". 1998, 60 (1): 105-113.
- ❖ Carpita N, Gibeaut D. "Structural models of primary cell walls in floering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth". *Plant J* 1993, 3: 1-30.
  - ❖ Cartaya O, Reynaldo I. "Acomplejamiento del ácido galacturónico con metales pesados y su aplicación en plántulas de tomate". Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA. Cuba, 2005.
  - ❖ Cesaretti M, Luppi E, Maccari F, Volpi N. "A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction". *Carbohydrate Polymers* 2003, 54: 59-61.
  - ❖ Coté F, Hahn M. "Oligosaccharins: Structures and signal transduction". *Plant Mol. Biology* 1994, 26: 1379-1411.
  - ❖ D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S, Bellincampi D. "Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions". *Biochimica et Biophysica Acta* 2004, 1696: 237-244.
  - ❖ Darvill A, Augur C, Bergmann C, "Oligosaccharinsoligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants". *Glycobiology* 1992, 2: 181-198.
  - ❖ De Gregorio A, Mandalani G, Arena N, Nucita F, Tripodo M, lo Curto R. "SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps". *Bioresource Technology* 2002, 83: 89-94.
  - ❖ De Vries R, Visser J. "Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides". *Microbiol. Mol. Biol* 2001, 65: 497-522.
  - ❖ Dekker R, Richards G. "Determination of pectic substances in plant material". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1972, 23: 475-483.
  - ❖ Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck G, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel F, Dewdney J. "Activation of defense response pathways by OGs and flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings". *Mol Plant* 2008, 1: 423-445.
  - ❖ Dongowski G, Lorenz A, Proll J. "The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and in vitro". *The Journal of Nutrition* 2002, 132: 1935-1944.
  - ❖ Droillard M, Guclu J, Le Caer J, Mathieu Y, Guern J. "Identification of calveticulin-like protein as one of the phosphoproteins modulated in

- response to oligogalacturonides in tobacco cells". *Planta* 1997, 202: 341-348.
- ❖ Dumé R. "Evaluación preliminar de un modelo teórico para la descripción de la hidrólisis del ácido poligalacturónico con una endopoligalacturonasa". Trabajo de Diploma, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba, 2007.
  - ❖ Evans J, Akin D, Foulk J. "Flax-retting by polygalacturonase-containing enzyme mixtures and effects on the fiber properties". *J. Biotechnol* 2002, 97: 223-231.
  - ❖ Falasca G, Capitani F, D'Angeli S, Biondi S, Altamura M. "Long-sized oligogalacturonides inhibit, whereas spermidine enhances, xylogenesis in tobacco leaf explants". *Plant Biosystems* 2008, 142 (3): 518-524.
  - ❖ Fernández-González M, Úbeda J, Vasudevan T, Otero R, Briones A. "Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains". *FEMS Microbiology Letters* 2004, 237: 261-267.
  - ❖ Fogarty W, Kelly C. "Pectic Enzymes. In: Microbial Enzymes and Biotechnology". *Applied Science Publishers* 1983, London, 131-182.
  - ❖ Galletti R, Denoux C, Gambetta S, Dewdney J, Ausubel F, De Lorenzo G, Ferrari S. "The atrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*". *Plant Physiology* November 2008, 148 (3): 1695-1706.
  - ❖ González O, *et al.* "Evaluación del efecto del Pectimorf en el establecimiento in vitro de yemas axilares de boniato clon CEMSA 78-354" *Biotecnología Vegetal* 2004, 4 (2): 115-119.
  - ❖ Grassin C, Fauquembergue P, Visser J, Voragen A. "In pectin and pectinases". *Elsevier Science* 1996, 453-462.
  - ❖ Herbstreith Fox. The specialists for pectins. (Catálogo comercial) 2001.
  - ❖ Hoondal G, Tiwari R, Tewari R, Dahiya N, Beg Q. "Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review". *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002, 59: 409-418.
  - ❖ Hu X, Neill S, Cai W, Tang Z. "Induction of defense gene expression by oligogalacturonic acid requires increases in both cytosolic calcium and hydrogen peroxide in Arabidopsis thaliana". *Cell Res* 2004, 14: 234-240.
  - ❖ Hunt J, Cameron R, Williams M, "On the simulation of enzymatic digest patterns: The fragmentation of oligomeric and polymeric galacturonides

- by endo-polygalacturonase II. *BBA-General Subjects* November 2006, (11): 1696-1703.
- ❖ Iconomou D, Arapoglou D, Israilides C. "Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing". *Grasas y Aceites* 2010, 61: 303-3011.
  - ❖ Kashyap D, Vohra P, Chopra S, Tewari R. "Applications of pectinases in the commercial sector: a review". *Bioresource Technology* 2001, 77: 215-227.
  - ❖ Kiyohara H, Takemoto N, Zhao J, Kawamura H. "Pectic polysaccharide from roots of *Glycyrrhiza uralensis*: Possible contribution of neutral oligosaccharide in the galacturonase-resistant region to anti-complementary and mitogenic activities". Visser J, Voragen A (eds.) *Pectin and pectinases*. Elsevier Science 1996, 673-678.
  - ❖ Lang C, Dörnenburg H. "Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases" *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53: 366-375.
  - ❖ Luh B, Phaff H, "Properties of yeast polygalacturonase". *Arch. Biochem. Biophys* 1954, 48: 23-37.
  - ❖ Mahammad S, Prud'homme R, Roberts G, Khan S. "Kinetics of enzymatic depolymerization of guar galactomannan". *Biomacromolecules* 2006, 9: 2583-2590.
  - ❖ Mitchell D A, *et al.* "An analytical method for determining relative specificities for sequential reactions catalyzed by the same enzyme: General formulation". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008, 1784: 705-715.
  - ❖ Mohnen D. "Pectin structure and biosynthesis". *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11: 266-277.
  - ❖ Moscatiello R, *et al.* "Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides" *Journal of Experimental Botany* 2006, 57 (11): 2847-2865.
  - ❖ Muñoz J, Coronado C, Pérez-Hormaeche J, Kondorisi A, Ratet P, Palomares A. "A medicago sativa polygalacturonase gene expressed during the alfalfa-rhizobium meliloti interaction". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95: 9687-9692.

- ❖ Navazio L, Moscatiello R, Bellincampi D, Baldan B, Meggio F, Brini M, Bowler C, Mariani P. "The role of calcium in oligogalacturonide-activated signaling in soybean cells". *Planta* 2002, 215: 596-605.
- ❖ Nelson N. "Colorimetric analysis of sugars". In: *Methods of Enzymology*; Colowick S and Kaplan N. (eds.), *New York, Academic Press* 1957, 3: 85-86.
- ❖ Nicolic M, Mojovic L. "Hydrolysis of apple pectin by the coordinated activity of pectic enzymes". *Food Chemistry* 2007, 101: 1-9.
- ❖ Owens H, *et al.* "Shape and size of pectinic acid molecules deduced from viscometric measurements" *Journal of the American Chemical Society* 1946, 68: 1628-1632.
- ❖ Pagés S, Heijne W, Kester H, Visser J, Benen J. "Subsite mapping of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II by site-directed mutagenesis". *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275 (38) 29348–29353.
- ❖ Pariza M, Foster E, "Determining the safety of enzymes used in food processing". *J. Food Protect* 1983, 46: 453-468.
- ❖ Pérez S, Maseau K, du Penhoat H. "The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides". *Plant Physiol. Biochem* 2000, 38: 37-55.
- ❖ Pressey R. "Polygalacturonase inhibitors in bean pods". *Phytochemistry* 1996, 42: 1267-1270.
- ❖ Ramírez M, Reinaldo I. "Origen, preparación química y actividad biológica de oligosacarinas. Aplicaciones en agricultura". *Preparación Química* 2002.
- ❖ Reymond C, Fraissinet T, Fevre M. "Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* pg1 gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression". *Curr Genet* 1996, 30: 240-245.
- ❖ Ribeiro D, Henrique S, Oliveira L, Macedo G, Fleuri L. "Enzymes in juice processing: a review". *International Journal of Food Science and Technology* 2010, 45: 635-641.
- ❖ Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A. "Handbook of enology. Vol. I. The Microbiology of Wine and Vinifications (2nd Edition)". *John Wiley & Sons, Ltd.*, ISBN: 0470010347, New York, USA, 2006.
- ❖ Ridley B, O'Neill M, Mohnen D. "Pectins, structure, biosynthesis, and oligogalacturonides-related signalling". *Phyto-chemistry* 2001, 57: 929-967.
- ❖ Rombouts F, Pilnik W. *Economic Microbiology* 1989, 5: 227-282.

- ❖ Rose J, Hadfield K, Labavitch J, Bennett A. "Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit". *Plant Physiol. Biochem* 1998, 117: 345-361.
- ❖ Sakamoto T, Bonnin E, Thibault J. "A new approach for studying interaction of the polygalacturonase-inhibiting proteins with pectins". *Biochimica et Biophysica Acta* 2003, 1621: 280-284.
- ❖ Sarioglu K, Demir N, Acar J, Mutlu M. "The use of commercial pectinase in the fruit juice industry. Part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase". *Journal of Food Engineering* 2001, 47: 271-274.
- ❖ Schacht T, Unger Ch, Pich A, Wydra K. "Endo and exopolygalacturonases of *Ralstonia solanacearum* are inhibited by polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) activity in tomato stem extracts". *Plant Physiology and Biochemistry* 2011, 1-11.
- ❖ Sendra J, Carbonell J. "A theoretical equation describing the time evolution of the concentration of a selected range of substrate molecular weights in depolymerization processes mediated by single-attack mechanism endo-enzymes". *Biotechnology and Bioengineering* 1998, 57 (4): 387-393.
- ❖ Serra J, Alkorta I, Llama M, Alaña A. "Aplicación industrial de los enzimas pécticos. Producción, purificación, inmovilización y algunas propiedades de la pectina lisa de *Penicillium italicum*". *Alimentación. Equipos y Tecnología* 1992, 127-134.
- ❖ Serrat M, Bermúdez R, Villa T. "Producción de poligalacturonasa en levaduras: ¿Una violación del principio de economía celular?". (En: I Simposio Internacional de Ciencias Biológicas Charles T. Ramsden in memoriam (Memorias)). 2004.
- ❖ Serrat M, Bermúdez R, Villa T, "Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2002, 97: 193-208.
- ❖ Serrat M, et al. "Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*: Potential use of polygalacturonase in foodstuffs". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2004, 117: 49-64.
- ❖ Serrat M, Rodríguez O, Camacho M, Vallejo J, Ageitos J, Villa T. "Influence of nutritional and environmental factors on ethanol and endopolygalacturonase co-production by *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011". *International Microbiology* 2011, 14: 41-49.

- ❖ Sieiro C, García-Fraga B, López-Seijas J, Da Silva A Tomás G. “Microbial pectic enzymes in the food and wine industry”. *Food Industrial Processes Methods and Equipment* 2012, Dr. Benjamin Valdez (ed.) ISBN: 978-953-307-905-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/food-industrial-processes-methods-and-equipment/microbial-pecticenzymes-in-the-food-and-wine-industry>.
- ❖ Sitrit Y, Downie B, Bennett A, Bradford K. “A novel exo-polygalacturonase is associated with radicle protrusion in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds”. *Plant Physiol. Biochem* 1996, 752: 111-161.
- ❖ Somogyi M. “Notes on sugar determination”. *Journal of Biological Chemistry* 1952, 195: 19-23.
- ❖ Souza J, Silva E, Maia M, Teixeira M. “Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1”. *Process Biochemistry* 2003, 39: 455-458.
- ❖ Taylor M, Rabe E, Dodd M, Jacobs G. “Effect of storage regimes on pectolytic enzyme, pectin substances, internal conductivity and gel breakdown in cold stored Songold plums”. *J Horti Sci* 1994, 69: 527-534.
- ❖ Thibault J, “*Aspergillus niger* endopoligalacturonase: 3-Action pattern on poligalcturonic acid”. *Carbohydr. Polym* 1983, 3: 259-272.
- ❖ Vallejo J, Serrat M, Pérez-Portuondo I, Sánchez-Pérez A, Ageitos J, Villa T. “A novel *Kluyveromyces marxianus* strain with an inducible flocculation phenotype”. *AMB Express* 2012, 2: 38.
- ❖ Van Cursem P, Messiaen J. “Biological effects of pectic fragments in plant cells”. *Acta. Bot. Nerrl* 1994, 433: 231-245.
- ❖ Voragen A, Plinik W, Thibault J, Axelos M, Renard C. “Pectins foods polysaccharides and their applications”. 1995, 287-339.
- ❖ Weber J, Olsen O, Wegener C, von Wettstein D. “Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot”. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 1996, 48: 389-401.
- ❖ Wojciechowski P, *et al.* “Iteration model of starch hydrolysis by amylolytic enzymes” *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 75 (5): 530-539.

**Anexos**



**ANEXO- 1**

**Ensayo para la determinación de la actividad enzimática poligalacturonasa. Resumen del análisis estadístico de la determinación.**

**Regresión Simple - Absorbancia vs. tiempo**

Variable dependiente: Absorbancia

Variable independiente: tiempo

Lineal:  $Y = a + b \cdot X$

**Coefficientes**

	<b>Mínimos Cuadrados</b>	<b>Estándar</b>	<b>Estadístico</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error</b>	<b>T</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Intercepto</b>	0,0526786	0,00831918	6,33219	0,0004
<b>Pendiente</b>	0,103318	0,00135351	76,3332	0,0000

**Análisis de Varianza**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Modelo</b>	0,664196	1	0,664196	5826,75	0,0000
<b>Residuo</b>	0,000797936	7	0,000113991		
<b>Total (Corr.)</b>	0,664994	8			

Coefficiente de Correlación = 0,9994

R-cuadrada = 99,88 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,8629 por ciento

Error estándar del est. = 0,0106766

Error absoluto medio = 0,00882381

Estadístico Durbin-Watson = 1,37899 (P=0,0640)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,165252

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre Absorbancia y tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

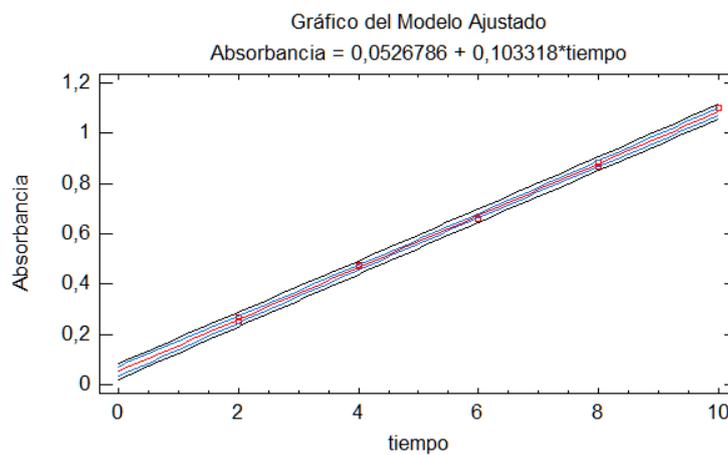
Absorbancia = 0,0526786 + 0,103318 \* tiempo  
Puesto que el valor-P en la tabla

ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y tiempo con un nivel de confianza del 95,0%.

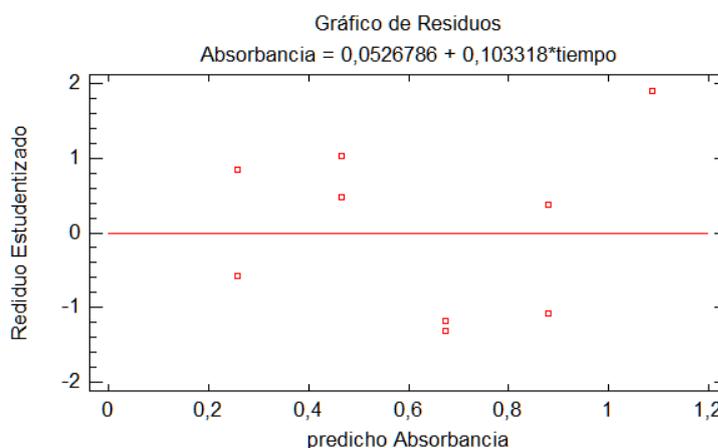
El estadístico *R-Cuadrada* indica que el modelo ajustado explica 99,88% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,9994, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,0106766. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones, seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto.

El error absoluto medio (MAE) de 0,00882381 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico No. 1. Modelo de ajuste**

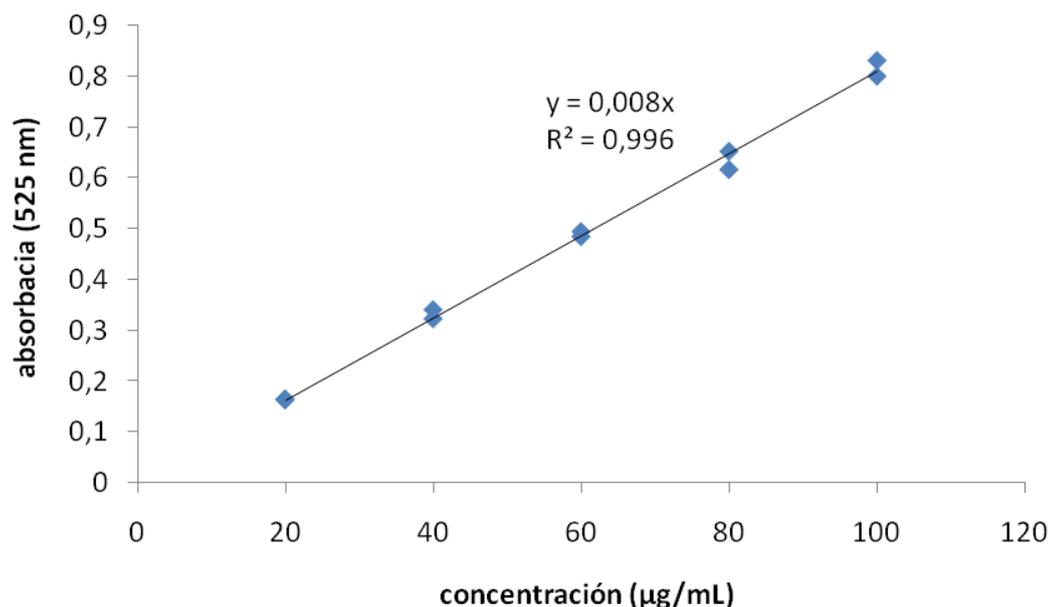


**Gráfico No. 2. Residuos Vs. Absorbancia predicha.**



**ANEXO- 2**

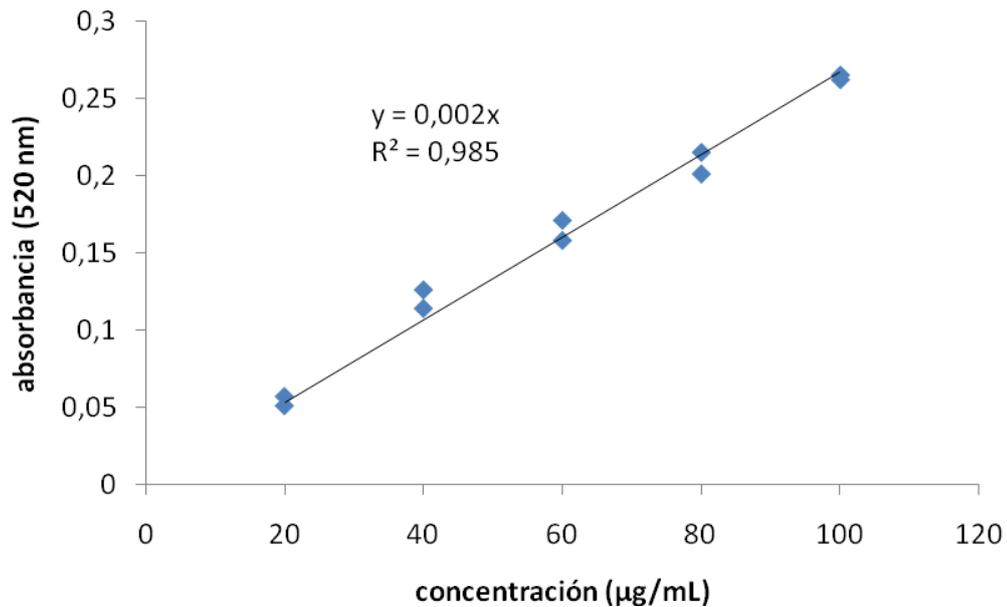
**Ensayo colorimétrico del Carbazol para ácidos urónicos. Curva de calibración. Patrón: Ácido galacturónico (Sigma).**



La curva de calibración del método de Carbazol que se representa en este gráfico posee un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,996$ , lo cual nos indica que los datos experimentales son consistentes con el cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer (recta que pasa por el origen); el modelo explica el 99,6 % de la variabilidad en la absorbancia. El error estándar de estimación en la pendiente fue de  $0,17 \cdot 10^{-3}$  unidades de absorbancia/unidad de concentración (ER = 2,1 %). La apreciación del método resultó igual a  $1,25 \mu\text{g/mL}$ .

**ANEXO- 3**

**Ensayo colorimétrico del Somogyi-Nelson para azúcares reductores. Curva de calibración. Patrón: Ácido galacturónico (Sigma).**



La curva de calibración del método de Somogyi-Nelson que se representa en este gráfico posee un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,985$ , lo cual nos indica que los datos experimentales son consistentes con el cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer (recta que pasa por el origen); el modelo explica el 98,5 % de la variabilidad en la absorbancia. El error estándar de estimación en la pendiente fue de  $0,09 \cdot 10^{-3}$  unidades de absorbancia/unidad de concentración (ER = 4,5 %). La apreciación del método resultó igual a 5  $\mu\text{g/mL}$ .

**ANEXO- 4**

**Influencia del grado de polimerización promedio de los ácidos urónicos en el recobrado de la señal analítica del ensayo del carbazol. Análisis estadístico.**

**Resumen Estadístico**

<b>Muestra</b>	<b>Recuento</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Coefficiente de Variación</b>
<b>Hidrolizado 0 %</b>	9	33,7889	2,152	6,36896%
<b>Hidrolizado 2 %</b>	4	36,0	3,47275	9,64653%
<b>Hidrolizado 5 %</b>	4	38,925	1,46828	3,77206%
<b>Hidrolizado 15 %</b>	9	43,3556	4,63792	10,6974%
<b>Total</b>	26	38,2308	5,24426	13,7174%

<b>Muestra</b>	<b>Curtosis Estandarizada</b>
<b>Hidrolizado 0 %</b>	-0,772578
<b>Hidrolizado 2 %</b>	0,999682
<b>Hidrolizado 5 %</b>	1,02205
<b>Hidrolizado 15 %</b>	-0,789248
<b>Total</b>	-0,496322

**Tabla ANOVA**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Entre grupos</b>	435,777	3	145,259	<b>12,69</b>	<b>0,0001</b>
<b>Intra grupos</b>	251,779	22	11,4445		
<b>Total (Corr.)</b>	687,555	25			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95,0% de confianza.



**Pruebas de Múltiple Rangos de Duncan**

Método: 95,0 porcentaje LSD

<b>Muestra</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>Hidrolizado 0 %</b>	9	33,7889	X
<b>Hidrolizado 2 %</b>	4	36,0	XX
<b>Hidrolizado 5 %</b>	4	38,925	X
<b>Hidrolizado 15 %</b>	9	43,3556	X