

PREPARACION DE RAMNOGALACTURONANO DE LIMON MEXICANO POR TRATAMIENTO ENZIMATICO Y SU APLICACIÓN EN LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD RAMNOGALACTURONASA

Juan Carlos Contreras-Esquivel

Sección Polisacáridos y Polisacaridasas. Laboratorio de Bioquímica de Alimentos. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Apartado Postal 252 – Código Postal 25000. Saltillo, Coahuila, México.

Introducción. La molécula de pectina es un heteropolisacárido que está formada estructuralmente por una región lisa y una región ramificada. La región lisa u homogalacturonano esta formada por moléculas de ácido galacturónico, mientras que la región ramificada o ramnogalacturonano esta formada por moléculas de ácido galacturónico y ramnosa. En la molécula de ramnosa se encuentra unido covalentemente a arabinanos y/o galactanos. Tecnológicamente, el ramnogalacturonano (RG) esta implicado en el taponamiento de sistemas de ultrafiltración, y también este material presenta aplicaciones como fibra dietética. En farmacéutica presentan actividad biológica y en nutrición se ha mencionado que son responsables de la disminución de colesterol en sangre¹. El RG está disponible comercialmente pero los precios son altos. Actualmente existen microorganismos (libres de ramnogalacturonasas) o enzimas purificadas que pueden ser aplicados en la preparación de ramnogalacturonanos. En México hay un sin número de materiales vegetales tropicales ricos en sustancias pécticas, que pueden ser apropiadas para la preparación del RG. Actualmente en nuestro laboratorio estamos creando una colección de polisacáridos pécticos de origen tropical y desértico. Por otro lado, es importante encontrar nuevos microorganismos capaces de degradar el RG para ser utilizados en la extracción de pectina y oligosacáridos. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología de laboratorio para recuperar el RG a partir de pectina de limón mexicano y su aplicación en la detección de actividad ramnogalacturonasa.

Material y métodos

Reactivos. Se recibió una pectina de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) de Danisco Cultor de México, S.A. (Tecomán, Colima, México). Se compró una endo-poligalacturonasa (endo-PG) y endo-arabinasa (endo-Ara) de *Aspergillus niger* de Megazyme (Irlanda). Se adquirió una pectinmetilesterasa (PME) de naranja y rojo de rutenio (Sigma-Adrich). Se recibió por donación una PME fúngica (DSM-Food Specialities, Francia). Se utilizó una mezcla comercial de enzimas que contienen RG-hidrolasas y RG-lisas (Pectinex Ultra SPL, Novozymes, Dinamarca) y otros preparados enzimáticos comerciales.

Preparación de ramnogalacturonano. Se disolvieron 20 g de pectina en un litro de buffer ácido cítrico – citrato de sodio 0.150M pH 6.5. Luego se agregó una cantidad determinada de PME de naranja y se dejó reaccionar durante 12 horas a 37°C bajo agitación constante. Luego se ajustó el pH a 4.5 con HCl 1M y se agregó una PME fúngica, una endo-PG, y una endo-Ara. La reacción fue conducida a la misma temperatura durante 24 horas. La mezcla se al agregó azida de sodio en una concentración al 0.05%. Luego el material fue precipitado con dos volúmenes de etanol y se dejó reposar durante 24 horas bajo refrigeración. Luego el material fue filtrado a través de tela muselina y precipitado en 1 litro de acetona. Esta operación fue realizada en dos ocasiones mas, y luego el material fue deshidratado a 37°C hasta peso constante.

Preparación de placa agar-RG y detección de actividad enzimática. Se preparó una solución de RG de limón mexicano al 0.25% (p/v) en un amortiguador ácido acético - acetato de sodio 50 mM, pH 4.5. Luego se agregó agarosa a la solución de RG al 1% (p/v). Luego se calentó a ebullición por 30 segundos en horno de microondas en dos ciclos de 30 segundos cada uno. Finalmente la placa fue vaciada en cajas de petri y se dejaron solidificar en una superficie plana. Luego se agregaron 20 µl de enzima diluida apropiadamente en pocillos perforado en el gel de agarosa-RG y las muestras fueron incubadas a 37°C a diferentes tiempos. Al término de la incubación se procedió a lavar el gel de agarosa-RG con agua destilada (4 veces) y finalmente se agregaron 20 ml de solución de rojo de rutenio 0.05 (p/v), se agitó durante 10 minutos. Luego la caja fue lavada con agua destilada por cuatro ocasiones. Los halos claros representan la actividad RGasa sobre el ensayo de placa.

Resultados y discusiones. Al término de la degradación enzimática se realizó una precipitación con etanol y se observó un precipitado blanco. En contraste, la pectina de limón mexicano (control) presentó un coágulo transparente y con una consistencia semi-sólida. El precipitado blanco fue luego re-precipitado con solventes orgánicos con el propósito de eliminar compuestos de bajo peso molecular, tales como oligosacáridos. El material presentó un rendimiento del 75%.

El RG de limón fue incorporado con éxito en las placas de agarosa. Se utilizaron diversos preparados comerciales con actividad enzimática. El preparado Pectinex Ultra SPL fue el material control positivo y se observó un halo claro que correspondió a la degradación del RG. La formación del halo se puede explicar a que el RG es degradado por la enzima correspondiente y los oligosacáridos formados son liberados del gel de agarosa a través de difusión mediante los lavados con agua quedando así una zona clara. El rojo de rutenio, un complejo catiónico, forma un complejo con los grupos carboxilos de la molécula de RG de limón. No se detectó actividad enzimática con preparados purificados de poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, celulasa, arabinasa, y pectinliasa. Se logró detectar actividad RG de un microorganismo aislado de cáscara de mango y piña de agave. La metodología de preparación fue realizada fácilmente con poco equipamiento y sin centrifuga, la etapa clave es lavar muy bien el material precipitado para eliminar compuestos de bajo peso molecular.

Agradecimientos. Este trabajo fue parcialmente financiado por *Coyote Foods & Bioingredients* (Saltillo, Coahuila, México) y se agradece su colaboración en la compra etanol y acetona. También se agradece la UA de C por su apoyo en la compra de las endo-poligalacturonasa y endo-arabinasa.

Referencias

1. Terpstra, A.H.M., Lapré, J.A., Vries, de H.T., Beynen, A.C. (2002). *Nahrung/Food*, **46**,83-86.