

Hidrólisis enzimática del ácido péctico con una endopoligalacturonasa de levadura: Cinética y distribución de masas moleculares

Enzymatic Hydrolysis of the Pectic Acid with a Yeast Endopolygalacturonase: Kinetic and Molecular Weight Distribution

Dr. Manuel Serrat-Díaz¹; Lic. Richard A. Dumé-Arias¹; Lic. Yuniesky Del-Todo-Martínez¹, MsC. Odalys Rodríguez-Gómez¹, MsC. Juan F. Almenares-Verdecia¹; Lic. Roberto G. Machado-García^{II}

mserrat@cebi.uo.edu.cu

¹Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba; ^{II}Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

● 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 péctico con una endopoligalacturonasa 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 ≥ 6 , al compararlo con la distribución más probable. 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 ácido péctico.

Palabras clave: oligogalacturónidos, ácido péctico, endo-poligalacturonasa, depolimerización.

Abstract

Oligogalacturonides are promising biomolecules for agricultural use, plant biotechnology and functional foods formulation, due to its potent and diverse biological activity, which is mainly a function of the polymerization degree of these ones. The establishment of optimal conditions to oligogalacturonides production requires to know the enzymatic kinetic and mode of action. In this work is studied the kinetic of pectic acid hydrolysis by means of a yeast endopolygalacturonase, as well as the characterization of the molecular weights distribution in the hydrolyzed. The results shown that hydrolysis occurs to maximum rate up to 25 % of hydrolysis, after decreasing progressively. In the hydrolyzed are only detected molecules with polymerization degree between 2 and 8, being specially enriched in tetramer (70 % (w/w)) and impoverished in dimer and in the species with size ≥ 6 , when is compared with the most probable distribution. These results suggest that enzyme have a preferential attack mechanism and set the basis to the development of a structured model to prediction of kinetic and molecular weight distribution during pectic acid depolymerization.

Keywords: oligogalacturonides, pectic acid, endo-polygalacturonase, depolymerization.

● Introducción

En los últimos años ha sido ampliamente documentado que los oligogalacturónidos (OG) con grado de polimerización (gp) entre 10 y 15 presentan una potente actividad biológica en plantas /1/ y se les atribuye, además, valor prebiótico y como fibra dietética /2/. En el caso de nuestro país, investigadores del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas han evaluado exitosamente la aplicación de una mezcla de OG, conocida como *Pectimorf*, en varios cultivos de interés económico, así como en la micropropagación de tejidos vegetales /3/, observándose variados efectos tales como elicitación de las respuestas defensivas de las plantas frente a patógenos, estimulación de la rizogénesis, etcétera.

La obtención de estos OG requiere de preparados enzimáticos con elevada actividad endopoligalacturonasa (endoPG). En este sentido, se ha demostrado la factibilidad de producir nacionalmente preparados virtualmente puros de endoPG con la cepa de levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, en un proceso concomitante con la producción de etanol /4/.

Una próxima etapa encaminada a la obtención de estas biomoléculas implicaría el desarrollo de los reactores enzimáticos apropiados (ejemplo 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 la obtención del *Pectimorf*, usando un preparado enzimático comercial de origen fúngico donde coexisten actividades endo- y exopoligalacturonasa /5/, 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 /6-9/. 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 pequeños grados de avance de la reacción. Estos planteamientos adolecen de no considerar la influencia del gp del sustrato en la velocidad de la reacción, aspecto este de extrema importancia para el caso que nos ocupa, teniendo en cuenta que la obtención de OG de pequeña talla requiere de elevados grados de avance de la reacción (> 20 %).

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

Materiales y métodos

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 y col. /4/. Una vez centrifugado el cultivo durante 2 min para separar la biomasa, se filtró el sobrenadante a través de un filtro bacteriológico de 0,22 μm (Millipore, USA). Del filtrado se tomaron 5 mL, se incubaron en hielo durante 10 min, y se precipitó la enzima mediante la adición de etanol helado para una concentración del 75 % (v/v). Se centrifugó durante 5 min, y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol absoluto, y por último se disolvió en 5 mL de buffer acetato 50 mmol \cdot L⁻¹ pH 5. Se conservó en refrigeración a 4 °C.

Determinación de la actividad enzimática endoPG

Se siguió el procedimiento descrito por Serrat *et al.* /12/. 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 del incremento en el poder reductor del sustrato a 37 °C en 10 min, el

cual se evaluó mediante el método de Somogyi /10/ según la modificación desarrollada por Nelson /11/. La mezcla de reacción estuvo conformada por 400 mL de sustrato y 100 mL de una dilución apropiada de la enzima en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,0. Una unidad de actividad endoPG se definió como la cantidad de enzima que produce 1 mmol·min⁻¹ de extremos reductores (expresados como ácido galacturónico) bajo estas condiciones.

Hidrólisis enzimática del ácido péctico

Se utilizó como sustrato ácido péctico a una concentración de 20 g·L⁻¹ en buffer acetato 50 mmol · L⁻¹ (pH 5). La reacción se efectuó en un matraz de 500 mL de capacidad, provisto de tapa esmerilada y esterilizado térmicamente, 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.

La reacción enzimática se desarrolló en reposo a 37 °C. Se tomaron muestras de la mezcla reaccionante (5 mL) a diferentes intervalos de tiempo, bajo condiciones de asepsia. Estas se incubaron 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 /10, 11/.

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⁻¹ (pH 5), se le aplicaron 500 mL del hidrolizado correspondiente al final de la reacción enzimática y se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 5 mL · h⁻¹. Se colectaron fracciones de 0,5 mL hasta alcanzar un volumen total de la columna.

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 /13/ y la concentración de extremos reductores (expresada como concentración másica de ácido anhidrogacturónico) según el método de Somogyi-Nelson /10, 11/, utilizando en ambos casos ácido galacturónico (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:

$$X_n = \frac{\text{concentrac ión másica de ácidos urónicos } (\mu\text{g/mL})}{\text{concentrac ión de extremos reductores } (\mu\text{g/mL})} \quad (1)$$

$$W_i = \frac{c_i \cdot V_f}{c_o \cdot V_h} \quad (2)$$

donde c_i corresponde a las concentraciones másicas de ácidos urónicos en cada 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.

● Resultados y discusión

Cinética de la hidrólisis enzimática del ácido péctico

Como puede observarse en la figura 1, 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 /14/ para la poligalacturonasa de *Saccharomyces fragilis*, existen diferencias en cuanto al inicio y duración de estas fases y a la terminación de la reacción enzimática.

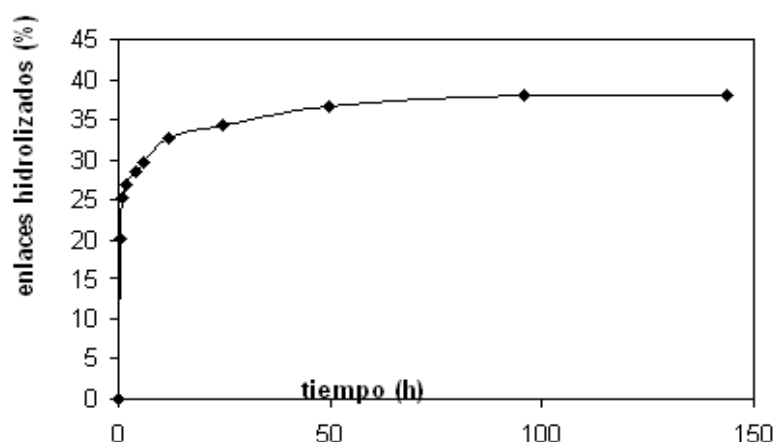


Fig. 1 Cinética de la hidrólisis enzimática del ácido péctico. Actividad poligalacturonasa: 0,2 U/mL, concentración de ácido péctico: 20 g/L.

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 encuentre 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 % (figura 2).

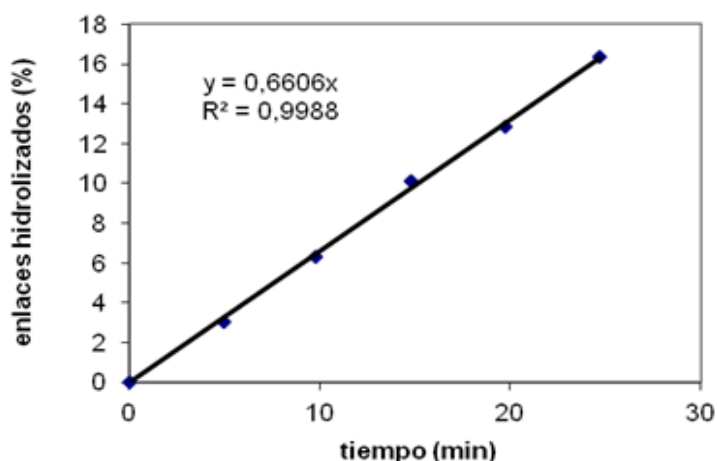


Fig. 2 Cinética de la hidrólisis enzimática del ácido péctico. Etapa lineal rápida de la reacción. Actividad poligalacturonasa: 0,2 U/mL, concentración de ácido péctico: 20 g/L.

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*.

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 péctínicos en soluciones acuosas presentan conformaciones extendidas (alargadas) /15/, 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 (figura 3), 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.

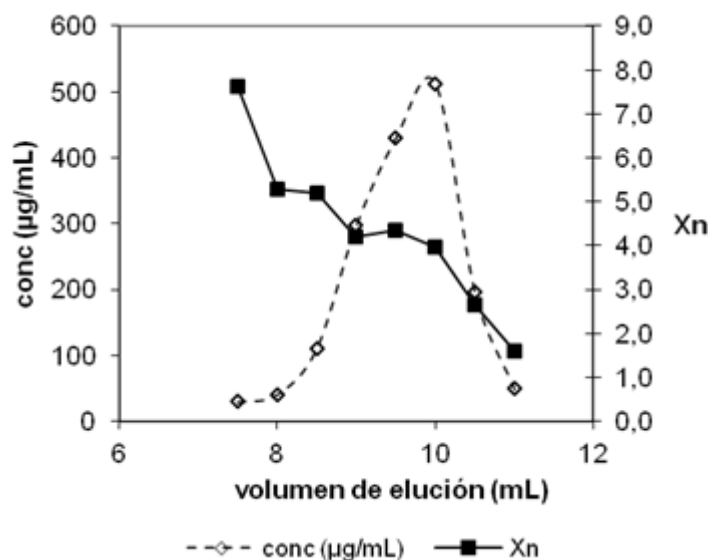


Fig. 3 Perfil de elución del hidrolizado de ácido péctico en Sephadex G-75. Buffer de elución: acetato 50 mM, pH 5; flujo: $5 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$. Conc ($\mu\text{g/mL}$), concentración de ácidos urónicos; Xn, gp promedio en número.

El hidrolizado de ácido péctico eluyó formando un pico único, con un pequeño "hombro". Los gp promedio de las fracciones estuvieron en el rango de 2 a 8 (figura 3), 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 /6/.

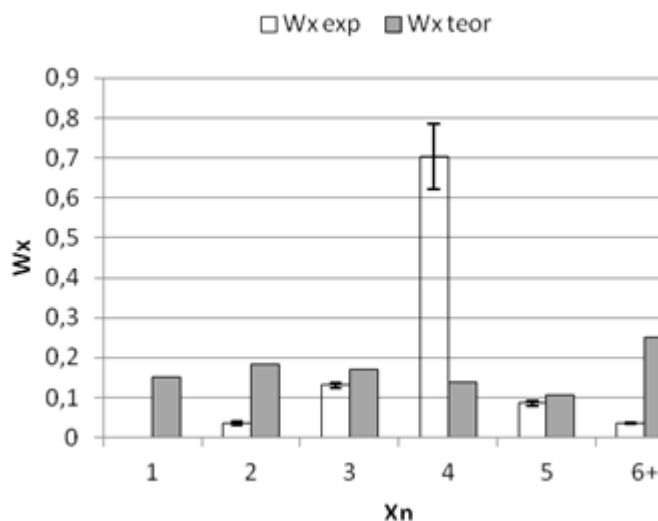


Fig. 4 Distribución de pesos moleculares (como fracciones en peso) experimental ($W_x \text{ exp}$) y teórica ($W_x \text{ teor}$). Barras de error corresponden a la desviación estándar en la determinación ($n=5$).

Distribución de pesos moleculares en el hidrolizado

En la figura 4 se presentan las distribuciones de masas moleculares experimental y teórica. Esta última se construyó sobre la base de la distribución más probable, asumiendo igual probabilidad de hidrólisis para todos los enlaces disponibles /6/ y que viene dada por la expresión:

$$W_x = \frac{X}{X_0} \cdot (1-p)^{X-1} \cdot p \quad (3)$$

donde W_x será la fracción en peso para una especie de gp X a un grado de avance de la reacción (fracción de enlaces disponibles que ha sido hidrolizada) p ; X_0 es el gp promedio en número del sustrato al inicio de la reacción (en este estudio = 73,2).

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 ≥ 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. Esto explica muy bien la acumulación observada para fragmentos con gp igual a 4, 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 péptico 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 subemplazamiento determinado, lo cual se hace evidente solo para avances de la reacción grandes /7/.

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 y trímero-trímero, respectivamente. Esto reduce la acción de la enzima a un único sitio 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 α -amilasas durante la hidrólisis del almidón /8/.



Conclusiones

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.



Bibliografía

1. 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.
2. LANG, C.; H. DÖRNENBURG. "Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, 53, 366-375.
3. GONZÁLEZ, O. S. *et al.* "Evaluación del efecto del Pectimorf en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de boniato clon CEMSA 78-354". *Biología Vegetal*. 2004, 4, 2, 115-119.
4. 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.
5. CABRERA, J. C. "Obtención de (1,4) α -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.
6. SENDRA, J. M., J. V. CARBONELL. "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.
7. CARBONELL, J. V. *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 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan/ *Endo*-(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucanase System". *Biotechnology and Bioengineering*. 1998, 60, 1, 105-113.
8. WOJCIECHOWSKI, P. M. *et al.* "Iteration Model of Starch Hydrolysis by Amylolytic enzymes". *Biotechnology and Bioengineering*. 2001, 75, 5, 530-539.
9. 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.
10. SOMOGYI, M. "Notes on Sugar Determination". *Journal of Biological Chemistry*. 1952, 195, 19-23.
11. NELSON, N. J. "Colorimetric analysis of sugars". *En Methods of Enzymology*. S.P. Colowick y N.O Kaplan (Editores). New York: Academic Press, 1957. Vol. 3, 85-86.
12. SERRAT, M. *et al.* "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.
13. DEKKER R., F.H.; G.N. RICHARDS. "Determination of Pectic Substances in Plant Material". *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1972, 23, 475-483.
14. LUH, B. S.; H. J. PHAFF. "Properties of yeast polygalacturonase". *Arch. Biochem. Biophys.* 1954, 48, 23-37.
15. OWENS, H. S. *et al.* "Shape and Size of Pectinic Acid Molecules Deduced from Viscometric Measurements". *Journal of the American Chemical Society*. 1946, 68, 1628-1632.