

ESTANDARIZACION DE UN METODO PARA DETECTAR BAJOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE ENZIMAS PECTICAS.

Gerardo Pérez G. y Patricia Martínez
Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química,
Universidad Nacional, Bogotá.

Keywords: Pectolytic Activity, Hypoyodite Method, Viscosimetric Method, Pectic Enzymes.

RESUMEN

En este trabajo se realizó un estudio minucioso de dos métodos normalmente utilizados para la detección de actividad pectolítica (Método del Hipoyodito y Método Viscosimétrico), introduciendo modificaciones en cada una de las técnicas hasta lograr los niveles de sensibilidad requeridos para la detección de una baja actividad.

Se establecieron los límites de detección y algunas condiciones experimentales para la cuantificación de actividad pectolítica por el Método del Hipoyodito empleando los procedimientos de Jansen y McDonnell y semimicro de Jansen y MacDonnell (1,2). El rango de micromoles de grupo reductor que puede ser cuantificado por el Método de Jansen y MacDonnell, en las condiciones empleadas, es de 8,0 a 90,0. Por el método semimicro es posible cuantificar de 2,0 a 20,0 micromoles de grupo reductor y el tiempo mínimo requerido en dicho rango para la reacción total es de 15 minutos a temperatura ambiente.

Se establecieron las condiciones de trabajo para detectar (por el método del hipoyodito) la producción de 0,5-2,0 micromoles de grupo reductor incrementando significativamente su sensibilidad.

En las condiciones experimentales establecidas para el Método Viscosimétrico (Método II (V2)) se aumentó notablemente la posibilidad de detectar bajos niveles de actividad pectolítica.

ABSTRACT

The hypoyodite and viscosimetric methods are currently used for the detection of pectolytic activity; this work describes several modifications of each method to achieve the necessary sensitivity levels to detect low pectolytic activities. With some modifications the hypoyodite method described by H.S. Owens, et al (1), allows to quantify between 8,0 and 90,0 μmols of reducing groups (GR). For the semimicro method (2) it was established that in the range 2,0-20,0 μ

mols, 15 minutes of reaction are needed for completeness of reaction. Further more a method for the detection of 0,5-2,0 μ mols was set up.

Various experimental conditions were assayed with regard to the viscosimetric method; it allows to detect low levels of pectolytic activity.

1. INTRODUCCION

En la actualidad existen varios métodos que permiten medir o detectar una actividad pectolítica general, como son: El método de la placa de agar, la medida de los grupos reductores formados y la medida del cambio de viscosidad del sustrato.

Por el método de la placa de agar es posible detectar la hidrólisis de un sustrato péctico incorporado en un medio agarizado, observando las zonas translúcidas que aparecen sobre la superficie del medio, como resultado de la hidrólisis enzimática (3,4). Sin embargo, este método no es muy confiable puesto que en algunos casos cuando se pretende detectar la acción de celulasas se han obtenido resultados falsos positivos en los controles, debido probablemente a la hidrólisis de los componentes del agar (4,5).

De otro lado, las glicosidasas y liasas pécticas actúan sobre el ácido poligalacturónico y sus ésteres metílicos degradándolos mediante la ruptura hidrolítica o trans-eliminativa de los enlaces glicosídicos α -1,4, originando oligourónidos o monómeros que presentan grupos reductores libres; por tanto, la medida del incremento del poder reductor ha sido ampliamente usada para determinar actividad pectolítica (6-11). Para la cuantificación de los grupos reductores formados se ha utilizado el hipoyodito de sodio, puesto que bajo condiciones cuidadosamente controladas y en ausencia de interferencias la reacción procede en forma estequiométrica (12).

El método del hipoyodito de Willstatter-Schudell, modificado por Jansen y MacDonnell y el método semimicro de Jansen y MacDonnell han sido muy utilizados (1,2,7,9-11,13), pero no se han establecido los límites de detección en cada uno de estos métodos.

La medida de los cambios de viscosidad de las soluciones de sustancias pécticas ha sido extensamente utilizada en trabajos de investigación para estudiar su ruptura química o enzimática (4,9,11,13-19). Este cambio es un indicativo muy sensible de la acción pectolítica, pero desafortunadamente la interpretación cuantitativa de los resultados es muy difícil (20) puesto que a medida que transcurre la hidrólisis de un sustrato péctico se originan oligourónidos de diferente tamaño y además algunas enzimas pécticas como la Endopoligalacturonasa presentan diferentes velocidades de hidrólisis sobre sustratos de diferente tamaño, lo que origina una compleja relación entre el porcentaje de caída de la viscosidad y la cantidad de enzima presente (9).

En el presente trabajo, se establecieron los límites de detección de los métodos macro y semimicro del hipoyodito, se comparó la sensibilidad de los métodos semimicro del hipoyodito y viscosimétrico en la detección de actividad pectolítica y por último se diseñó un viscosímetro que permite la detección de bajos niveles de actividad pectolítica.

2. METODOS

2.1. Método del Hipoyodito

Para estandarizar el método de detección de actividad pectolítica se ensayaron, en primer término, dos modalidades del método del hipoyodito: El método de Jansen y MacDonnell (1,11) y el método semimicro de Jansen y MacDonnell (2). Además, se trató de establecer una tercera modalidad. En el presente trabajo se hace referencia a cada uno de estos métodos como Método IA, Método IB y Método IC respectivamente.

Para establecer el rango de micromoles de grupo reductor (MGR) que puede ser determinado por cada uno de dichos métodos, se usó en todos los casos, una solución acuosa de ácido galacturónico como patrón, el tampón pH 5,0 fue Acetato de Sodio 0,1M y las soluciones de yodo y tiosulfato de sodio se prepararon y estandarizaron como lo describen Fischer y Peters. Igualmente, la solución indicadora de almidón se preparó y utilizó de acuerdo con las precauciones anotadas por estos autores (21).

La titulación del yodo residual se efectuó con tiosulfato de sodio utilizando una microbureta de 10 ml y empleando solución de almidón como indicador. Cada determinación se llevó a cabo por duplicado utilizando simultáneamente un blanco de reacción en las mismas condiciones empleadas con la muestra, usando el tampón pH 5.0.

—Establecimiento del rango de micromoles de grupo reductor que puede ser determinado por el Método IA:

A alícuotas de solución de ácido galacturónico que contenían entre 8,0 y 125 micromoles se les adicionó el volumen suficiente de tampón pH 5,0 para completar 5,17 ml y 0,9 ml de Na_2CO_3 1M. A esta mezcla se le agregaron 5,0 ml de I_2 0,1N, se agitó vigorosamente y se dejó reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente en erlenmeyers de tapa rosca. Posteriormente se acidificó con 2,0 ml de H_2SO_4 2M para liberar el yodo residual y se tituló con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,05N.

—Establecimiento del rango de micromoles de grupo reductor que puede ser determinado por el Método IB y determinación del tiempo mínimo de reacción:

A alícuotas de solución de ácido galacturónico que contenían entre 2,0 y 25,0 micromoles se les adicionó tampón pH 5,0 hasta completar 5,17 ml. Sobre esta solución se agregaron 0,6 ml de Na_2CO_3 1M y 2,0 ml de I_2 0,05N. Una vez fina-

lizada la reacción con yodo, la mezcla de reacción se acidificó con 0,7 ml de H_2SO_4 2M y el yodo liberado se tituló con $Na_2S_2O_3$ 0,0125N.

Para la determinación del tiempo mínimo requerido para la reacción con yodo se emplearon tiempos de reacción comprendidos entre 5 y 30 minutos a temperatura ambiente.

—Establecimiento de las condiciones requeridas para la reacción de 0,5-2,0 micromoles de grupo reductor por el Método del Hipoyodito (Método IC):

Con el fin de establecer las condiciones requeridas para la reacción de 0,5-2,0 micromoles de grupo reductor se realizaron varios ensayos empleando en todos los casos 0,5-2,0 micromoles de ácido galacturónico en 5,17 ml de tampón pH 5,0 y siguiendo un procedimiento análogo al descrito para el Método IA. Las variaciones introducidas en cada uno de los ensayos se indican en la Tabla 1. Para la titulación del yodo residual se empleó en cada caso $Na_2S_2O_3$ 0,0010N.

TABLA 1
CONDICIONES EXPERIMENTALES ENSAYADAS PARA EL
ESTABLECIMIENTO DEL METODO IC

Ensayo	Na_2CO_3 1M (ml)	I_2 (meq)	Tiempo de Reacción t/r (min)	H_2SO_4 2M (ml)
1	0,45	0,010	20	0,50
2	0,45	0,010	30	0,50
3	0,50	0,024	20	0,55
4	1,15	0,010	20	1,45

2.1.1. Determinación de actividad pectolítica por el Método IB del hipoyodito.

Para establecer la sensibilidad del método semimicro del hipoyodito (Método IB) en la detección de actividad pectolítica, se determinó por duplicado la actividad de dos soluciones de enzima patrón (Pectinex, Novo) de diferente concentración proteica (Solución a (661 $\mu g/ml$) y Solución b (6,7 $\mu g/ml$)):

—Actividad de la Solución a de Pectinex:

Se midió la liberación de grupos reductores cada 15 minutos durante 90 minutos de reacción a 30°C a partir de una mezcla que contenía: 5 ml de Pectina NF al 0,5% (p/v) en solución tampón pH 5,0 y 0,170 ml de Solución a de Pectinex. Como blancos de reacción se usaron 5,0 ml de Pectina NF al 0,5% (p/v) en tampón pH 5,0 con 0,170 ml de Solución a de Pectinex inactiva, y 5,17 ml de tampón pH 5,0.

—Actividad de la Solución b de Pectinex:

Se midió la liberación de grupos reductores a los 30, 60 y 120 minutos de reac-

ción a 30°C a partir de una mezcla análoga a la anterior utilizando la Solución b de Pectinex.

2.2. Método Viscosimétrico

La determinación de actividad pectolítica por el Método Viscosimétrico (Método II) se realizó por duplicado en un viscosímetro de nivel suspendido (V1) cuyas características se presentan en la Tabla 5. La actividad enzimática determinada por este método, se suele expresar como porcentaje de caída de la viscosidad (4,9,16-18).

El porcentaje de caída de la viscosidad del sustrato en una mezcla de reacción Enizma-Sustrato después de determinado período de reacción, ha sido definido por Robotz et al., según lo reportan Mill y Tuttobello (9) como:

$$\% A = \frac{V_0 - V_t}{V_0 - V_s} \times 100$$

en donde:

% A : Porcentaje de caída de la viscosidad.

V_t : Tiempo de flujo en segundos del sustrato más la enzima activa.

V_0 : Tiempo de flujo en segundos del sustrato más la enzima inactivada por calentamiento.

V_s : Tiempo de flujo en segundos del solvente más la enzima inactivada por calentamiento.

El cálculo de la caída de viscosidad del sustrato en la mezcla de reacción enzima-sustrato empleando la expresión:

$$\% A' = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100$$

permite obtener un indicativo de la actividad enzimática en los casos en que no es posible determinar V_s .

2.2.1. Determinación de actividad pectolítica por el Método Viscosimétrico (Método II).

Para medir la caída de viscosidad del sustrato durante el transcurso de la reacción enzimática, se carga el viscosímetro con la solución de sustrato preparada con doce horas de anterioridad y mantenida a 4°C hasta el momento de su uso; se equilibra a 30°C y se adiciona la enzima activa. Una vez homogenizada la mezcla de reacción dentro del viscosímetro, se procede a medir el tiempo de flujo de la mezcla (V_t) durante determinado período de reacción, a intervalos de tiempo. El momento en que se adiciona la enzima, se considera el tiempo cero de reacción.

La caída de viscosidad del sustrato por adición de la enzima inactiva (V_0) se de-

termina siguiendo el mismo procedimiento anterior, efectuando la medida de los tiempos de flujo durante el mismo período de reacción y a iguales intervalos de tiempo.

Para determinar V_S se carga el viscosímetro con la solución tampón empleada en la preparación de la solución de sustrato y una vez equilibrada a 30°C, se adiciona la enzima inactiva, se homogeniza la mezcla y se toma el tiempo de flujo.

La medida de los tiempos de flujo en cada caso (V_t , V_0 y V_S) se realiza de la forma indicada por Romero et al. (22).

Siguiendo el procedimiento antes descrito se determinó la actividad de la Solución b de Pectinex, en el viscosímetro V1, en una mezcla de reacción que contenía 30 ml de Pectina NF al 0,5% (p/v) en tampón pH 5,0 y 1,02 ml de la Solución b de Pectinex. A partir del tiempo cero de reacción, se tomó el tiempo de flujo de la mezcla (V_t) cada 15 minutos, durante 120 minutos de reacción a 30°C. Posteriormente se determinaron los tiempos de flujo para el blanco de reacción (V_0) y V_S .

2.2.2. Diseño del viscosímetro V2 y determinación de los volúmenes de trabajo y los tiempos de flujo mínimo y máximo.

Para mejorar la determinación de actividad pectolítica por el método viscosimétrico, se diseñó el viscosímetro V2 de tal forma que se tuviera un volumen de trabajo aproximadamente de 10 ml y los tiempos de flujo mínimo y máximo se encontrarán alrededor de 30 y 150 segundos respectivamente, para las condiciones del sistema en estudio.

El volumen de trabajo del viscosímetro V2 (ejemplares V21, V22 y V23) se determinó cargando cada uno de los ejemplares con diferentes volúmenes de agua destilada y se establecieron los volúmenes mínimo y máximo, con los que es posible realizar en forma correcta la medida de los tiempos de flujo. Posteriormente se determinaron, con cada uno de los ejemplares, los tiempos de flujo a 30°C de la solución tampón de acetato de sodio 0,1M pH 5,0 y de una solución de pectina NF al 0,5% (p/v) en solución tampón pH 5,0. En cada viscosímetro se realizaron 10 determinaciones de los tiempos de flujo de cada una de estas soluciones.

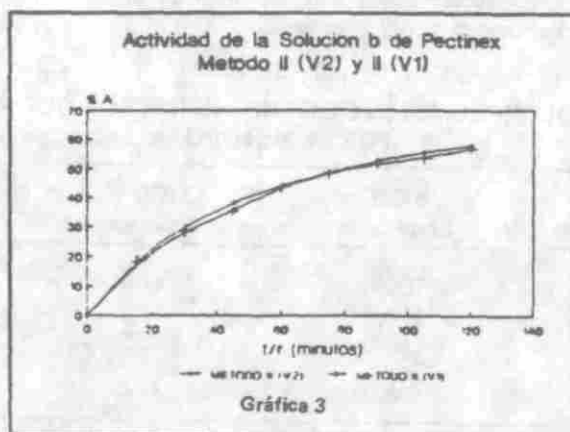
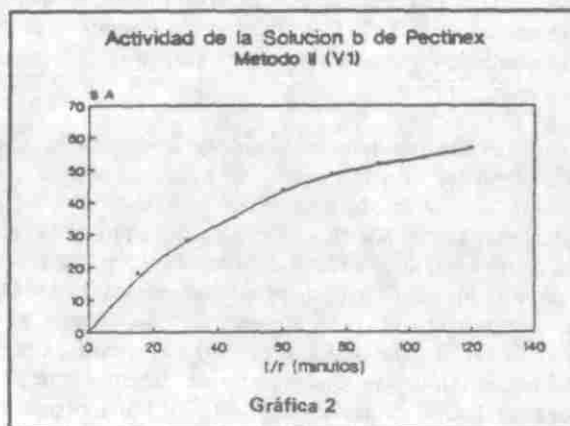
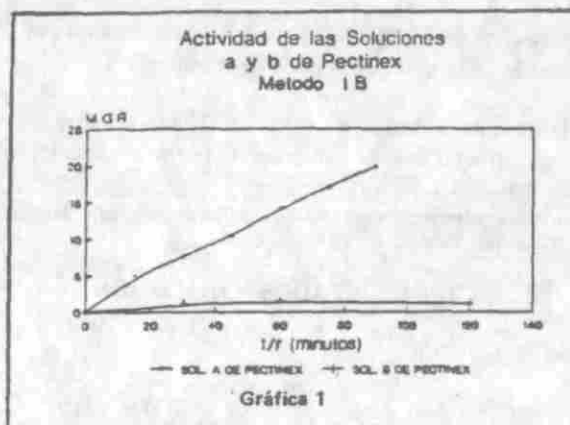
Para la medida del tiempo de flujo de la pectina, se preparó la solución con doce horas de anterioridad y se mantuvo a 4°C hasta el momento de su uso.

Los tiempos de flujo de la solución tampón (tiempo mínimo) y de la pectina (tiempo máximo) se midieron paralelamente en el viscosímetro V1 a fin de compararlos con los obtenidos en los viscosímetros V2.

2.2.3. Determinación de la actividad de la Solución b de Pectinex por el Método II en el Viscosímetro V2.*

Siguiendo el procedimiento descrito en 2.2.1, se determinó la actividad de la

Solución b en Pectinex, en una mezcla de reacción que contenía 12 ml de pectina NF al 0,5% (p/v) en tampón pH 5,0 y 0,41 ml de Solución b de Pectinex.



El blanco de reacción contenía 12 ml de pectina NF al 0,5% en tampón pH 5,0 y 0,41 ml de la Solución b de Pectinex inactivada por calentamiento.

Para la determinación de V_s se emplearon 12 ml de tampón pH 5,0 y 0,41 ml de la Solución b de Pectinex inactivada por calentamiento.

Los tiempos de flujo de la mezcla de reacción (V_t) y del blanco (V_o) se midieron a partir del momento en que se adicionó la enzima, cada 15 minutos durante 120 minutos de reacción a 30°C.

* En adelante se hace referencia a las determinaciones realizadas por el Método II en el Viscosímetro V2 como: Método II (V2).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Método del Hipoyodito

Para estandarizar el método de detección de actividad pectolítica se estableció, en primer lugar, el rango de micromoles de grupo reductor que puede ser determinado por los métodos de Jansen y MacDonnell y semimicro de Jansen y MacDonnell en las condiciones descritas en la literatura (1,2,11), utilizando un volumen de muestra de 5,17 ml.

De acuerdo con la estequiometría de la reacción de las aldosas con el hipoyodito y considerando el exceso de yodo requerido para que ocurra la oxidación completa de éstas (12,20), la máxima cantidad de micromoles de grupo reductor que puede reaccionar por el Método IA es 125. Sin embargo, al emplear esta cantidad sólo reaccionó el 91,2% (Tabla 2). Por tal razón, para establecer la máxima cantidad de micromoles de grupo reductor que reacciona totalmente por este método, se disminuyó la cantidad empleada hasta obtener aproximadamente un 100% de reacción, lo cual se logró con 90 micromoles. Con 8,0 micromoles de grupo reductor, mínima cantidad que puede determinarse por el Método IA (23), se obtuvo un 100% de reacción (Tabla 2). Por tanto, el rango de micromoles de grupo reductor que puede ser determinado por el Método IA en las condiciones mencionadas en 2.1, es de 8,0 a 90,0.

TABLA 2
RANGO DE MICROMOLES DE GRUPO REDUCTOR QUE REACCIONA
POR EL METODO IA

MGR a Determinar	MGR Empleadas	MGR que Reaccionan*	% MGR que Reacciona
Máxima	125,0	114,00	91,2
	100,0	94,50	94,5
	90,0	86,75	96,4
Mínima	8,0	8,00	100,0

* Promedio de dos determinaciones.

Dado que se requiere disponer de un método que permita detectar bajas cantidades de enzima con actividad pectolítica, es indispensable trabajar con una modalidad del método del hipoyodito con la que se pueda determinar la producción de menos de 8,0 micromoles de grupo reductor. Por tal razón, se estableció el rango de micromoles de grupo reductor que puede determinarse por el método semimicro del hipoyodito (Método IB).

Considerando la estequiometría de la reacción y el requerimiento de yodo en la oxidación de las aldosas por el hipoyodito (12,20), la máxima cantidad de micromoles de grupo reductor que puede reaccionar en las condiciones del Método IB es 25. Sin embargo, al emplear dicha cantidad, sólo reaccionó el 93% al cabo de 20 minutos en las condiciones descritas en la literatura (2) (Tabla 3). Por tanto, para establecer la máxima cantidad de micromoles de grupo reductor que reacciona totalmente por este método, se ensayó la utilización de 20 micromoles y se determinó el porcentaje que reaccionó al cabo de diferentes tiempos.

De los resultados que se presentan en la tabla 3 se deduce que se requieren 15 minutos de reacción con el yodo, para lograr que las 20 micromoles de ácido galacturónico ensayadas reaccionen totalmente.

La mínima cantidad de micromoles de grupo reductor que se puede determinar por el Método IB es 2,0 (23). Esta cantidad reacciona con el yodo, al igual que las 20 micromoles, en 15 minutos (Tabla 3).

En conclusión, el rango de micromoles de grupo reductor que puede ser determinado por el Método IB en las condiciones mencionadas en 2.1, es de 2,0 a 20,0 y el tiempo mínimo requerido para la reacción total de dicho rango de micromoles es de 15 minutos.

TABLA 3
RANGO DE MICROMOLES DE GRUPO REDUCTOR QUE REACCIONA
POR EL METODO IB Y TIEMPO REQUERIDO PARA LA REACCION
CON YODO

MGR a Determinar	MGR Empleadas	Tiempo de Reacción (min) t/r	MGR que Reaccionan*	% MGR que Reacciona
	25,0	20	23,25	93,00
Máxima	20,0	5	15,75	78,75
	20,0	10	18,25	91,25
	20,0	15	20,00	100,00
	20,0	20	20,00	100,00
	20,0	30	19,75	98,75
Mínima	2,0	15	2,00	100,00

* Promedio de dos-tres determinaciones.

Para determinar la menor cantidad de grupos reductores cuantificables por el método de hipoyodito, se trataron de establecer las condiciones requeridas para la reacción de 0,5-2,0 micromoles de grupo reductor (Método IC).

Para los ensayos 1 y 2 del Método IC, se utilizó 2,5 veces la cantidad de yodo requerido para la oxidación de 2,0 micromoles de grupo reductor (23) y para las reacciones de oxidación y posterior liberación del yodo residual, se emplearon las concentraciones de Na_2CO_3 y H_2SO_4 utilizadas en el Método IB (2). En el ensayo 1 (Tabla 4), después de 20 minutos de reacción con yodo, sólo reaccionó el 45% de 2,0 micromoles de grupo reductor y aproximadamente un 65% de 0,5 y 1,0 micromol. Con el fin de lograr un mayor grado de reacción se realizaron varias modificaciones en el método (Tabla 4), tales como: aumentar el tiempo de reacción con yodo (Ensayo 2), utilizar 6 veces la cantidad de yodo requerido para la reacción (Ensayo 3) y aumentar el pH durante la reacción con yodo (Ensayo 4). En el ensayo 2, como era de esperar, reaccionó una cantidad de micromoles ligeramente mayor que en el ensayo 1 (Tabla 4), pero no se obtuvo un 100% de reacción.

El empleo de un mayor exceso de yodo en el ensayo 3 no resultó favorable, puesto que no produjo un aumento del porcentaje de reacción de las micromoles de grupo reductor con respecto al obtenido en el ensayo 2 y además los mayores volúmenes de titulación que se emplearon en este caso, dificultaron la detección del punto final en la titulación del yodo residual. Al aumentar el pH de la reacción hasta aproximadamente 10,4 (Ensayo 4) se pierde la estequiometría de la reacción.

Los resultados obtenidos indican que las condiciones del ensayo 2 (Método IC) son las más adecuadas para detectar la producción de menos de 2,0 micromoles de grupo reductor, aunque éstas no reaccionen en su totalidad.

En resumen, para la determinación de actividad pectolítica por el método del hipoyodito se dispone de tres modalidades: Método IA, Método IB y Método IC, con las cuales se puede cuantificar la producción de 2,0 a 90,0 micromoles de grupo reductor y detectar la producción de cantidades tan pequeñas como 0,5 micromoles.

Una vez estandarizadas las condiciones de trabajo con el método del hipoyodito, se estableció la sensibilidad del Método IB en la detección de actividad pectolítica, determinando la actividad de las Soluciones a y b de Pectinex.

Como se observa en la Gráfica 1, la actividad de la Solución a de Pectinex se puede determinar por el Método IB. Cuando se utiliza la Solución b de Pectinex, cuya concentración de proteína es aproximadamente 100 veces menor que la de la Solución a (ver 2.1.1), aunque es posible detectar la actividad enzimática puesto que se observa la producción grupos reductores, la extensión de la hidrólisis de la pectina al cabo de 120 minutos de reacción es tan pequeña, que no es distinguible por este método, de la obtenida a los 30 minutos de la reacción. Estos resultados indican que para seguir el curso de la degradación de la pectina por

TABLA 4
MICROMOLES DE GRUPO REDUCTOR QUE REACCIONAN POR EL
METODO IC EN LAS DIFERENTES CONDICIONES ENSAYADAS

Ensayos	MGR empleadas	MGR que reaccionan ^(a)	% MGR que reacciona
ENSAYO 1			
Condiciones:			
I ₂ : 0,01 meq.	2,0	0,90	45,0
(b) CO ₃ ⁻ : 0,08M (pH 9,96)	1,0	0,65	65,0
t/r: 20'	0,5	0,32	64,0
(c)H ⁺ : 0,16M (pH 1,80)			
ENSAYO 2			
Condiciones:			
I ₂ : 0,01 meq.	2,0	1,10	55,0
(b)CO ₃ ⁻ : 0,08M	1,0	0,67	67,0
t/r: 30'	0,5	0,37	74,0
(c)H ⁺ : 0,16M			
ENSAYO 3			
Condiciones:			
I ₂ : 0,024 meq.	2,0	1,15	57,5
(b)CO ₃ ⁻ : 0,08M (pH 10,04)	1,0	0,62	62,0
t/r: 20'	0,5	0,35	70,0
(c)H ⁺ : 0,16M (pH 1,80)			
ENSAYO 4			
Condiciones:			
I ₂ : 0,01 meq.	2,0	4,25	—
(b): CO ₃ ⁻ : 0,18M (pH 10,38)	1,0	3,25	—
t/r: 20'	0,5	1,02	—
(c):H ⁺ : 0,36M (pH 1,60)			

(a) : Promedio de dos determinaciones.

(b) : CO₃⁻ : Concentración del Na₂CO₃ y pH en la reacción de oxidación de los grupos reductores.

(c) : H⁺ : Concentración del H₂SO₄ y pH en la reacción de liberación del yodo residual.

cantidades muy bajas de enzima (caso de la Solución b de Pectinex), se requiere un método más sensible.

Aunque el Método IC (con las condiciones establecidas), es lo suficientemente sensible para detectar la producción de menos de 2,0 micromoles de grupo reductor, no fue posible aplicarlo para seguir la degradación enzimática de la pectina por acción de la Solución b, de Pectinex, puesto que en dicho proceso en el blanco de reacción de la pectina se obtienen valores superiores a 2,0 MGR (23).

3.2. Método Viscosimétrico

De los sistemas descritos en la literatura para calcular el porcentaje de caída de la viscosidad del sustrato por acción de las pectinasas (9,24), se seleccionó el establecido por Robotz et al. (numeral 2.2), puesto que en este se elimina la caída de la viscosidad que pueda sufrir el sustrato por cualquier factor ajeno a la actividad enzimática, lo cual no se considera en el sistema definido por Ljunggren y Fahraeus (24).

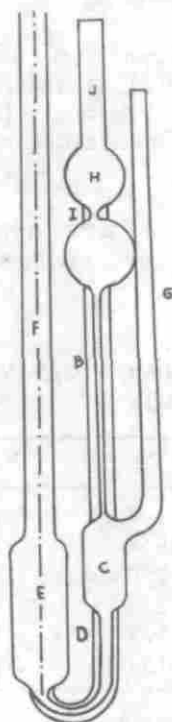
Los resultados obtenidos en la determinación de actividad de la Solución b de Pectinex por el Método Viscosimétrico (Método II) se muestran en la Gráfica 2. El empleo del Método II para determinar la actividad de la Solución b de Pectinex, permite detectar claramente el progreso de la hidrólisis enzimática de la pectina en el período comprendido entre 30 y 120 minutos de reacción (Gráfica 2). Dicha transformación del sustrato, no se pudo apreciar con el Método IB bajo las mismas condiciones de reacción (ver Gráfica 1), lo que indica la mayor sensibilidad del método viscosimétrico. Por esta razón, se seleccionó este último (Método II) como el más adecuado para detectar bajos niveles de actividad pectolítica. Sin embargo, es necesario considerar lo siguiente:

- a. Los tiempos de flujo obtenidos para el sistema en estudio con el viscosímetro utilizado (Viscosímetro V1) son muy bajos (mínimo alrededor de 11 segundos y máximo alrededor de 50 segundos) y por lo tanto el error involucrado en la medida puede ser grande.
- b. En el Viscosímetro V1 se presenta una alta dilución de la solución enzimática ensayada (31 veces), debido al volumen de muestra que se requiere para su empleo. Esto reduce significativamente la posibilidad de detectar la actividad enzimática de interés.

Por lo tanto para mejorar la detección de actividad pectolítica por el Método Viscosimétrico, es necesario trabajar con un viscosímetro en el que se obtengan mayores tiempos de flujo para tener mayor confiabilidad en los resultados y en el que además se requiera un menor volumen de muestra para su empleo.

Para satisfacer los requerimientos mencionados, se diseñó el Viscosímetro V2 de acuerdo con las especificaciones que aparecen en la Figura 1.

ESPECIFICACIONES CORRESPONDIENTES AL DISEÑO DE VISCOSIMETRO V2



- CAMARA A:** — Volumen: 5,0 ml
— ϕ interno: aprox. 2,12 cm.
- TUBO CAPILAR B:** — ϕ interno: aprox. 1 mm
— ϕ externo: aprox. 7 a 8 cm
— longitud: 6,5 cm
- CAMARA C:** — Volumen: 2,0 ml
— ϕ interno: aprox. 10 mm
— longitud: 2,5 cm
- TUBO D:** — Tubo capilar de pared gruesa
— ϕ interno: aprox. 2 mm
- CAMARA E:** — Volumen: 9,0 ml
— ϕ interno: aprox. 1,6 cm
— longitud: 4,5 cm
- TUBO F:** — ϕ interno: aprox. 7 a 8 mm
— longitud: 17,0 cm
- TUBO LATERAL G:** — ϕ interno: aprox. 5 mm
— longitud: 13 a 14 cm
- CAMARA H:** — Volumen: aprox. 3,0 ml
— ϕ interno: aprox. 1,8 cm
- TUBO I:** — Capilar aprox. 1 mm de ϕ interno
— longitud: aprox. 4 cm.

Los volúmenes de trabajo y los tiempos de flujo mínimo y máximo de cada uno de los ejemplares del Viscosímetro V2 construidos para el desarrollo del trabajo (V2₁, V2₂ y V2₃) se muestran en la Tabla 5, en la que se observa que los tiempos de flujo mínimo y máximo en los Viscosímetros V2₁, V2₂ y V2₃, aumentan aproximadamente por un factor de 3 con respecto a los que se obtienen en el Viscosímetro V1. Esto implica que en los viscosímetros V2, se aumenta igualmente por un factor de 3 la caída del tiempo de flujo que se produce como consecuencia de la reducción de viscosidad de un sustrato péctico por hidrólisis enzimática. Esto permite obtener resultados más confiables en los viscosímetros V2, en los casos en que se produzcan bajas reducciones de viscosidad debido a pequeñas cantidades de enzima(s) con actividad pectolítica.

Otro factor que favorece la posibilidad de detectar bajos niveles de actividad pectolítica en los Viscosímetros V2, es que el volumen de muestra requerido para su empleo es considerablemente menor que el requerido en el Viscosímetro V1 (ver Tabla 5), lo que reduce la dilución de la muestra a ensayar.

Por otra parte como se observa en la Gráfica 3, la determinación de actividad de la Solución b de Pectínex en el Viscosímetro V2 (Método II (V2)) produce resultados muy similares a los obtenidos con el Viscosímetro V1 (Método II (V1)) como era de esperar; sin embargo, se obtiene mayor precisión en las determinaciones realizadas en el Viscosímetro V2 (23).

El conjunto de razones expuestas muestra cómo el empleo del Método Viscosimétrico con el Viscosímetro V2 (Método II (V2)) aumenta significativamente la posibilidad de detectar bajos niveles de actividad pectolítica.

TABLA 5
VOLUMENES DE TRABAJO Y TIEMPOS DE FLUJO MÍNIMO Y MÁXIMO
EN LOS VISCOSÍMETROS V1, V2₁, V2₂ Y V2₃.

Viscosímetro*	V1	V2 ₁	V2 ₂	V2 ₃
T _f Mínimo (seg)**	10,60	31,30	31,50	31,60
T _f Máximo (seg)***	48,05	150,20	138,90	157,30
T _f Mínimo (seg) V2/V1	—	2,95	2,97	2,98
T _f Máximo (seg) V2/V1	—	3,13	2,89	3,27
Volumen Mínimo (ml)	30,0	12,0	12,0	12,0
Volumen Máximo (ml)	31,1	13,0	13,0	13,0

* Los viscosímetros V1, V2₁, V2₂ y V2₃ son viscosímetros de nivel suspendido.

** T_f Mínimo (seg): tiempo de flujo en segundos a 30°C de la solución tampón de acetato de sodio 0,1M, pH 5,0.

*** T_f Máximo (seg): tiempo de flujo en segundos a 30°C de la solución de pectina NF al 0,5% (p/v) en solución tampón pH 5,0.

Estos tiempos de flujo son el promedio de 10 determinaciones sobre una misma preparación de solución tampón y pectina.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos al Programa de Posgrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Química de la misma institución, por la ayuda prestada para la realización del trabajo y al doctor Alfredo Gómez, Profesor del Departamento de Química de la Universidad Nacional, por facilitar las instalaciones de laboratorio y contribuir para el desarrollo de la parte correspondiente a Viscosimetría.

BIBLIOGRAFIA

1. H.S. OWENS, R.M. McCREADY, A.D. SHEPHEARD, T.H. SCHULTZ, E.L. PUPPEN, H.A. SWENSON, J.C. MIERS, R.F. ERLANDSEN, and W.D. MACCLAY, "Methods used at the western Regional Research Laboratory for extraction and analysis of pectic material", Circ. U.S. Dep. Agric., AIC, 1952. 340.

2. D.S. PATEL, and H.J. PHAFF, *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 237.
3. D.H. HUBBELL, V.M. MORALES, and M. UMALI GARCIA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, 35, 210.
4. E. MARTINEZ-MOLINA, V.M. MORALES, and D.H. HUBBELL, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, 38, 1186.
5. W.D. BAUER, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1981, 32, 407.
6. D.F. BATEMAN, and R.L. MILLAR, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1966, 4, 119.
7. R.D. EDSTROM, and H.J. PHAFF, *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 2403.
8. J.D. MACMILLAN, and H.J. PHAFF, *Meth. Enzymol.* 1966, 8, 632.
9. P.J. MILL, and R. TUTTOBELLO, *Biochem. J.* 1967, 79, 57.
10. S. NASUNO, and M.P. STARR, *Biochem. J.* 1967, 104, 178.
11. H.J. PHAFF, *Meth. Enzymol.* 1966, 8, 636.
12. W. PIGMAN, "The carbohydrates. Chemistry, biochemistry, physiology" Academic Press, New York, p. 612-618, 1957.
13. R.D. EDSTROM, and H.J. PHAFF, *J. Biol. Chem.* 1964, 239, 2409.
14. J.J. DOESBURG, "Pectic substances in fresh and preserved fruits and vegetables", Institute for research on storage and processing of horticultural produce. Communication Nr. 25, p. 9-11, 29-31. 1965.
15. G. FAHRAEUS, and K. SAHLMAN, *Annl. Acad. Reg. Sci. Upsaliensis*, 1976, 20, 103.
16. W.J. HUNTER, and G.H. ELKAN, *Can. J. Microbiol.* 1975, 21, 1254.
17. T.T. LILLICH, and G.H. ELKAN, *Can. J. Microbiol.* 1968, 14, 617.
18. J.D. MACMILLAN, and R.C. COOKE, *Can. J. Microbiol.* 1969, 15, 643.
19. B. SOLHEIM, and J. RAA, *Plant Soil*, 1971, 35, 275.
20. Z.I. KERTESZ, "The pectic substances", Interscience Publishers, New York, p. 3-12, 30, 340-345, 360-374, 1951.
21. R.B. FISCHER y D.G. PETERS, "Análisis Químico Cuantitativo", Centro Regional de Ayuda Técnica, México, p. 533-536. 1970.
22. C.M. ROMERO, J.A. PINZON, A. GOMEZ Y J.A. GARCIA, "Prácticas de Laboratorio de Físicoquímica", Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, p. V-48-V-58, 1985.
23. P. MARTINEZ, "Detección de actividad pectolítica en el filtrado del cultivo de algunas cepas de *Rhizobium meliloti*", Tesis de Magister Scientiae, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1988.
24. H. LJUNGGREN, and G. FAHRAEUS, *J. Gen. Microbiol.* 1961, 26, 521.