

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE PECTIN METILESTRERASA PARCIALMENTE PURIFICADA DE BAGAZO Y PULPA DE MANGO (*Mangifera indica* L.) Var. Keitt.

Díaz-Cruz, C. A.^{a,*}; Regalado, C.^b; Morales-Sánchez, E.^a; Velazquez, G.^a; Amaya-Llano, S.^b

^aCentro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Querétaro, Instituto Politécnico Nacional. Cerro Blanco No.141, Colonia Colinas del Cimatario, CP 76090, Querétaro, Querétaro, México;

^bPrograma de Posgrado en alimentos del centro de la República (PROPAC), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario Cerro de las Campanas, s/n, Querétaro, QRO 76010, México

*cdiazc1200@alumno.ipn.mx

RESUMEN

Pulpa y bagazo de mango (*Mangifera indica* var. Keitt) con un contenido promedio de 77.85% de humedad, una proporción de sólidos solubles totales de 19.66 °Brix, pH de 3.82 y una acidez titulable de 0.304% expresada como ácido cítrico, fueron molidos y homogenizados en soluciones de extracción en relación 1:3 (v/v), pulpa:solución reguladora borato-acetato pH 8.3. Se usaron concentraciones variables de NaCl (0.2, 0.4, 1.0 y 1.5 M), para estudiar el efecto de la fuerza iónica sobre el rendimiento de extracción de pectín metil esterasa (PME) de mango. Se obtuvieron 0.41 UPME/ml en el extracto crudo de bagazo extraído con 0.2 M de NaCl y 0.35 UPME/ml en el extracto crudo de pulpa de mango. En condiciones de pH de 7 y 7.5 la PME mostró su mayor actividad con 4.0 y 0.28 UPME/ml en los extractos crudos, respectivamente. El descenso en actividad fue muy pronunciado en valores de 6.5 y 6.

ABSTRACT

Bagasse and pulp of mango (*Mangifera indica* var. Keitt) showing an average moisture content of 77.85%, total soluble solids of 19.66 °Brix, pH 3.82 and 0.304% titratable acidity expressed as citric acid, were ground and homogenized in extraction solutions at 1:3 (v/v) ratio pulp:extraction buffer (borate-acetate), pH 8.3. To evaluate the effect of ionic strength on pectin methyl esterase (PME) yield extraction from mango, different NaCl concentrations (0.2, 0.4, 1.0 and 1.5 M) were used. The crude extract from bagasse produced 0.41 UPME/ml using 0.2 M NaCl, and 0.35 UPME/ml crude extract using mango pulp. The pH values in which PME showed the largest activity was near 7.5 and 7, at which 4.0 UPME/ml and 0.28 UPME ml of crude extracts were obtained, respectively. The decline in activity was most pronounced in values 6.5 and 6.

Palabras clave: Mango, pectin metilesterasa

Área: Frutas y Hortalizas.

INTRODUCCIÓN

Entre los principales problemas de los frutos en su estado natural o procesados se encuentran las reacciones de pardeamiento así como pérdidas de consistencia durante el procesamiento o almacenamiento. Estos problemas son ocasionados principalmente por la acción cooperativa de distintas enzimas con capacidad

hidrolítica u oxidativa (Castaldo y col., 1997). La pérdida de turbidez se ha relacionado con la actividad de la enzima pectin metilesterasa (PME, EC. 3.1.1.11) que hidroliza los grupos esterificados de las sustancias pécticas. Las pectinas desterificadas interactúan formando puentes con calcio favoreciendo la pérdida de turbidez y una separación de fases (Pilnik y Voragen, 1991; Vercet y col., 1999).

La PME cataliza la hidrólisis de metil ésteres del C-6 de residuos de ácido galacturónico, lo cual genera la desmetilación de las pectinas incrementando la susceptibilidad de los polímeros pécticos a la degradación por enzimas como poligalacturonasa (PG). Estas enzimas son comúnmente empleadas para determinar la eficiencia del escaldado de frutas y vegetales (Yemenicioglu y Cemeroglu, 1998).

Con el propósito de encontrar condiciones que permitan conocer el comportamiento y manejo de enzimas como pectin metilesterasa, se han llevado a cabo numerosas investigaciones en frutos y vegetales de importancia comercial. Los resultados reportados en la literatura han permitido conocer el efecto de tecnologías emergentes, nuevos procesos productivos y condiciones de almacenamiento que extienden la vida útil de estos productos. Con base en el entendimiento de los componentes involucrados en la maduración o deterioro, es importante identificar las condiciones en las que las enzimas participantes de estos procesos pueden obtenerse de forma efectiva. Esta información permite establecer las bases para estudios enfocados en los factores que pueden afectarlas, inactivarlas o modificarlas a manera de cumplir determinados propósitos. En el presente trabajo, el objetivo fue establecer las condiciones óptimas de extracción y determinar la actividad enzimática de la pectin metilesterasa de pulpa y bagazo de mango variedad keitt.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de PME

Frutos de mango de la variedad Keitt fueron obtenidos en el mercado local de la ciudad de Querétaro, México durante la segunda semana de octubre 2013. Los mangos fueron seleccionados en un estado maduro conteniendo en promedio 77.85 % de humedad, una proporción de sólidos solubles totales de 19.66 °Brix, pH de 3.82 y acidez titulable de 0.304 % expresado en ácido cítrico.

La pulpa de mango colectada manualmente fue molida y homogenizada en un extractor de jugos comercial y tanto el puré como el bagazo fueron sometido a un proceso de extracción de PME siguiendo el método mostrado en la Figura 1.

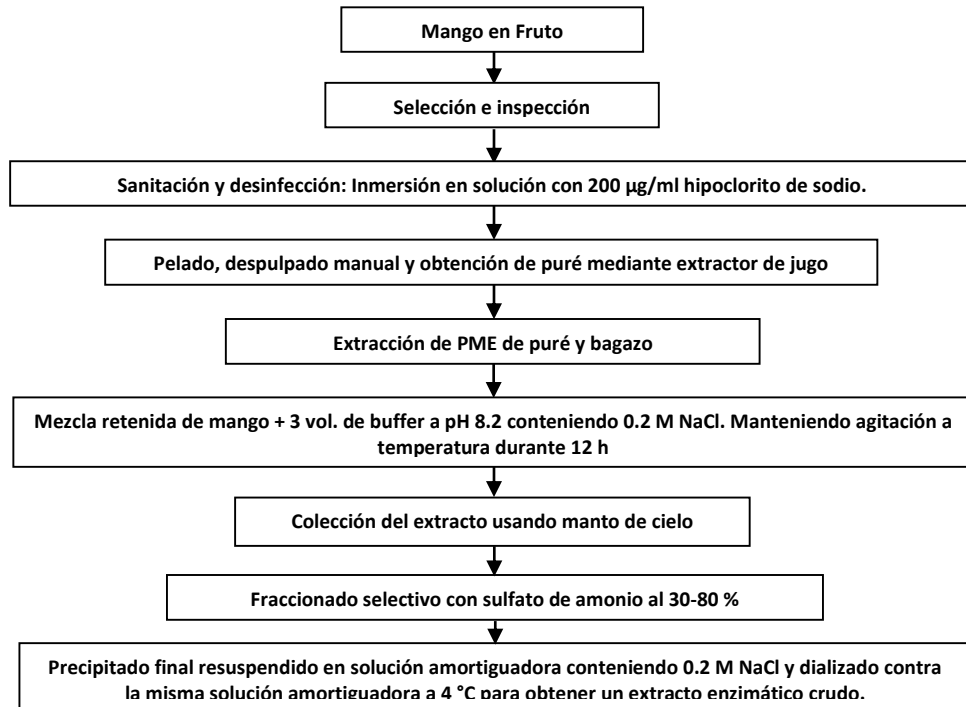


Figura1: Extracción de PME de mango

Determinación de actividad de PME

La actividad de PME fue medida por titulación para determinar la concentración de grupos carboxil libres formados por la acción de la enzima sobre una solución del 1% de pectina de manzana (70-75% de esterificación) conteniendo 0.2 M NaCl. La mezcla de reacción consistió en 25 ml de solución de pectina y 1 ml del extracto enzimático mantenida a 30 °C y pH de 7.5 La mezcla de reacción fue colocada en un titulador automático (Metrohm, 905 titrando) usando una solución 100 mM de NaOH. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un μ mol de grupos caboxil/min y fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$UPME = \frac{(ml\ NaOH)(Molaridad\ NaOH)(1000)}{(Tiempo(min))(ml\ muestra)}$$

Efecto del NaCl sobre la extracción de PME

El efecto de la concentración de cloruro de sodio sobre la extracción de la enzima PME se estudió en una solución amortiguadora de borato acetato pH 8.3 (0.45 M ácido bórico, 0.1 M tetraborato de sodio, 0.3 M acetato de sodio)(Vercet y col., 1999; Do Hamaral y col., 2005; Ly-Nguyen y col., 2003), conteniendo diferentes concentraciones de NaCl (0.2, 0.4, 1.0 y 1.5 M).

Efecto del NaCl sobre el rendimiento y la actividad de PME

A condiciones de reacción estándar el efecto del cloruro de sodio sobre la actividad del extracto crudo de PME se estudió en la reacción enzimática, usando diferentes concentraciones de NaCl (0.2, 0.4, 0.6, 1.0 y 1.5 M) en sustrato péctico.

Efecto del pH sobre la actividad de PME

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima PME se estudió en la reacción del extracto enzimático-sustrato, usando diferentes valores de pH (6.0, 6.5, 7.0, y 7.5).

RESULTADOS

La metodología utilizada permitió extraer la enzima PME parcialmente purificada, mostrando rendimientos variables y actividades enzimáticas diversas en función de las condiciones empleadas. El extracto crudo obtenido del bagazo de la pulpa de mango mostró una actividad enzimática de 0.41 UPME/ml de extracto crudo seguido por 0.35 UPME/ml de extracto enzimático obtenido del puré de mango. Estas diferencias se deben principalmente a que las pectinesterasas se encuentran comúnmente situadas en los espacios entre las paredes de las células de los tejidos de los frutos y pueden ser liberadas de forma efectiva a pH de 7.0 e incrementando la fuerza iónica en el medio (Arbahisah y col., 1996; Do Amaral y col., 2005; Jansen y col., 1960). La actividad enzimática registrada es baja comparada con la actividad reportada en otros frutos como la naranja o limón; sin embargo los valores encontrados son consistentes con los valores de actividad enzimática reportados en mango de otras variedades. (Labiby and El-Ashwah, 1995) reportaron un valor de 4.5 UPME/100 g de pulpa de mango, sin embargo en el mismo trabajo los autores mencionan que la mayor proporción de PME no se encuentra en pulpa, sino que se encuentra en el pericarpio reportando valores de hasta 39 UPME/100 g de fruto fresco.

Efecto del NaCl sobre el rendimiento de extracción de PME y medición de actividad

Considerado que la mayor concentración de la enzima se encuentra en el tejido del bagazo de mango, los estudios se continuaron con el bagazo y el retenido del filtrado de puré de mango (midiendo la actividad enzimática a condiciones estándar con 0.2 M NaCl en solución de pectina de manzana con 70-75 % de esterificación). Cuando se utilizó 0.2 M NaCl para la extracción se obtuvieron los mayores rendimientos de extracto crudo y actividad enzimática, con un valor de 0.35 UPME/ml de extracto crudo enzimático y descendiendo hasta una actividad no detectable en extractos obtenidos con 1.5 M NaCl.

Efecto del pH en la actividad de PME

El valor de pH donde la PME mostro su mayor actividad fue en valores cercanos a 7.5 y 7 encontrándose una actividad de 4.0 UPME/ml y 0.28 UPME/ml de extracto

crudo, respectivamente; sin embargo, el descenso en actividad fue muy pronunciado en valores de pH de 6.5 y 6.

CONCLUSIONES

La condiciones de extracción de PME de mango variedad Keitt más efectivas fueron a pH 8.3 y 0.2 M NaCl. Es importante mencionar que la solución amortiguadora en este estudio involucra a borato-acetato pH 8.3 (0.45 M ácido bórico, 0.1 M tetraborato de sodio, 0.3 M acetato de sodio) que a 0.2 M NaCl participa en un ambiente más saturado que con el empleo de soluciones amortiguadoras como Tris-HCl. La actividad enzimática fue mas elevada a pH 7.5 y 0.2 M NaCl en comparación con los valores observados en las otras condiciones estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

Arbahisah, S. M. , Asbi, B. A. Junainah, A. H. and Jamilah, B. 1996. Determination of optimum conditions for pectinesterase extraction from soursop fruit (*Anona muricata*) using response surface methodology. *Food Chem.* 55. 289-292.

Castaldo D., Laratta B., Lojudice R., Giovane a., Quagliuolo L. and Servillo L. 1997. Presence of Residual Pectin Methylesterase Activity in Thermally Stabilized Industrial Fruit Preparations. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 30, 479–484.

Do Amaral S. H Assis S. A. and Oliveira O. M. 2005. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from orange (*Citrus sinensis*) cv. Pera-rio. *Journal of Food Biochemistry* 29 367–380.

Jakób, A., Bryjak, J. & Polakovic, M., 2009. Selection of a method for determination of activity of pectinolytic enzymes in berry fruit materials. *Chemical Papers*, 6(63), p. 677–682..

Jansen, E.F., Jang, R. and Bonner, J. 1960. Binding of enzymes to avena coleoptile cell wall. *Plant Physiol.* 35, 567–574.

Labib A. A. S., El-Aswab F. A. 1995. Heat-inactivation of mango pectinesterase and polygalacturonase. *Food Chemisly* 53 137- 142.

Ly-Nguyen B., Van Loey A. M., Smout C., Eren Özcan S., Fachin D., Verlent I., Vu Truong S., Duvetter T., and Hendrickx M.E. 2008. Mild-Heat and High-Pressure Inactivation of Carrot Pectin Methylesterase: A Kinetic Study. *Journal of Food Science.* Vol. 68, Nr. 4.

Pilnik, W. And Voragen, A. G. J. 1991. The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing. In *Food Enzymology*; Fox, P. F., Ed.; Elsevier: London. Vol. I, pp 303-336.

Vercet A., Lopez P., and Burgos J. 1999. Inactivation of Heat-Resistant Pectinmethylesterase from Orange by Manothermosonication. *J. Agric. Food Chem.* 47, 432-437

Yemenicioğlu A, and Ozkan O, Cemeroglu B. 1998. Heat inactivation kinetics of pectin methylesterase from orange and grapefruit peels-peroxidase as an indicator of peel blanching. *Fruit Processing* 4: 158-161.