

Método de extracción de la pectina metilesterasa (EC 3.1.1.11) en frutos de níspero

Design extraction method pectin methylesterase (EC 3.1.1.11) in sapodilla fruit

Angela M. Bedoya Gómez^{1*}, Catalina M. Ramis Jaime², Luis R. Angulo Graterol²,
Yreny K. De Faria Muñoz² y Antero R. Burgos Pérez¹

¹Universidad Pedagógica Experimental Libertador (UPEL), Instituto Rafael Alberto Escobar Lara, Maracay. Dpto. de Biología. ²Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía, Instituto de Genética. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA). *Correo electrónico: angelamaria74ve@gmail.com

RESUMEN

El níspero (*Manilkara zapota* [L.] 'Prolific') es un fruto cuyas dificultades de manejo postcosecha ha limitado su comercialización. Durante la maduración del fruto el cambio más drástico es la pérdida de firmeza, lo cual ocasiona la disminución de la calidad. Este ablandamiento está asociado a la acción de la pectina metilesterasa (PME, E.C. 3.1.1.11), la cual es una enzima que induce la degradación de la pared celular. El objetivo del trabajo fue diseñar un método de extracción de PME eficiente, de calidad, rápido y que utilice pocos reactivos. Se utilizaron frutos de níspero en estado de madurez fisiológica del Banco de Germoplasma INIA-CENIAP, estado Aragua, almacenados a -20 °C. Se diseñaron cinco métodos de extracción: Buffer Tris HCl; Buffer PBS; Nitrógeno líquido (N₂L); Buffer Tris HCl + N₂L y NaCl. Se evaluaron los métodos en función de la calidad de la enzima; cantidad (mg mL⁻¹ de proteína) y de extracción. En el análisis de varianza se detectaron diferencias altamente significativas (P<0,01) entre los métodos. La prueba de comparación entre medias de Duncan determinó que el Método de N₂L extrajo mayor cantidad de proteína (231 mg mL⁻¹) con una actividad catalítica de 1,97 μmol ácido min⁻¹, superando al grupo y control con valores que oscilan entre 0,13 μmol ácido min⁻¹ y 0,6 μmol ácido min⁻¹; siendo entonces, el método más eficiente, con mayor rendimiento y menor tiempo (dos horas). Se recomienda la purificación y caracterización de la PME con fines de aplicación agroindustrial y biotecnológico.

Palabras Clave: *Manilkara zapota*, ablandamiento, zapote, PME, actividad enzimática.

ABSTRACT

Sapodilla (*Manilkara zapota* [L.] 'Prolific') is a fruit whose difficulties of post-harvest management have limited its commercialization. During ripening of these fruits the most dramatic change is the loss of firmness, which causes the decrease in quality. This softening is associated with the action of the pectin methylesterase (PME, E.C. 3.1.1.11), which is an enzyme that induce degradation of the cell wall. The objective was to design a method for efficient extraction of PME, with high quality, fast and using few reagents. Physiologically ripen Sapodilla fruits from the Germplasm Bank INIA-CENIAP, Maracay, Aragua state, were used. They were stored at -20 °C. Five methods of extraction Buffer Tris HCl; Buffer PBS; Liquid nitrogen (N₂L); Buffer Tris HCl + N₂L and NaCl, were designed. Methods were evaluated according to enzyme quality, amount (mg mL⁻¹ protein) and extraction. The analysis of variance showed highly significant differences (P<0.01) among the methods and Duncan mean comparisons determined that the liquid nitrogen method extracted more protein (231 mg mL⁻¹) with a catalytic activity of 1.97 μmol acid min⁻¹, excelling the other methods and the control with values ranging from 0.13 μmol acid min⁻¹ up to 0.6 μmol acid min⁻¹. Therefore, the C method is the most efficient, with higher protein yield and lower time (two hours). However, purification and characterization of PME for either agroindustrial purposes or biotechnological application is recommended.

Key words: *Manilkara zapota*, softening, sapodilla, PME, enzymes activity.

INTRODUCCIÓN

El níspero (*Manilkara zapota* [L.] Van Royen var. Prolific) es un fruto poco comercializado por sus dificultades de manejo postcosecha, ocasionado por el ablandamiento rápido y desuniforme; generando la necesidad de realizar estudios en esta área. Actualmente existen diversos métodos que permiten extraer la enzima pectina metilesterasa (PME) a partir de la pulpa de los frutos; sin embargo, estos requieren de varias etapas para la extracción y el tiempo de ejecución oscila entre 6 y 24 horas; además, se necesita una gran variedad y cantidad de reactivos, que las hace costosas (Cuadro 1).

Otro aspecto importante a considerar es la presencia del látex en el níspero hasta etapas avanzadas, ya que los métodos analizados son aplicados a frutos que carecen de látex (Drayen y Van Cutsem, 2008; Vovk y Simonovska, 2007; Rodrigo *et al.*, 2006; Bedoya, 2002 y 2012). Por lo antes expuesto, se planteó la necesidad de diseñar un método de extracción que permita reducir el tiempo y evite la interferencia que ocasiona la presencia de látex en los frutos de níspero (Bedoya, 2012).

El níspero, es un fruto muy apetecido por su aroma y agradable sabor, siendo muy utilizado para la elaboración de jugos, merengadas y jaleas. De acuerdo a su fisiología es un fruto catalogado como altamente climatérico, es decir, que al alcanzar la madurez fisiológica incrementa rápidamente su tasa respiratoria, aumentando la degradación de sustancias (almidón, fructosa, carbohidratos de la pared y pigmentos) y, por ende, la sobremaduración y descomposición ocurren a los pocos días de la cosecha, con un ablandamiento desuniforme. Esto se ha convertido en una limitante para la comercialización del fruto, tanto para el consumo fresco como industrial, ya que es poca su durabilidad bajo condiciones de almacenamiento, ocasionando grandes pérdidas y haciendo poco rentable el cultivo (Laborem *et al.*, 1981; Rodríguez y Restrepo, 2011; Carabali *et al.*, 2009).

La pérdida de firmeza, aunque necesaria para lograr el máximo desarrollo sensorial, es uno de los factores que más contribuye con el deterioro del fruto, disminuyendo así su calidad (Carabali *et al.*, 2009), por lo que se ha generado

la necesidad de estudiar las causas de este proceso, a fin de minimizar sus efectos.

El ablandamiento ocurre debido a los cambios en la pared celular, siendo los más significativos los relacionados a sus componentes durante la maduración, como la concentración de las sustancias pécticas solubles en agua, las cuales aumentan ocurriendo paralelamente un descenso de los polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas), debido a la solubilización de las pectinas; proceso atribuido generalmente a la acción de enzimas, entre las que se encuentra la pectina metilesterasa EC 3.1.1.11 (Díaz-Sobac *et al.*, 1997; Pérez-Almeida y Carpita, 2006; Rodríguez y Restrepo, 2011; Carabali *et al.*, 2009).

Durante la maduración de los frutos, la PME tiene por función la desesterificación del grupo carboxilo de los restos de ácido poligalacturónico, incrementando, como consecuencia, la susceptibilidad de las pectinas al ataque de las poligalacturonasas, las cuales degradan al ácido poligalacturónico (Micheli, 2001; Rodríguez y Restrepo, 2011; Carabali *et al.*, 2009).

Además del rol de la PME durante el reblandecimiento de la pared celular se han reportado otras funciones en diversos procesos como: microsporogénesis y crecimiento del tubo polínico, diferenciación celular cambial, germinación de semillas y elongación del hipocótilo. También se demostró que una isoenzima de la PME es receptora para una proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco (TMV). La interacción entre la proteína del movimiento del virus y la PME es necesaria para el desplazamiento del virus de célula a célula a través de los plasmodesmos (Micheli, 2001).

Asimismo, la PME ha sido utilizada en la agroindustria como estabilizadora en la turbidez de jugos o néctares, para clarificarlos e incrementar la extracción (Bajard *et al.*, 2006).

Estos aspectos ofrecen un panorama general sobre la importancia del estudio de esta enzima para su aplicabilidad en el manejo postcosecha y en la agroindustria. Por lo que es importante ofrecer una técnica que permita extraerla de los tejidos del fruto, manteniendo su integridad estructural y catalítica.

Cuadro 1. Resumen de las diferentes metodologías de extracción de la PME y sus isoenzimas. Se presentan los pasos y los reactivos utilizados por cada grupo de autores.

Drayen y Van Cutsem (2008)	Vovk y Simonovska (2007)	Rodrigo <i>et al.</i> (2006)	Bedoya (2002)
Metodología extracción de PME			
1. Las muestras de fresa se maceraron con N ₂ líquido.	1. Se utilizaron frutos de tomate. Se homogeneizaron 500 g de pulpa (sin piel) con 500 ml de agua fría. Se ajustó a pH 3 con 1 M de HCl.	1. Se utilizaron frutos de tomate. Se homogeneizaron 500 g de pulpa con 750 ml de agua destilada fría por 2 min.	1. Se utilizaron frutos de níspero. Se les quitó el exocarpo.
2. Se resuspendió en Buffer A (76 mM K ₂ HPO ₄ ; 27 mM KH ₂ PO ₄ ; 25 mM [EDTA]); 1 mM cisteína; 50 g l ⁻¹ [PVPP]; 1 mM [PMSF] pH 7,3).	2. El pellet obtenido fue centrifugado por 20 min a 8000 rpm.	2. Se ajustó a pH 3 con HCl 0,1 M. Se agitó por 15 min.	2. Se homogeneizaron durante 1 min en solución de NaCl 10%.
3. Se agitó en vortex por 30 min y el sobrenadante se centrifugó a 3000 g.	3. El pellet obtenido fue disuelto en 750 ml de NaCl 1,2 M (pH 6).	3. Se centrifugó por 20 min a 8000 g.	3. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 min.
4. Se descartó el pellet y se agitó nuevamente en vortex en 4 volúmenes Buffer B (76 Mm K ₂ HPO ₄ ; 27 mM K ₂ HPO ₄ ; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; 1 mM cisteína; 50 g l ⁻¹ PVPP; 1 mM PMSF; pH 7,3).	4. La solución se centrifugó a 8000 rpm por 20 min.	4. El pellet fue resuspendido en agua destilada. Se ajustó a pH 3 con HCl 0,1 M.	4. El sobrenadante obtenido se sometió a diálisis durante toda la noche.
5. Se agitó por 60 min y se centrifugó por 30 min a 3000 g.	5. El pellet obtenido se disolvió en 500 ml de NaCl 1,2 M (pH 6). Se agitó por 3 h.	5. Se centrifugó a 8500 g por 20 min. El pellet se disolvió en Na Cl 1,2 M; en proporción 1:1. Se ajustó a pH 6 con NaOH 0,1 M.	5. Se almacenó la muestra.
6. El sobrenadante se centrifugó por 30 min a 14000 g.	6. Luego se centrifugó a 10000 rpm por 20 min.	6. Se agitó por 3 h. Luego se centrifugó a 10000 rpm por 20 min.	6. Tiempo aproximado de procesamiento de 16-24 h.
7. Luego las muestras fueron dializadas durante toda la noche.	7. El sobrenadante fue filtrado en papel y luego a través de una membrana Millex-HV polihidrofílica (PVDF 0,45 µm).	7. Se recuperó el sobrenadante el cual contenía a la PME.	
8. Se almacenó la muestra dializada.	8. El filtrado obtenido se almacenó.	8. Tiempo aproximado de procesamiento 6-8 h.	
9. Tiempo aproximado de procesamiento: 16-24 h.	9. Tiempo aproximado de procesamiento 6-8 h.		

En la literatura se reportan diferentes métodos de extracción de la PME (Cuadro 1); sin embargo, el tiempo de ejecución y los materiales que se requieren son costosos, por lo tanto el objetivo de esta investigación fue diseñar un método de extracción rápido y eficiente, que utilice pocos reactivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron frutos en estado de madurez fisiológica (MF) de la colección activa del Banco de Germoplasma del Campo Experimental del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP), Maracay, estado Aragua. Posteriormente, fueron trasladados al Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (FAGRO-UCV), Maracay; lugar donde se procedió a lavarlos y almacenarlos bajo congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para luego utilizarlos en los ensayos respectivos.

Extracción de la PME

Se diseñaron cinco métodos de extracción, los cuales se evaluaron en función de la cantidad

de proteína obtenida, la actividad de la enzima y el tiempo de ejecución. Estos métodos se denominaron A, B, C, D y E (Figura 1). Inicialmente a todos los frutos se les retiró el exocarpo y las semillas, y fueron lavados para su posterior procesamiento.

Método A (Buffer Tris HCl)

Se maceraron 20 g de pulpa en un mortero con Buffer Tris-HCl (0,1 M; pH 8) en relación 1:1. Se centrifugó a 10000 rpm x 30 min, y se obtuvo un volumen de sobrenadante de 20 ml. El sobrenadante obtenido fue filtrado con lana de vidrio y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

Método B (Buffer PBS)

Se maceraron 20 g de pulpa en un mortero con 20 ml de PBS (Buffer fosfato monohidratado: K_2HPO_4 20 mM pH 7,4 y Buffer fosfato bihidratado: KH_2PO_4 20 mM pH 7,4; NaCl 0,45 M) en relación 1:1. El macerado obtenido se centrifugó a 10000 rpm x 30 min y el sobrenadante (17,5 ml) se filtró con lana de vidrio y fue almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

Método C (Buffer Tris-HCl + N_2L)

Se tomaron 20 g de la pulpa y se pulverizó con N_2L . Luego se resuspendió en 20 ml de Tris-HCl

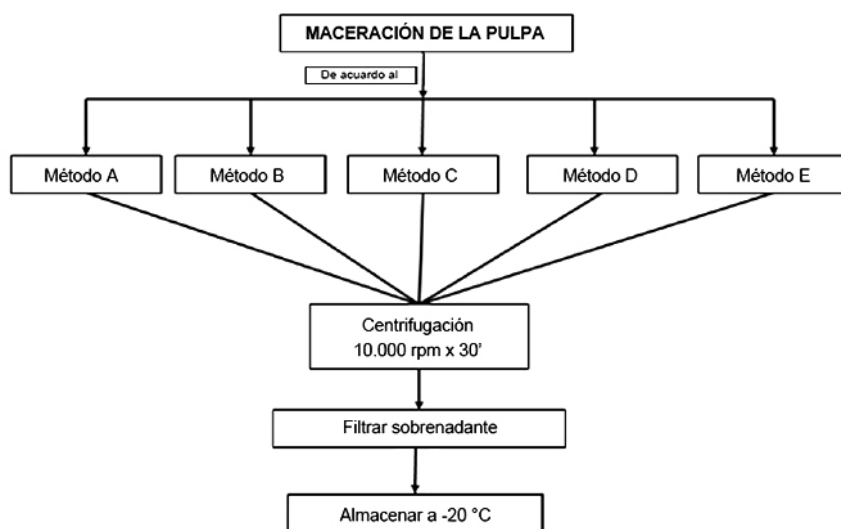


Figura 1. Esquema de la secuencia y las técnicas utilizadas para realizar la extracción de la PME a partir de frutos de níspero.

(0,1 M-pH 8) y se centrifugó a 10000 rpm x 30 min. El sobrenadante obtenido (20 ml) se filtró con lana de vidrio y fue almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

Método D (Buffer Tris HCl + N₂L)

Se maceraron 20 g de pulpa en mortero con 20 ml de Tris-HCl (0,1 M; pH 8) en relación 1:1, se separó la fase acuosa de la sólida; a la fase sólida se le agregó N₂L, se maceró nuevamente y se centrifugó a 10000 rpm x 30 min. El sobrenadante obtenido (21 ml) se filtró con lana de vidrio y almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

Método E (NaCl)

Se homogeneizaron 20 g de la pulpa en 20 ml de NaCl 10% (relación 1:1) y se centrifugó a 10000 rpm x 30 min. El sobrenadante obtenido (17,5 ml) se filtró con lana de vidrio y almacenado a -20 °C. Tiempo de procesamiento aproximado: 2 horas.

El grupo control se preparó macerando 20 g de fruto con 20 ml de agua destilada (H₂O_d), la mezcla se centrifugó a 10000 rpm x 30 min. El sobrenadante obtenido (18 ml) se filtró con lana de vidrio y almacenado a -20 °C.

Medición de la actividad de la PME

Para determinar la actividad de la enzima PME en los diferentes extractos se utilizó el método colorimétrico de Hagerman y Austin (1986). La

metodología consiste en realizar una mezcla de reacción con el extracto obtenido (enzima), el sustrato (pectina) y azul de bromofenol (Figura 2).

Cuando la PME remueve los grupos metil de la cadena de ácido poligalacturónico (demetila) se acidifica el medio y el descenso de pH genera un cambio en la coloración del azul de bromofenol, de azul a amarillo. Esto es captado por el espectrofotómetro y se mide la actividad de forma indirecta como un cambio en la absorbancia a 620 nm. Los valores fueron llevados a una curva patrón (Figura 3) elaborada de acuerdo a la metodología de Hagerman y Austin (1986), la cual se utilizó para transformar los valores de la absorbancia en micromoles de ácido producido/minuto ($\mu\text{mol ácido min}^{-1}$).

Para la mezcla de reacción, los volúmenes se ajustaron a la capacidad de un tubo vial de 1,5 ml (Figura 2) y se procedió a realizar el ensayo:

1. Preparación de las soluciones: pectina cítrica (PC) como sustrato al 1% en agua destilada, azul de bromofenol (AB) al 0,1% y el extracto del fruto de acuerdo a la metodología establecida.
2. En un tubo vial de 1,5 ml se agregó 938 μl de pectina cítrica (sustrato), 282 μl de extracto enzimático PME (EE) y 20 μl de azul de bromofenol (AB) al 0,1%.
3. La mezcla anterior se incubó en baño térmico a 30 °C durante 1 hora.

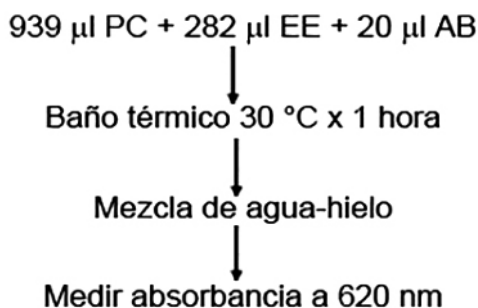


Figura 2. Esquema general para medir la actividad de la PME de acuerdo al método espectrofotométrico de Hagerman y Austin (1986).

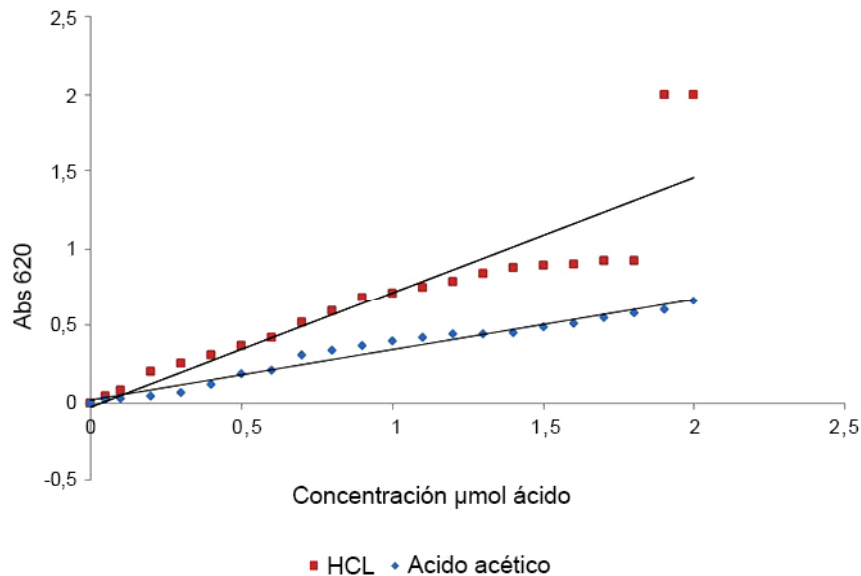


Figura 3. Curva de calibración para el ensayo espectrofotométrico de acuerdo a la metodología propuesta por Hagerman y Austin (1986). HCl (cuadros), ácido acético (rombos). Los valores mostrados son el resultado de las medias de tres repeticiones.

4. Baño de agua con hielo, para detener la reacción.

5. Se midió la absorbancia a 620 nm (Espectrofotómetro GENESYS 20).

Contenido de proteínas

Para este análisis se utilizó el método de Bradford (1976), que consiste en mezclar 0,1 ml del extracto y 5 ml del reactivo de Bradford. La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos y para finalizar se midió la absorbancia a 595 nm (Espectrofotómetro Marca GENESYS 20). El blanco fue preparado sustituyendo el extracto por 0,1 ml de agua. Los valores fueron llevados a una curva patrón, elaborada con albúmina bovina (BSA). El contenido de proteínas fue expresados en miligramos de proteínas por cada mililitro de muestra (mg ml^{-1}).

Diseño y análisis estadístico

El diseño de la investigación fue completamente aleatorizado, con tres repeticiones por tratamiento (Monzón, 1992). Posteriormente se realizaron los Análisis de Varianza (ANAVAR) y Pruebas de Medias correspondientes.

Para todos los análisis de varianza se verificaron los supuestos del análisis de homogeneidad y normalidad. El Programa utilizado fue el MSTAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de la PME

Los resultados de la actividad de la PME, extraída por diferentes métodos se presentan en la Figura 4, donde se puede observar que el método más eficiente para la extracción de la PME, es el método C, obteniéndose un valor de actividad de $1,97 \mu\text{mol ácido min}^{-1}$. En el grupo control la actividad fue de $0,23 \mu\text{mol ácido min}^{-1}$.

La actividad obtenida en el método C representa el 856% respecto al grupo control, lo que indica un alto rendimiento en la extracción. Este resultado también permite deducir que se mantuvo la integridad molecular y catalítica de la enzima (Cuadro 2).

Estos resultados indican que la aplicación del N_2L y del Buffer Tris-HCl permitieron la solubilización de la PME, la cual se encuentra en la pared celular. Otra propiedad que ofrece el uso del N_2L es neutralizar el efecto del látex

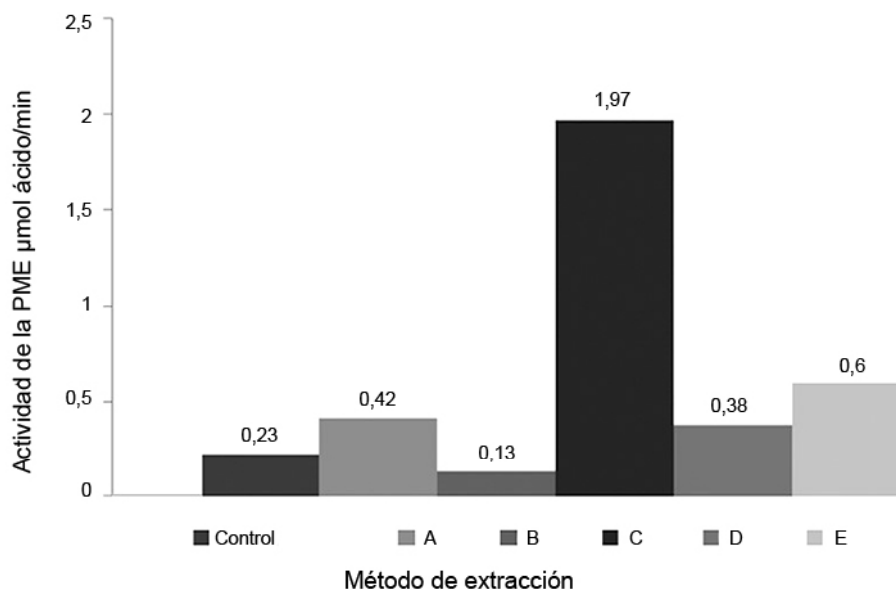


Figura 4. Actividad de la PME extraída por diferentes métodos a partir de la pulpa de frutos de Níspero. Control: Grupo Control. A: Método A. B: Método B. C: Método C. D: Método D. E: Método E.

Cuadro 2. Comparación de los diferentes métodos en cuanto a: actividad enzimática, cantidad de proteína, tiempo de extracción y reactivos utilizados.

Grupo	Actividad PME (μmol ácido min ⁻¹)	Actividad PME (%)	Contenido de proteínas mg ml ⁻¹	Tiempo de extracción (horas)	Reactivos y materiales utilizados
Grupo Control	0,23	100	201,6	2	H ₂ O _d
A	0,42	182	118	2	Buffer Tris HCl
B	0,13	56	210	2	Buffer PBS
C	1,97	856	231	2	N ₂ L Buffer Tris HCl
D	0,38	165	299	2	N ₂ L Buffer Tris HCl
E	0,6	260	291	2	NaCl

presente en la pulpa, evidenciándose la razón por la que no se formó la capa adherida a las paredes de los tubos; aspecto muy importante porque la presencia del látex afecta la extracción, la actividad y el proceso de purificación (Bedoya, 2002; 2012). Por otro lado, el Buffer Tris-HCl tiene un efecto iónico que permite solubilizar la enzima sin necesidad de dializar el producto (Carabali *et al.*, 2009).

En los valores obtenidos con el método C se puede observar una gran diferencia en la actividad de la enzima, con respecto a los otros métodos. Por ejemplo, en los métodos A y E los valores son de 0,42 y 0,6 μmol ácido min⁻¹, respectivamente, lo cual representan sólo el 21,3% y el 30,4% de actividad en relación al método C; sin embargo al ser comparados con la actividad obtenida en el grupo control, el método

A y el E permitieron una mayor extracción de la enzima, ya que la actividad obtenida representa un 182 y 260%, respectivamente, en relación al grupo control.

De igual manera los métodos B y D permiten extraer la proteína, pero los valores de actividad enzimática son muy bajos en relación al método C.

Durante la ejecución de cada uno de estos métodos fue importante el uso del buffer. Los resultados indican que el Buffer Tris-HCl utilizado en el método C es eficiente para la extracción. Sin embargo, en los métodos A y E donde se utilizó Buffer Tris-HCl y NaCl, respectivamente, se obtuvieron valores altos de actividad (Cuadro 2). Diversos trabajos han utilizado una variedad de buffer o agua para hacer la extracción, dependiendo del tipo de fruto en estudio. El buffer no solo permite mantener el pH estable sino que solubiliza la enzima de la pared y mejora la actividad catalítica de la PME (Rodríguez y Restrepo, 2011 Carabali *et al.*, 2009).

Contenido de proteínas

En el método D se logró extraer la mayor cantidad de proteínas con un valor de 299 mg ml⁻¹, seguido del método E (291 mg ml⁻¹ de proteínas). En tercer lugar, con el método C se

extrajo 231 mg ml⁻¹ de proteína, pero este es el más alto en la actividad de la PME (Cuadro 2). Es decir, los métodos D y E permiten extraer mayor cantidad de proteína (Figura 5), pero cuando se determina la actividad de la PME se puede observar claramente que la actividad es muy baja en relación al método C (Figura 4).

Estos resultados sugieren dos posibilidades: la primera es que en los métodos D y E no se mantiene la integridad estructural y catalítica de la enzima, y la segunda es que se obtienen otras proteínas que no son la PME. Probablemente esto ocurre debido a que la metodología no es eficiente en la extracción de la PME, la cual está adherida a la pared celular.

En el análisis de varianza (Cuadro 3) se detectaron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre los métodos. Se realizó la prueba de comparación entre medias de Duncan (Cuadro 4), la cual determinó que el método C evidenció una mayor actividad catalítica de PME (1,97 $\mu\text{mol ácido min}^{-1}$) y una cantidad de proteína de 231 mg ml⁻¹.

Tiempo y reactivos

El tiempo de ejecución de los métodos de extracción diseñados, es de dos horas, en comparación con los descritos en otros trabajos,

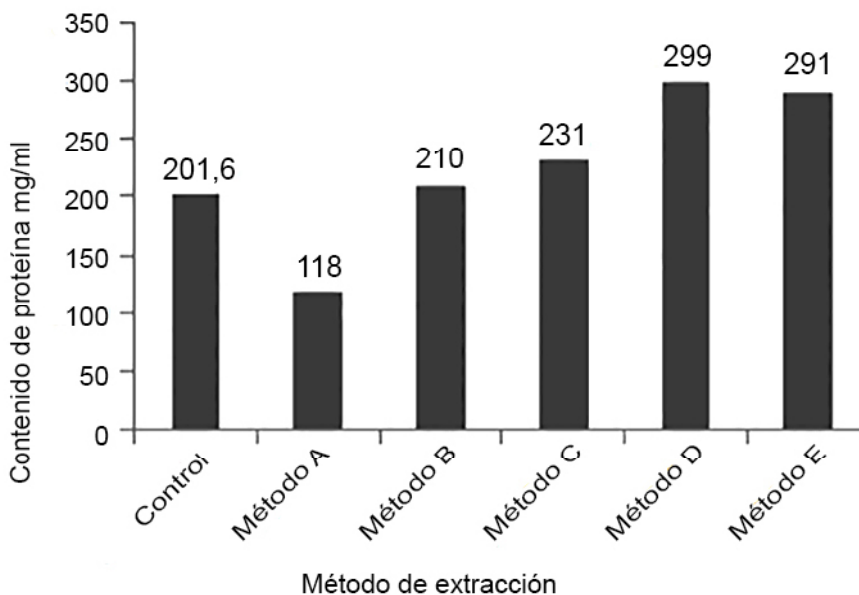


Figura 5. Contenido de proteína de los extractos crudos de pulpa de nispero procesados por diferentes métodos.

Cuadro 3. Análisis de Varianza de la Actividad de la PME y de la concentración de proteínas de los extractos obtenidos por los diferentes métodos de extracción.

Fuente de variación	gl	Cuadrados medios	
		Actividad PME ($\mu\text{mol ácido min}^{-1}$)	Concentración de proteínas (mg ml ⁻¹)
Repetición	2	0,002	16,194
Métodos de extracción	5	1,386	1z3249,42
Error	10	0,005	9,232
Total	17		
CV (%)		11,15	1,35

**Diferencias altamente significativas. Duncan ($P < 0,01$).

Cuadro 4. Prueba de Medias de la actividad de la PME y la concentración de proteínas en las muestras extraídas con diferentes letras métodos de extracción.

Método de extracción	Actividad PME ($\mu\text{mol ácido min}^{-1}$)	Concentración de proteínas (mg ml ⁻¹)
Control	0,233 d	201,6 e
A	0,423 c	118,0 f
B	0,127 d	210,0 d
C	1,970 a	231,0 c
D	0,383 c	299,0 a
E	0,603 b	291,0 b

Letras diferentes denotan diferencias significativas.

donde el tiempo oscila entre 6 a 24 horas (Cuadro 1), lo cual representa una reducción entre 30-90%. Otra característica resaltante de los métodos descritos en este trabajo, es la poca cantidad de reactivos utilizados, lo cual disminuye los costos para su aplicación en posteriores investigaciones.

CONCLUSIÓN

Se diseñó un método rápido, eficiente y con pocos reactivos para la extracción de la PME a partir de frutos de níspero. El método C es el más eficiente en extracción por la calidad y cantidad de la enzima; al igual que por el tiempo empleado.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), a los investigadores Gaston Laborem y Grigna Piña del INIA por permitirnos utilizar los materiales del Banco de Germoplasma de Níspero.

Al profesor Angel Guadarrama del Laboratorio de Fisiología Postcosecha de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, por facilitarnos el uso de sus equipos.

LITERATURA CITADA

Bajard, C., C. Fauveau, C. Grassin y P. Pellerin. 2006. Enzimas para la enología. Modo de

- producción, modo de acción e Impacto en la transformación de la uva en vino. *Revista Enología* (Año III). 5:82-85.
- Bedoya, A. 2002. Actividad de las enzimas poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, celulasa y patrón de proteínas durante la maduración de frutos de níspero (*Manilkara zapota* var. Prolific). Trabajo para optar al grado de Magíster Scientiarum en Botánica Agrícola. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 128 p.
- Bedoya, A. 2012. Purificación y caracterización de las isoenzimas de la pectina metilesterasa en frutos de níspero (*Manilkara zapota* var. Prolific). Tesis doctoral presentada como requisito para optar al título de doctor en Ciencias Agrícolas. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 109 p.
- Bradford, M. 1976. A rapid sensitive assay for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Carabali, I., C. Narváez y L. Restrepo. 2009. Extracción y medida de actividad de pectin metil estearasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), enzima relacionada con el ablandamiento. *Acta Biológica Colombiana*. 14(2):73-82.
- Díaz-Sobac, R., J. De La Cruz, A. Vázquez, C. Beristain and H. García. 1997. Evaluation of softening and associated enzyme activities during the ripening of coated 'Manila' mangoes. *Journal Horticultural Science*. 72:749-753.
- Drayen, M. and P. Vat Cutsem. 2008. Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *Journal of Plant Physiology*. 165:1152-1160.
- Hagerman, A. and P. Austin. 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methylesterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34:440-444.
- Laborem, G., M. Figueroa, L. Rancel y L. Bandres. 1981. Estudio de la calidad de la fruta en las principales variedades comerciales de níspero en Venezuela. VIII Convención Anual de Fruticultores. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). 12 p.
- Micheli, F. 2001. Pectin methylesterase: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*. 6(9):414-419.
- Monzón, P. 1992. Introducción al diseño de experimentos. Alcance 34. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (FAGRO-UCV). Maracay. 167 p.
- Pérez-Almeida, I. y N. Carpita. 2006. Las β -galactosidasas y la dinámica de la pared celular. *Interciencia*. 31(7):476-483.
- Rodrigo, D., C. Corte's, E. Clynen, L. Schoofs, A. Van Loey y M. Hendrickx. 2006. Thermal and high-pressure stability of purified polygalacturonase and pectinmethylesterase from four different tomato processing varieties. *Food Research International*. 39:440-448.
- Rodríguez, J. y L. Restrepo. 2011. Extracción de enzimas pécticas del epicarpio de lulo (*Solanum quitoense* lam) involucradas en el proceso de ablandamiento. *Acta Biológica Colombiana*. 16(2):193-204.
- Vovk, I. and B. Simonovska. 2007. Isolation of tomato pectin methylesterase and polygalacturonase on monolithic columns. *Journal of Chromatography A*. 1144:90-96.