

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA  
PECTINASA PRODUCIDA POR *Geobacillus sp* P4**

**TESIS**

Presentada por:

**Bach. TANY KRISTEN HINOJOSA CALDERON**

Para optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

TACNA - PERÚ

2020

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N°354

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, siendo las 17:15 horas del día 7 de diciembre del 2020, estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N°9802-2020- FACI-UN/JBG conformado por los siguientes docentes:

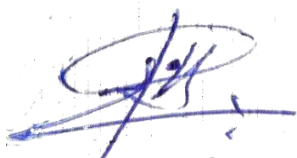
Dr. ROBERTO ENCARNACIÓN SUPO HALLASI	Presidente
Mgr SOLEDAD BORNÁS ACOSTA	Secretaria
Dr. VICENTE CHAMBILLA QUISPE	Miembro

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el Presidente del Jurado instó a la Bachiller: TANY KRISTEN HINOJOSA CALDERON, a exponer la tesis titulada: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA PECTINASA PRODUCIDA POR *Geobacillus* sp P4.

Siendo las 18:00 horas la tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo al Reglamento. El promedio de calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad con el calificativo de 17 (diecisiete). De acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 18:25 horas se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador en señal de conformidad.



**Dr. ROBERTO ENCARNACIÓN SUPO HALLASI**  
Presidente



**Mgr SOLEDAD BORNÁS ACOSTA**  
Secretaria



**Dr. VICENTE CHAMBILLA QUISPE**  
Miembro

## DEDICATORIA

A Dios, por guiar cada uno de mis pasos, darme siempre oportunidades de seguir mejorando y superar mis caídas.

A mi esposo, mi complemento, Francisco, por convertirse en el pilar de mis días, ser luz en tiempos de oscuridad, pero sobre todo gracias por compartir conmigo lo más hermoso de la vida, el amor.

A mi hijos, Franco y Lorena por ser dos bellos regalos de Dios, por contagiar mi hogar con su alegría y energía inagotable, les agradezco su existencia y compañía.

A mis padres, por brindarme la mano en los momentos más difíciles, compartir mis alegrías y darme siempre lo mejor a lo largo de mi vida.

A mi asesor Mgr. Roberto Castellanos Cabrera le agradezco por todo su apoyo y confianza.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	2
1.1 Antecedentes .....	2
1.2 Formulación del problema .....	4
1.3 Justificación e importancia .....	5
1.4 Alcances y limitaciones .....	6
1.5 Objetivos .....	7
1.6 Hipótesis .....	7
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b> .....	8
2.1 Pectinasas .....	8
2.1.1 Pectinasas microbianas .....	8
2.1.2 Estructura bioquímica de pectinasa .....	10
2.1.3 Modo de acción de pectinasa .....	12
2.1.4 Clasificación de pectinasas .....	15
2.2 Sustancias pécticas .....	16
2.3 Aplicaciones industriales .....	18
2.3.1 Pectinasas ácidas .....	19
2.3.1 Pectinasas alcalinas .....	20
2.4 Purificación .....	24
2.4.1 Precipitación de proteínas .....	24

2.4.2 Cromatografía de filtración en gel .....	25
2.4.3 Cromatografía de intercambio iónico.....	27
2.4.4 Electroforesis de proteínas.....	28
2.5 Caracterización.....	29
2.5.1 pH.....	29
2.5.2 Temperatura y termoestabilidad.....	30
2.5.3 Cinética enzimática .....	31
<b>CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>33</b>
3.1. Población y muestra.....	33
3.2. Diseño de investigación .....	33
3.3. Materiales y equipos .....	34
3.4. Técnica de trabajo.....	36
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 Producción de la enzima pectinasa .....	42
4.2 Purificación de la enzima pectinasa .....	42
4.2.1 Precipitación con sulfato de amonio, diálisis y ultrafiltración .....	42
4.2.2 Cromatografía de filtración en gel .....	43
4.2.3 Cromatografía de intercambio iónico.....	45
4.2.4 Electroforesis y determinación del peso molecular por SDS-PAGE...47	
4.3 Caracterización de la enzima.....	48
4.3.1 Caracterización fisicoquímica.....	48
4.3.2 Caracterización cinética .....	52
<b>CAPÍTULO V: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>

<b>CONCLUSIONES</b> .....	59
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	60
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61
<b>ANEXOS</b> .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b> Estructura tridimensional 1(a) pectin liasa A, 1(b) rhamnogalacturonan liasa de <i>Aspergillus aculeatus</i> K 150a.....	11
<b>Figura 2</b> Modo de acción enzimática de PMGL, PMG, PGL y PG en la molécula de pectina. ....	14
<b>Figura 3</b> Estructura esquemática de la pectina .....	18
<b>Figura 4</b> Separación de moléculas de diferentes tamaños por cromatografía de exclusión. ....	27
<b>Figura 5</b> Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por enzimas en presencia de tres concentraciones enzimáticas diferentes. ....	32
<b>Figura 6</b> Cromatografía de filtración en gel de la pectinasa producida por <i>Geobacillus sp</i> P4 .....	44
<b>Figura 7</b> Cromatografía de Intercambio iónico de la pectinasa producida por <i>Geobacillus sp</i> P4 .....	46
<b>Figura 8</b> Fotografía de la corrida electroforética de las fases de purificación.	47
<b>Figura 9</b> Gráfica de superficie de respuesta de la interacción entre temperatura y pH.....	49
<b>Figura 10</b> Gráfica de contorno de la interacción entre temperatura y pH .....	50
<b>Figura 11</b> Gráfica de termoestabilidad .....	51
<b>Figura 12</b> Gráfica de Michaelis-Menten.....	53
<b>Figura 13</b> Gráfica de Lineweaver-Burk.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Agentes precipitantes .....	24
<b>Tabla 2</b> Ensayo de reacción para pectinasas .....	37
<b>Tabla 3</b> Tabla de saturación con sulfato de amonio .....	39
<b>Tabla 4</b> Evaluación de producción de pectinasa.....	42
<b>Tabla 5</b> Tabla de concentración por precipitación con sulfato de amonio .....	42
<b>Tabla 6</b> Proteínas totales y actividad enzimática de las fracciones de Cromatografía de Filtración en gel (Sephadex G-100) .....	43
<b>Tabla 7</b> Proteínas totales y actividad enzimática de cromatografía de Intercambio iónico .....	45
<b>Tabla 8</b> Purificación de enzima pectinasa .....	47
<b>Tabla 9</b> Análisis de varianza de la interacción pH - temperatura de la pectinasa producida por <i>Geobacillus sp</i> P4 .....	48
<b>Tabla 10</b> Análisis estadístico de la interacción pH - temperatura de la pectinasa producida por <i>Geobacillus sp</i> P4 .....	48
<b>Tabla 11</b> Tabla de las inversas 1/V y 1/S.....	52

## RESUMEN

En el presente trabajo se purificó la enzima pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4 mediante las etapas de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico, alcanzando un rendimiento del 12,24 % purificándose 20,32 veces con una actividad específica de 37,06 U/mg. Posteriormente, se determinaron las características fisicoquímicas de la pectinasa encontrándose rangos de temperatura óptimos entre 50 - 60 °C y pH 6,5 – 7,5. Con respecto a la termoestabilidad encontramos que, a 60 °C mantiene una actividad residual superior al 70 % hasta los 120 min. Finalmente, los valores de  $k_m$  y velocidad máxima se determinaron a través de las ecuaciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk, siendo 2,0134 mg/ml y 0,00759 mg/ml.min (39  $\mu$ mol/ml.min) respectivamente.

**Palabras clave:** Pectinasa, enzima termoestable, *Geobacillus sp.*, purificación

## ABSTRACT

In the present work, the pectinase enzyme produced by *Geobacillus sp* P4 was purified by the precipitation stages with ammonium sulfate, gel filtration chromatography and ion exchange chromatography, reaching a yield of 12,24% being purified 20,32 times with a specific activity of 37,06 U / mg. Subsequently, the physicochemical characteristics of the pectinase were determined by finding optimum temperature ranges between 50-60 ° C and pH 6,5-7,5. With regard to thermostability, we find that, at 60 ° C, it maintains a residual activity greater than 70% up to 120 min. Finally, the values of  $k_m$  and maximum speed were determined through the equations of Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk, with 2,0134 mg / ml and 0,00759 mg / ml.min (39  $\mu$ mol / ml.min) respectively.

**Keywords:** Pectinase, thermostable enzyme, *Geobacillus sp.*, purification

## INTRODUCCIÓN

La pectina es un complejo de alto peso molecular, conformado principalmente del ácido D-galactopiranosilurónico que es  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) glicosídico vinculado al ácido poligalacturónico con pequeñas cantidades de L-ramnosa (2-4%) y varias cadenas que comprenden L-arabinosa, D-galactosa y  $\beta$ -D-xilosa (Esquivel y Voget, 2004).

Hoy en día, existe un interés en la degradación de sustancias pécticas, para su uso en una amplia gama de aplicaciones industriales, como desgomado de fibras, tratamiento de aguas residuales pécticas, extracción y clarificación de jugos de frutas, industria textil y del papel, fermentación de café – té y extracciones de aceite (Kashyap, Vohra, Chopra y Tewari, 2001).

Para la degradación de estas sustancias pécticas se requiere el uso de enzimas pectinasas, las cuales son producidas por diferentes organismos, como bacterias, hongos y levaduras, dentro del tipo bacteriano, las bacterias termofílicas han generado gran interés debido a sus enzimas termoestables e importancia industrial (Maugeri, Gugliandolo, Caccamo y Stackebrandt, 2001; Rahman, Marchant y Banat, 2004). Por lo tanto, el descubrimiento y caracterización de nuevas enzimas para aplicaciones comerciales en la industria es un desafío (Kubra, Ali, Walait y Sundus, 2018) ya que existe una gran demanda comercial, lo que conlleva a la búsqueda de procesos para la producción y caracterización de las mismas.

El objetivo del presente trabajo, fue realizar la purificación y caracterización de la pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4 a fin de conocer sus características particulares y poder utilizarlas en diversos procesos industriales a beneficio de la sociedad.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Antecedentes

Demir et al. (2011) elaboraron el primer informe sobre la producción, purificación y caracterización de pectina liasa extracelular producida por *G. stearothermophilus* Ah22. La pectina liasa fue producida en fermentación en estado sólido. La enzima se purificó mediante cromatografía en columna de intercambio aniónico de DEAE-celulosa y se caracterizó. El peso molecular de la enzima se determinó como 36 kDa mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G-100. El pH y la temperatura óptimos de la enzima se determinaron como pH 6,0 y 60°C, respectivamente. La enzima fue mayormente estable a 40 °C. Su actividad declinó en un 50 % después de 2 horas a 60°C y en un 60 % después de 6 horas a 50°C. Los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  se calcularon como 0,47 mg/ml y 355,3  $\mu\text{mol} / \text{L} \cdot \text{min}$ , respectivamente. La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  10 mM,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y EDTA, L-cisteína y ácido ascórbico aumentaron significativamente la actividad de la enzima. Se concluyó que la enzima purificada de *G. stearothermophilus* Ah22 se puede utilizar en el proceso de obtención de jugo de fruta a partir de pulpa de fruta. A partir de los resultados obtenidos en esta investigación se confirma que la producción extracelular de enzimas por microorganismos y su purificación es posible y tiene gran ventaja por su costo ya que, se evita el proceso de lisis celular y posterior purificación a partir de mezclas mucho más complejas.

Mercimek y Turkmen (2016) realizaron la producción y purificación de pectinasa a partir de *Bacillus subtilis* el cual fue aislado de un suelo contaminado por desechos de cultivos agrícolas. La pectinasa extracelular se purificó utilizando tres técnicas diferentes (sobrenadante libre de células, etanol y precipitación con sulfato de amonio), la actividad enzimática se midió

con análisis espectrofotométrico. La actividad específica máxima se observó en el preparado enzimático purificado por precipitación con etanol, 217,44 U/mg. Los productos de degradación de la reacción; glucosa, sacarosa y fructosa; se identificaron mediante el análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y cromatografía de capa fina. Dos bandas de proteínas pertenecientes a pectinasa de *B. subtilis* se determinaron mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio poliacrilamida. Los pesos moleculares de las bandas se calcularon aproximadamente en 60 y 64 kDa. Se concluyó, por lo tanto, que la pectinasa producida es una mejor fuente para varias áreas industriales como textiles, alimentos, maceración de tejidos de plantas y tratamiento de aguas residuales de zumos de frutas.

Yu y Xu (2018) optimizaron los medios de producción de la pectina ácida tolerante al calor de *Bacillus sp* a través de la metodología de superficie de respuesta e investigaron sus propiedades enzimáticas. Se observó que la lactosa, triptona y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tienen una influencia significativa en la actividad de la pectinasa ( $p < 0,05$ ). Las composiciones de medio óptimas fueron las siguientes: lactosa 44,8 g/l, triptona 30,9 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,35 g/l,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,2 g/l,  $\text{MgSO}_4$  0,4 g/l y NaCl 3,5 g/l. La pectinasa se purificó hasta homogeneidad mediante sulfato de amonio. Se realizó la cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa y cromatografía de exclusión en Sephadex G-100. El peso molecular de la pectinasa purificada determinado por SDS-PAGE fue aproximadamente 23 kDa, y su actividad específica final fue de 110,47 U/mg. Su temperatura y pH óptimos fueron de 37°C y 5,0 respectivamente. La pectinasa fue muy estable dentro de un rango de pH de 3,0-5,0, y mostró una alta estabilidad térmica a 80 y 90°C.  $\text{Ba}^{2+}$  podría promover significativamente la actividad de la pectinasa, y  $\text{Mn}^{2+}$  inhibió fuertemente su actividad. Este estudio proporciona una nueva visión del futuro desarrollo y uso de pectinasa de *Bacillus sp* ZJ1407.

Actualmente, en nuestra localidad, el proyecto de investigación: “Producción Biotecnológica de enzimas industriales a partir de microorganismos termófilos de los Géiseres de Calientes, Candarave-Tacna”, contempla el estudio de varias enzimas de interés industrial, entre ellas la enzima pectinasa. Se ha aislado y realizado la identificación molecular de las cepas, encontrándose 30 bacterias productoras de pectinasas en su gran mayoría del género *Bacillus*, siendo 12 las más eficientes en función a su actividad enzimática cuantitativa expresada en U/ml.

## **1.2 Formulación del problema**

En la actualidad, el uso de enzimas pectinasas para una variedad de aplicaciones biotecnológicas está aumentando rápida y constantemente. Así mismo, se ha reportado la presencia de bacterias con actividad pectinolítica de diferentes tipos de fuentes naturales. Sin embargo, el aislamiento de microorganismos de áreas remotas, podría permitir la identificación de nuevas cepas y obtener sus enzimas para su uso en la gestión de residuos agrícolas y algunas otras aplicaciones.

Por ello, la búsqueda de enzimas que se adapten a condiciones de trabajo extremas y a su vez sean una alternativa más segura y económica que los procesos industriales sintéticos existentes, es de vital importancia.

Esto se lograría con la utilización de extremozimas de origen natural, provenientes de microorganismos aislados de alguna fuente de interés, presentes en un extraído crudo que requieren su recuperación a través de etapas de purificación y la posterior dilucidación de sus características para un mejor aprovechamiento en los procesos industriales.

Existiendo esta necesidad y con el fin de profundizar en el estudio de biocatalizadores termoestables, se formula el siguiente problema:

¿Cuáles son los parámetros fisicoquímicos y cinéticos de la enzima pectinasa purificada, producida por *Geobacillus sp* P4?

### **1.3 Justificación e importancia**

Las pectinasas poseen ciertas características que las convierten en excelentes biocatalizadores con gran potencial biotecnológico, es así que son empleadas en diferentes áreas de la industria alimentaria y textil. Las pectinasas constituyen actualmente un importante sector en el campo de enzimas industriales, en diferentes años obtuvieron un volumen de ventas de alrededor de 75 millones de dólares (Kashyap et al., 2001).

Desde el punto de vista de su aplicación, las pectinasas pueden clasificarse principalmente en dos grandes tipos: pectinasas alcalinas y ácidas. Las pectinasas alcalinas se utilizan principalmente en la fabricación textil, así mismo, poseen otras aplicaciones como elaboración del té, café, extracción de aceites, tratamiento de aguas residuales y elaboración del papel (Kobayashi et al., 2001). Por otro lado, las pectinasas ácidas son utilizadas en la industria de zumos de fruta mejorando la extracción, color, aroma y sabor, suplementando la acción de las enzimas endógenas de la fruta. También son empleadas en la fabricación de vinos reduciendo los costes y mejorando el proceso de vinificación. Esta aplicación es relevante en nuestra localidad ya que la industria vinícola en Tacna, es considerada de gran importancia socioeconómica, en ese sentido, la enzima obtenida, purificada y caracterizada podría ser utilizarla para el mejoramiento de la calidad en la producción.

Los diferentes usos de estas enzimas exigen que estén diseñadas para trabajar en condiciones particulares como altas temperaturas, resistencia a solventes orgánicos o agitación mecánica sin modificar su estructura ni perder su actividad. Por tal razón, para superar estas limitaciones, resulta ventajoso para la industria, la evaluación de enzimas producidas naturalmente por microorganismos termófilos que presenten estabilidad a elevadas temperaturas de reacción, para así contribuir con la optimización de los procesos biotecnológicos en los que ellas participan y, por tanto, a una mejor aplicación de las pectinasas para la obtención de bioproductos de utilidad. Por lo tanto, el presente estudio evaluará la enzima pectinasa producida por *Geobacillus sp P4*, a fin de determinar las características cinéticas y fisicoquímicas de la enzima purificada para un aprovechamiento posterior en procesos industriales.

#### **1.4 Alcances y limitaciones**

En nuestro país y sobre todo en nuestra localidad existe un déficit general en torno a la industria enzimática a causa de la carencia de investigación, infraestructura y poca motivación para desarrollar alianzas entre las empresas e instituciones que realizan investigación en el campo de la biotecnología. Su desarrollo, así como el de otras áreas, está afectado por problemas como la creciente brecha científica y tecnológica con respecto a los países industrializados.

El presente proyecto de investigación, se sustenta en la necesidad de estudiar el comportamiento de enzimas de interés industrial producidas naturalmente para su posterior aprovechamiento. Hecho que a su vez resultaría en una alternativa más segura y económica a largo plazo para muchos procesos industriales.

En este contexto, la pectinasa que será materia del presente estudio, será producida por una cepa bacteriana termófila nativa de los Géiseres de Calientes en Candarave, *Geobacillus sp P4*.

Una vez obtenida la pectinasa extracelular se realizará la purificación de la misma y su posterior caracterización a fin de determinar las condiciones que mantengan su calidad intrínseca. Se describirá el efecto del pH y temperatura extremos sobre la actividad enzimática de la pectinasa. Así mismo, la cinética enzimática, determinando las constantes de reacción Km (Michaelis-Menten) y Vmax (velocidad máxima).

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo general**

Purificar y caracterizar a la enzima pectinasa producida por *Geobacillus sp P4*.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

**1.5.2.1** Purificar la pectinasa termoestable a partir del extracto crudo obtenido.

**1.5.2.2** Determinar las características fisicoquímicas y cinéticas de la enzima pectinasa purificada.

## **1.6 Hipótesis**

Los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH, termoestabilidad y cinéticos de Km y V max permiten determinar las características de la enzima pectinasa purificada, producida por *Geobacillus sp P4*.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Pectinasas**

Según Akinyemi, Buraimoh, Ogunrinde y Amund (2017) las pectinasas son un grupo heterogéneo de enzimas que hidrolizan polímeros de pectina. Las enzimas pectinolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas superiores y microorganismos. Son de importancia primordial para las plantas, debido a que participan en los procesos de alargamiento y crecimiento celular, así como en la maduración de los frutos. (Jayani, Saxena y Gupta, 2005).

Las pectinasas pueden ser producidas por bacterias, hongos, levaduras, insectos, nematodos y protozoos. (Hoondal, Tiwari, Tewari, Dahiya y Beg, 2002).

##### **2.1.1 Pectinasas microbianas**

Kavuthodi y Sebastian (2018) mencionan que el 50 % de las enzimas accesibles en el mercado se obtienen de hongos y levaduras; 35 % de bacterias, mientras que el 15 % restante son de origen vegetal o animal.

Para la producción de enzimas se eligen como primera fuente a los microorganismos antes que a las plantas y animales por diferentes razones; (a) su producción a granel es generalmente más económica y se puede realizar en una amplia gama de condiciones ambientales, (b) producen una amplia variedad de enzimas de forma más predecible y controlable, (c) los microorganismos son fáciles de manipular para obtener enzimas de la naturaleza deseada y se pueden cultivar en grandes cantidades en un período relativamente corto con diferentes métodos ya

establecidos de fermentación y el uso de herramientas sofisticadas, (d) el volumen de enzimas obtenidas de fuentes microbianas es mayor, presentando una alta tasa de productividad y (e) los tejidos vegetales y animales contienen más materiales potencialmente dañinos que los microorganismos, incluidos compuestos fenólicos (de plantas), inhibidores de enzimas endógenas y proteasas (Chaplin y Bucke, 1990).

Se han reportado y estudiado que, bacterias y hongos, juegan un papel esencial en la fitopatogenia para la producción de pectinasas (Jayani et al., 2005). Asimismo, Chesson (1980) menciona que bacterias pertenecientes a los géneros de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Micrococcus* aisladas de lino, yute, sisal y fibra de coco, y especies del género *Erwinia* de los frutos de café han demostrado poseer la capacidad de degradar la pectina al producir enzimas pectinolíticas. Matsumoto, Jitareerat, Baba, y Tsuyumu (2003) estudiaron la biosíntesis de pectinasa bacteriana de fitopatógenos, en dos especies de *Erwinia* de pudrición blanda *E. chrysanthemi* y *E. carotovora* y reportaron la producción de un conjunto de enzimas pectinolíticas como PL, PG, PME y PAE.

Schallmeyer, Singh, y Ward (2004) indican que dentro de las diversas fuentes microbianas productoras de pectinasas, especies de *Bacillus* han sido lo más utilizados en la industria, debido a varias razones: Producen más de dos docenas de metabolitos secundarios que generan un alto potencial para aplicaciones biotecnológicas y biofarmacéuticas (Stein, 2005). Asimismo, se estima que las enzimas de *Bacillus spp.* representan aproximadamente el 50 % del mercado total de enzimas (Schallmeyer et al., 2004). Otra característica importante es que la mayoría de ellos son amigables con el medio ambiente, ya que no tienen requisitos nutricionales exigentes y su cultivo y manejo son sencillos (Sohail y Latif, 2015). Propiedades como sus altas tasas de crecimiento que conducen a

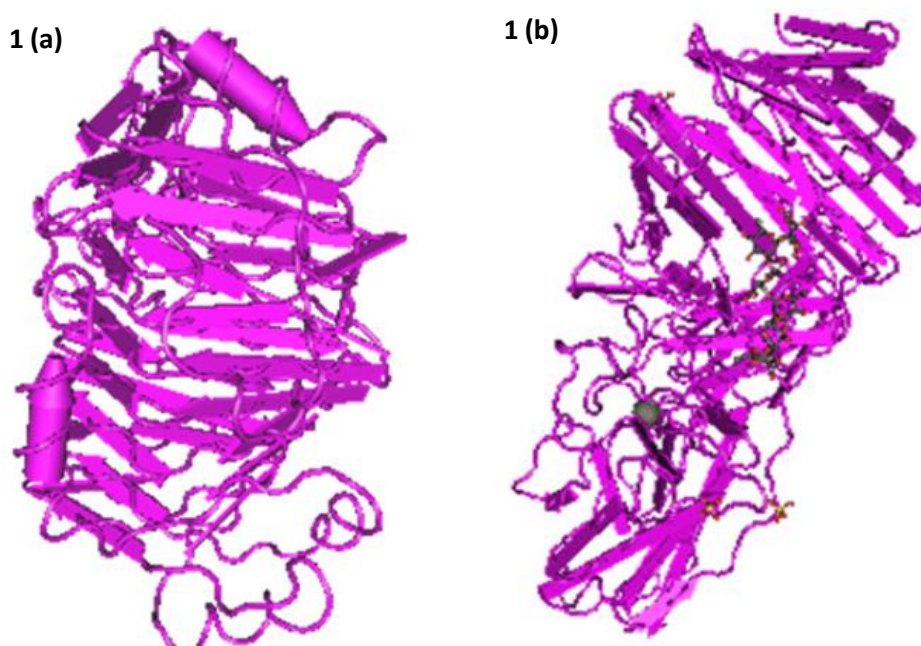
ciclos fermentativos cortos, secreción de proteínas en el medio extracelular y la capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales y nutricionales cambiantes. Producen toda clase de enzimas pécticas, y pueden producir enzimas de manera muy económica utilizando desechos agroindustriales y sustratos baratos, la fermentación se puede realizar por fermentación en estado sólido (SSF) o fermentación en estado líquido (SmF) (Barros, Simiqueli, de Andrade, y Pastore, 2013).

### **2.1.2 Estructura bioquímica de pectinasa**

Para comprender la base molecular del mecanismo enzimático se puede observar las estructuras tridimensionales de las pectinasas tal como se observa en la figura 1a, Mayans et al., (1997); figura 1b, Jensen et al., (2010) estas estructuras permiten conocer el papel de los aminoácidos individuales en los sitios activos y también proporcionan una justificación de las diferencias estructurales entre las enzimas que conducen a un reconocimiento muy específico de secuencias únicas de oligosacáridos de una mezcla heterogénea en la pared celular de la planta. Las estructuras cristalinas de las pectinasas incluyen miembros de diversas clases principales y los estudios de relación estructura-función de algunos complejos disponibles de pectinasas con sustrato/análogos podrían considerarse prototipos para miembros de la familia relacionados.

Según Yoder, Keen, y Journak, (1993) la pectina liasa de *Erwinia chrysanthemi* fue la primera estructura cristalina obtenida de una pectinasa. Además, se han observado diferentes estructuras cristalinas en otros miembros de la familia de las pectinasas. Estos incluyen pectato liasa adicionales de *Bacillus subtilis* Pel (Pickersgill, Jenkins, Harris, Nasser y Robert-Baudouy, 1994); pectato liasa alta alcalina (Akita, Suzuki, Kobayashi, Ito y Yamane, 2000); poligalacturonasas; *E. chrysanthemi*

Pel9A (Jenkins, Mayans, Smith, Worboys y Pickersgill, 2001); *Aspergillus aculeatus* poligalacturonasa (Cho, Lee y Shin, 2001); *Lycopersicon esculentum* (Jenkins et al., 2001); *E. chrysanthemi* PelA (Thomas, Chuong, Oliver y Yoder, 2002) y pectina metilesterasa de *Daucus carota* (Johansson et al., 2002). PemA de *E. chrysanthemi* (Di Matteo et al., 2005).



**Figura 1.** Estructura tridimensional 1(a) pectina liasa A, 1(b) rhamnogalacturonan liasa de *Aspergillus aculeatus* K 150a.

**Fuente:** Jenkins et al., (2001); Mayans et al., (1997)

La estructura tridimensional de pectinasa consta de un dominio de hebras- $\beta$  paralelas dobladas en un cilindro grande a la derecha. El doblaz del dominio, denominado hélice- $\beta$  paralela, es compatible con todas las reglas estructurales aceptadas de una manera única. El cilindro central tiene forma de prisma debido a su disposición y consta de siete a nueve vueltas helicoidales completas. Los hilos del giro consecutivo se alinean para formar tres hojas-b paralelas llamadas PB1, PB2 y PB3. PB1 y PB2

forman un sándwich antiparalelo  $\beta$ , mientras que PB3 se encuentra perpendicular a PB2.

El mecanismo de escisión de sustancias pécticas difiere entre esterases, hidrolasas y liasas, no obstante, los sitios de unión al sustrato deducidos de las estructuras se encuentran en una ubicación similar dentro de una hendidura formada en el exterior de la hélice-b paralela entre un lado de PB1 y los bucles sobresalientes. (Kita, Boyd, Garrett, Journak y Keen, 1996).

Se cree que las diferencias estructurales en los bucles están relacionadas con diferencias sutiles en las propiedades enzimáticas y de maceración. Actualmente no existe una estructura representante de la familia PMG.

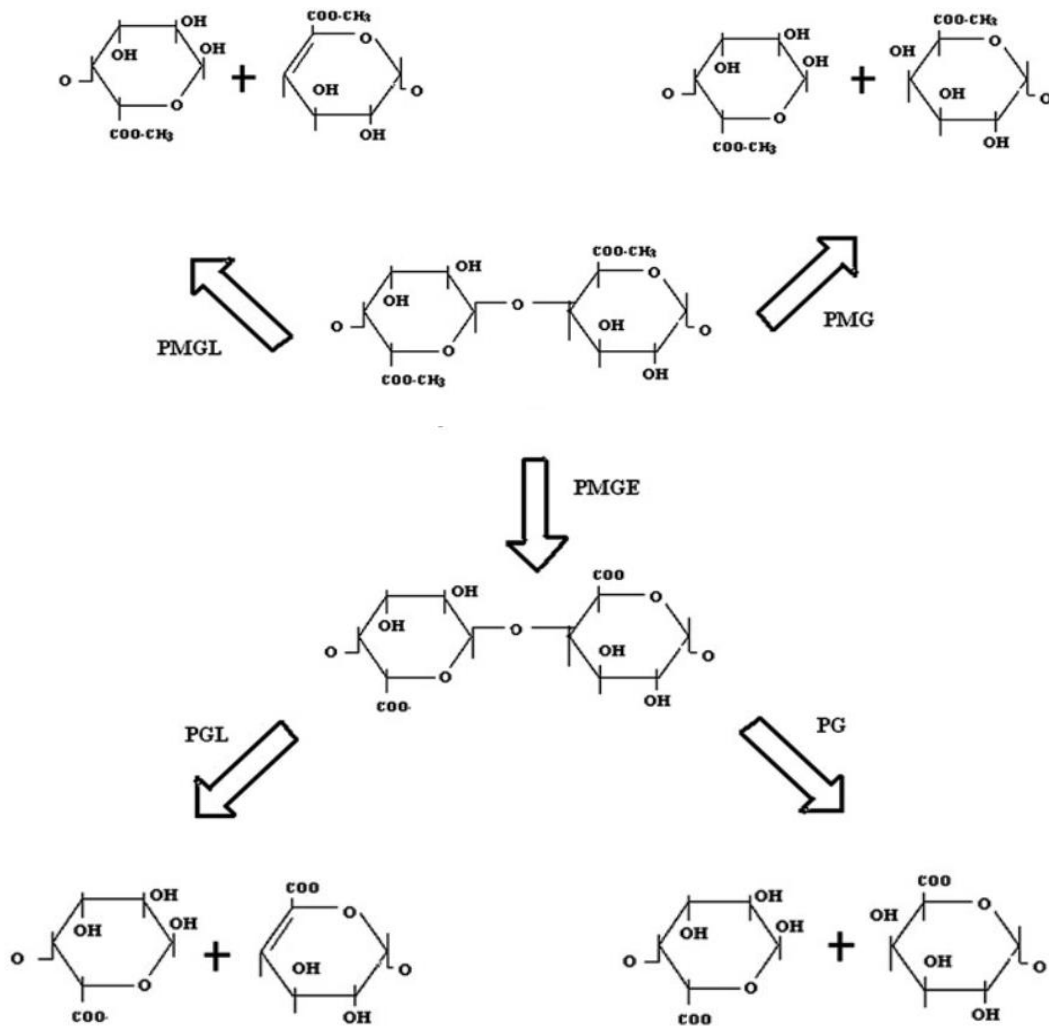
### **2.1.3 Modo de acción de pectinasa**

Dentro de las enzimas pectinolíticas ampliamente estudiadas destacan las protopectinasas, las poligalacturonasas, las liasas y la pectina esterasa. En la figura 2 (Alkorta, Garbizu, Llama, y Serra, 1998) se muestra esquemáticamente que las protopectinasas catalizan la protopectina soluble, las poligalacturonasas hidrolizan la cadena del ácido poligalacturónico mediante la adición de agua y son las más abundantes entre todas las enzimas pectinolíticas.

La pectina esterasa libera pectina y metanol mediante desertificación de los enlaces éster metílico de la cadena principal de pectina. Las liasas catalizan la escisión trans-eliminativa del polímero de ácido galacturónico (Netta Sharma, Sasankan, Singh y Soni, 2011). Las pectinasas son uno de los grupos más importantes de enzimas utilizadas en la industria de

frutas y verduras para aumentar el rendimiento y la clarificación del jugo (Netta Sharma et al., 2011). Estas enzimas actúan sobre la pectina y se clasifican según su modo de ataque en la parte galacturonasa de las moléculas de pectina. Se pueden distinguir de la pectina depolimerasa, que divide los enlaces glucosídicos entre los residuos galacturonosil (éster metílico) y de la pectina metilesterasa, que desesterifica la pectina a bajo nivel de metoxilo pectina o ácido péctico.

Las poligalacturonasas dividen por hidrólisis los enlaces glucosídicos junto a los grupos carboxilo libres, mientras que la pectato liasa divide enlaces glucosídicos junto a grupos carboxilo libres por  $\beta$  eliminación. Se sabe que ambos tipos de endopoligalacturonasas (PG) y pectina liasa (PLS) dividen de forma aleatoria la cadena de pectina. La exopoligalacturonasa libera monómeros o dímeros desde el extremo no reductor de la cadena, mientras que las exopectinasas liberan desde el extremo reductor dímeros insaturados (Martin, De Souza, Da Silva y Gomes, 2004). Las pectinas altamente metiladas se degradan por una combinación de pectina esterasa con poligalacturonasa y endopectina liasa (Nevadita Sharma, Rathore, & Sharma, 2012).



**Figura 2.** Modo de acción enzimática de PMGL, PMG, PGL y PG en la molécula de pectina. PMGLm polimetilgalacturonato liasa (pectin liasa), PMG polimetilgalacturonasa (pectina hidrolasa), PMGE polimetilgalacturonato esterasa (pectina esterasa), PG poligalacturonasa (pectina hidrolasa).

**Fuente:** Alkorta et al., (1998)

#### 2.1.4 Clasificación de pectinasas

Según Kashyap, Vohra, Chopra y Tewari (2001) las enzimas pectinolíticas se pueden dividir en tres grandes grupos:

- (I) Protopectinasas: degradan la protopectina insoluble y dan lugar a pectina soluble altamente polimerizada.
- (II) Esterasas: catalizan la desesterificación de la pectina mediante la eliminación de los ésteres metoxi.
- (III) Depolimerasas: catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ - $(1\rightarrow4)$  del ácido D-galacturónico. Las depolimerasas actúan sobre las sustancias pécticas mediante dos mecanismos diferentes, la hidrólisis, en la que catalizan la escisión hidrolítica con la introducción de agua a través del puente de oxígeno y la lisis trans-eliminación, en la que rompen el enlace glucosídico mediante una reacción de trans-eliminación sin participación de la molécula de agua (figura 2) (Sharma et al., 2012). Las depolimerasas pueden subdividirse en cuatro categorías diferentes dependiendo de la preferencia de la enzima por el sustrato, el mecanismo de escisión y la división de los enlaces glucosídicos.

Jayani et al. (2005) señala que la poligalacturonasa y la polimetilgalacturonasa descomponen el pectato y la pectina, respectivamente, por el mecanismo de hidrólisis. No obstante, la poligalacturonato liasa y la polimetilgalacturonato liasa descomponen el pectato y la pectina por extracción, respectivamente. Dependiendo de la acción del patrón, es decir, aleatorio o terminal, estas enzimas se denominan endo o exo enzimas, respectivamente.

## 2.2 Sustancias pécticas

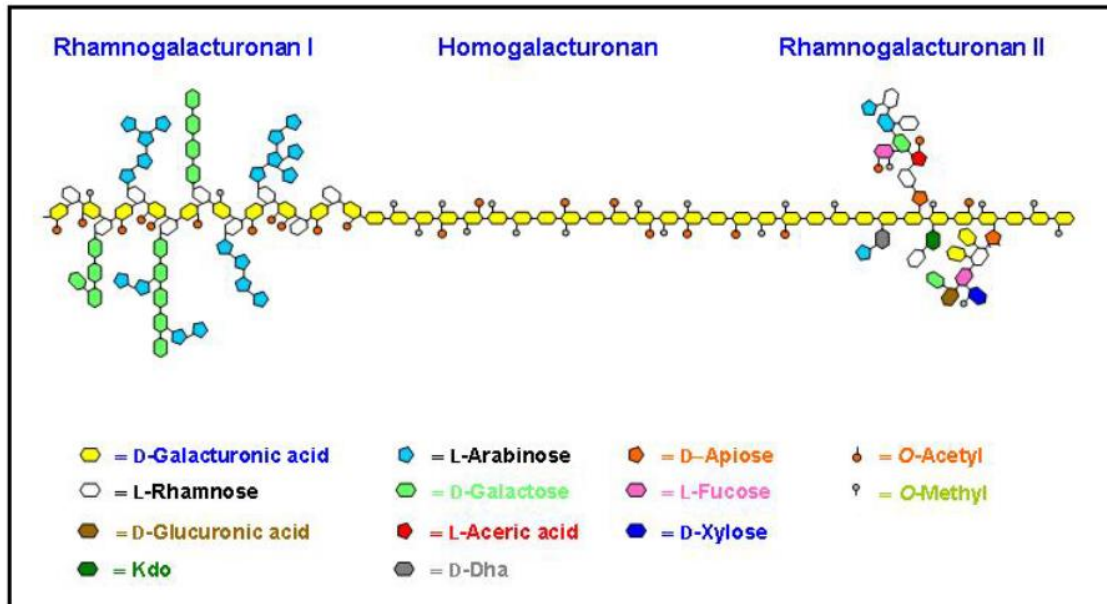
Las sustancias pécticas poseen un grado de polimerización de aproximadamente 200-400 siendo comúnmente amorfas. En la cadena principal se pueden encontrar los sustituyentes en las posiciones C-2 o C-3. Los sustituyentes pueden ser acetil o D-galactosa, D-xilosa, L-arabinosa y L-ramnosa. Según la fuente de la sustancia péctica varía su grado y tipo de ramificación, la estructura esquemática básica de la pectina se puede observar en la figura 3 (Soriano Lasheras, 2004). Durante las primeras etapas de crecimiento de las paredes celulares jóvenes se produce en el aparato de Golgi la síntesis de sustancias pécticas a partir del ácido UDP-D-galacturónico (Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. y Vandamme, 1993). A diferencia de los tejidos jóvenes que crecen activamente, los tejidos lignificados poseen un bajo contenido de sustancias pécticas. Se encuentran principalmente en frutas y verduras, en plantas superiores el contenido es muy bajo, generalmente menos del 1%, en biomasa de algas hasta un 30%, y se encuentran en bajas concentraciones en residuos forestales o agrícolas.

Existen cuatro tipos principales de sustancias pécticas: ácidos pécticos, ácido pectínico, protopectina y pectina. El ácido péctico está compuesto principalmente de ácidos poligalacturónicos coloidales libres de grupos metoxi. Las sales del ácido péctico son pectatos normales o ácidos. Los ácidos pectínicos contienen hasta un 75 % de unidades de galacturonato metilado. En condiciones adecuadas, los ácidos pectínicos son capaces de formar geles con azúcares y ácido o, si son adecuadamente bajos en contenido de metoxilo, con ciertos iones metálicos.

La protopectina se encuentra principalmente en la lámina media que sirve como pegamento para mantener las células juntas en las paredes celulares y es una sustancia insoluble en agua, produciendo pectina o ácidos

pectínicos tras una hidrólisis restringida. La insolubilidad de la protopectina se debe a: (a) su elevado peso molecular, (b) la unión de sal entre grupos carboxilo de sustancias pécticas y grupos básicos de proteínas y (c) la formación de enlaces éster entre grupos de ácido carboxílico de la pectina y el grupo hidroxilo de otros constituyentes de la pared celular. Yoshitake, S., Numata, T., Katsuragi, T., Hours, R. A., y Sakai (1994) propusieron un modelo para la estructura química de la protopectina en el que las cadenas laterales neutras de azúcar están dispuestas en bloques (regiones pilosas) separadas por regiones no sustituidas que contienen casi exclusivamente residuos de ácido galacturónico (regiones lisas). La pectina es capaz de formar geles con azúcar y ácido en condiciones adecuadas. La pectina es el material polimérico soluble en el que aproximadamente el 75 % de los grupos carboxilo de las unidades de galacturonato se esterifican con metanol.

Las principales materias primas para la producción de pectina son los residuos de la fabricación de orujo de manzana, zumos de frutas y cítricos (Alkorta et al., 1998). La extracción de pectina se lleva a cabo por hidrólisis ácida en un rango de pH de 2-3 durante 5h a alta temperatura (70–100°C). La relación sólida a líquido es normalmente alrededor de 1:18. Para separar el extracto de pectina del orujo se utiliza centrifugación o una prensa hidráulica. El extracto se filtra y finalmente se concentra a una fuerza de fraguado estándar. Para la preparación de pectina en polvo se procede a precipitar los polímeros del concentrado y se trata con productos orgánicos solventes o ciertas sales metálicas (Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., y Vandamme, 1993).



**Figura 3.** Estructura esquemática de la pectina

**Fuente:** Soriano Lasheras, 2004

### 2.3 Aplicaciones Industriales

Gerhartz (1990) señala que las pectinasas figuran entre las enzimas de aplicación industrial más antiguas, la primera aplicación comercial de estas enzimas se dio en 1930, donde se observó que las pectinasas se podían utilizar en la fabricación de zumos de frutas. A partir de ese momento, su uso ha ido en aumento, siendo frecuentemente utilizada en la actualidad en la industria alimentaria de zumos. Actualmente, las pectinasas constituyen un importante sector en el campo de enzimas industriales, en 1995 generaron ventas de alrededor de 75 millones de dólares (Kashyap et al., 2001). Las pectinasas pueden clasificarse principalmente en dos grandes tipos, desde el punto de vista de su aplicación: pectinasas ácidas y pectinasas alcalinas.

### 2.3.1 Pectinasas ácidas

Representadas en su mayoría por poligalacturonasas de origen fúngico, especialmente de *Aspergillus niger*, son utilizadas en la industria de zumos de fruta y en la fabricación de vinos. En las frutas y verduras la pectina se encuentra como componente estructural ayudando a mantener la dureza de la misma ya que en este estado permanece insoluble. En el proceso de maduración las pectinasas endógenas de la planta actúan degradando la pectina y hacen que la fruta se ablande.

La adición de pectinasas y mezclas de estas enzimas con hemicelulasas, celulasas, conjuntamente con la acción de las enzimas endógenas mejora la extracción del zumo, color, aroma y sabor de la fruta en su procesado, reduciendo el tiempo de filtración y clarificación del zumo, así como el aumento del rendimiento en la extracción del mismo (Soriano Lasheras, 2004).

Las principales aplicaciones de las pectinasas en el procesado de frutas y verduras son:

**2.3.1.1 Clarificación de zumo.** Según Kashyap et al. (2001) la clarificación consiste en la separación del zumo de los fragmentos vegetales y partículas insolubles de piel y semillas en suspensión. Las pectinasas degradan la pectina contenida en estas partículas, disminuyendo la viscosidad y la floculación de las micelas, lo cual mejora su separación del zumo por sedimentación o filtración. En el caso de zumos espumosos claros, como manzana y uva, la aplicación de pectinasas mejora la clarificación, mientras que en el caso de zumos turbios, como cítricos, tomates y néctares, la adición de pectinasas estabiliza la turbidez del zumo (Soriano Lasheras, 2004).

**2.3.1.2 Extracción de zumos.** El tratamiento con pectinasas aumenta el rendimiento en la extracción de zumo disminuyendo la viscosidad de las pulpas, este hecho tiene relevancia en algunas frutas como bayas y manzanas, cuyas pulpas con frecuencia son viscosas y semisólidas tras el prensado, y de difícil extracción de su parte soluble.

**2.3.1.3 Producción de concentrados.** Debido a su período de conservación más largo y a que presentan costes de almacenamiento y transporte disminuidos, los zumos de fruta concentrados poseen gran importancia comercial. Por ello, es necesaria la despolimerización de la pectina que evita la gelificación de los zumos durante su concentración o almacenaje.

**2.3.1.4 Productos unicelulares.** Kashyap et al. (2001) indica que los productos unicelulares son aquellos formados por maceración de sustancias vegetales, es decir, por la transformación de los tejidos vegetales en suspensiones de células intactas mediante hidrólisis selectiva de los polisacáridos de la lámina media, en ese sentido, las mezclas enzimáticas de pectinasas, celulasas y hemicelulasas se aplican con dicha finalidad. También, se originan productos que pueden ser utilizados como base material de zumos de pulpa y néctares, y en comidas de bebés, como ingredientes de productos lácteos tales como yogures y pudines, también para preparar protoplastos para aplicaciones biotecnológicas.

## **2.3.2 Pectinasas alcalinas**

Las pectinasas alcalinas se han introducido en diversos procesos industriales desde hace unos años, como en el procesado de fibras de plantas, el textil y principalmente en el enriado de lino. Hoondal et al. (2002) señalan que las enzimas que se utilizan en estos sectores son en

su mayoría de origen bacteriano, destacando las pertenecientes al género *Bacillus* tal como lo menciona Kashyap et al. (2001).

Debido al aumento del conocimiento de los mecanismos de degradación microbiana de la pectina, se están abriendo caminos en otros procesos biotecnológicos para las pectinasas alcalinas como, por ejemplo, la fabricación de papel y la purificación de virus de plantas, aunque la gran mayoría de los mismos aún no han sido comercializados.

**2.3.2.1 Textil, enriado de lino.** La industria textil requiere el procesamiento de la materia prima, tallos y hojas de lino, denominado enriado para la obtención de fibras de lino. Este proceso requiere la eliminación de las sustancias cementantes, como pectinas y hemicelulosas para liberar las fibras de celulosa de los tejidos vegetales. Para la degradación selectiva de estos compuestos se emplea la microflora autóctona de los campos o estanques en donde se realiza el proceso. Para mejorar la eficiencia y rendimiento del enriado se están realizando numerosos estudios que permitan superar los factores limitantes de la obtención de fibras de lino.

El enriado seco tiene lugar en el suelo, en la superficie de los campos mientras que el enriado húmedo consiste en sumergir la materia prima vegetal en tanques de agua templada, permitiendo la degradación de pectina por microflora anaeróbica. En ambos procesos, sobre todo en el enriado seco, la actividad celulolítica de la flora microbiana podría dañar las fibras.

El enriado con agentes químicos, es una alternativa a estos procesos tradicionales dando buenos resultados, aunque con elevado consumo de energía e impacto ambiental (Kashyap et al., 2001). El enriado enzimático, es la alternativa más prometedora al proceso, por ello,

diversos estudios se están realizando hasta la fecha mostrando que las pectato liasas con acción endo son claves para el enriado enzimático. Sin embargo, ya existen en el mercado enzimas pectinasas comerciales para este sector.

**2.3.2.2 Decrudado del algodón.** Este proceso consistente en la eliminación de ceras, sustancias hidrófobas y otras, de la superficie de las fibras para facilitar el blanqueado y la tinción posterior de hilos y tejidos. Es por ello que, las pectinasas están siendo estudiadas para degradar las pectinas que actúan como pegamento entre las sustancias que recubren las fibras y la celulosa.

**2.3.2.3 Tratamiento de aguas residuales pécticas.** El uso de pectinasas bacterianas es una alternativa para la depuración de las aguas residuales de la industria de productos cítricos. Las pectinasas alcalinas y microorganismos pectinolíticos alcalófilos se emplean para el pretratamiento de estas aguas mediante la descomposición del agua residual por tratamiento con fangos activados que facilitan la eliminación de las sustancias pécticas (Horikoshi, 1990).

**2.3.2.4 Producción de papel japonés.** Las pectinasas alcalinas producidas por *Bacillus sp* se utilizan para el enriado de fibras de Mitsumata en la fabricación de papel japonés. La pulpa de papel preparada con estas enzimas genera un papel de características muy uniformes y suaves al tacto (Kashyap et al., 2001).

**2.3.2.5 Fabricación de papel.** Durante el proceso de fabricación del papel pueden existir polisacáridos solubilizados en la materia prima los cuales, son interferentes del proceso. Reid y Ricard (2000) señalan entre dichos polisacáridos presentes al ácido poligalacturónico. La degradación por

pectinasas del ácido poligalacturónico a oligómeros disminuye la demanda catiónica del proceso.

**2.3.2.6 Extracción de aceite.** Los aceites de semilla de girasol, coco, colza, palma y olivo se producen comúnmente por extracción con disolventes orgánicos. En la extracción de aceite vegetal, proceso de licuación de los componentes estructurales de la pared celular de las semillas oleaginosas, se pueden utilizar enzimas degradadores de la pared celular, incluyendo las pectinasas (Kashyap et al., 2001).

**2.3.2.7 Fermentación del té y café.** En el procesamiento y producción de café y té, las pectinasas juegan un papel importante. Dentro de la fermentación del café se emplean microorganismos pectinolíticos, para la liberación de la cubierta mucilaginosa del grano del café. Por otro lado, el tratamiento enzimático acelera la fermentación del té, sin embargo, es necesario ajustar la dosis de enzima para evitar daño en las hojas.

**2.3.2.8 Aditivos de piensos.** A inicio de los años 80 se comenzó una intensa investigación sobre la utilización de enzimas para aumentar el poder nutritivo y la digestibilidad de piensos ricos en fibras vegetales utilizados en la alimentación de cerdos y aves. Con la adición de  $\beta$ -glucanasas en piensos basados en cebada, se obtuvieron los primeros éxitos comerciales, siendo las xilanasas las enzimas más eficientes. Comúnmente, las preparaciones enzimáticas para el forraje son cócteles multienzimáticos los cuales contienen conjuntos de glucanasas, xilanasas, pectinasas, proteinasas y amilasas. La adición de enzimas libera nutrientes tanto por hidrólisis de las fibras no degradables como por liberación de nutrientes retenidos por estas fibras, incrementando su absorción y produciendo un aumento de peso en los animales (Hoondal et al., 2002).

**2.3.2.9 Purificación de virus de plantas.** Soriano Lasheras (2004) menciona que ciertas enzimas, como las pectinasas alcalinas y las celulasas pueden ser utilizadas para liberar los virus del tejido vegetal, restringidos al floema, y así proceder a su purificación.

## 2.4 Purificación

### 2.4.1 Precipitación de proteínas

La precipitación de una proteína de un extracto se puede lograr agregando solventes orgánicos, sales, polímeros orgánicos, o simplemente variando el pH o la temperatura de la solución. Los agentes de precipitación más comúnmente usados se enumeran a continuación:

**Tabla 1**  
*Agentes precipitantes*

<b>Agente</b>	<b>Tipo</b>	<b>Propiedades</b>
Sulfato de amonio	Sal	Fácilmente soluble, estabilizante.
Sulfato de sodio	Sal	Fácilmente soluble, estabilizante.
Etol	Solvente	Inflamable, riesgo de desnaturalización.
Acetona	Solvente	Inflamable, riesgo de desnaturalización.
Polietilenglicol (PEG)	Polímero	No inflamable

**Fuente:** Janson, 2011

En la llamada serie de Hofmeister, la fuerza de un ión particular como agente de precipitación, se muestra por su posición. Los agentes de salazón más eficientes son los iones anticaotrópicos, siendo eficientes

aglutinantes de moléculas de agua, con lo que aumenta el efecto hidrofóbico en la solución promoviendo la agregación de proteínas al facilitar la asociación de superficies hidrofóbicas. Por otro lado, las sales caotrópicas disminuyen el efecto hidrofóbico ayudando a mantener las proteínas en solución.

Janson (2011) señala dentro de los solventes orgánicos polares al etanol, el cual promueve la precipitación de proteínas debido a la disminución de la actividad del agua en la solución a medida que el agua es reemplazada por el solvente orgánico. Estos solventes se han utilizado ampliamente como agentes de precipitación, especialmente para el fraccionamiento de proteínas séricas. Para evitar la desnaturalización de las proteínas es necesaria la baja temperatura durante las operaciones de precipitación; la adición de un solvente orgánico disminuye el punto de congelación de la solución y se pueden usar temperaturas inferiores a 0°C.

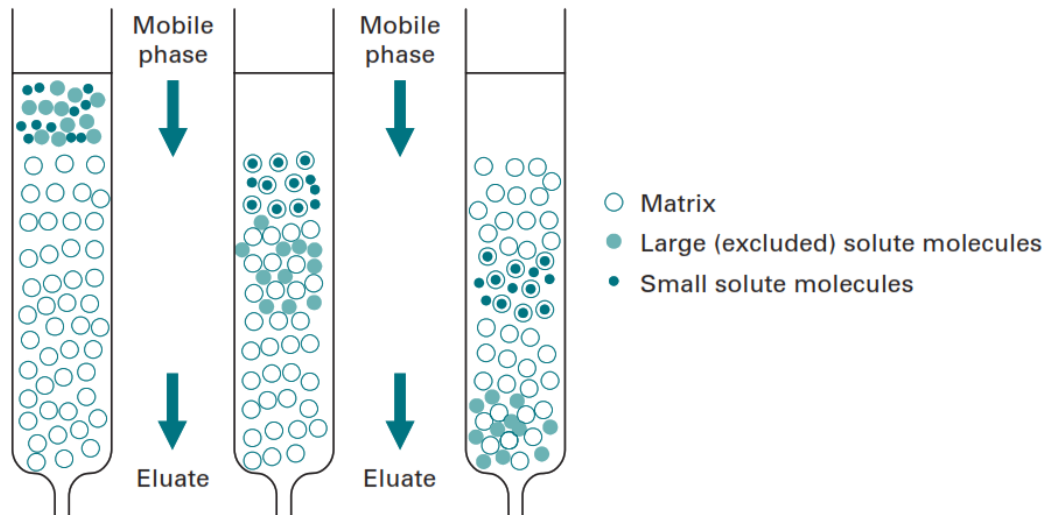
#### **2.4.2 Cromatografía de filtración en gel**

Wilson, Keith; Walker (2010) mencionan que es una técnica cromatográfica para la separación de moléculas en función de su tamaño y forma molecular aprovechando las propiedades del tamiz molecular de una variedad de materiales porosos.

Las cromatografías de exclusión o permeación o filtración en gel describen los procesos de separación molecular utilizando tamices moleculares. El principio general de la cromatografía de exclusión es bastante simple, una columna de copolímeros reticulados microparticulados generalmente de estireno o divinilbenceno y con un rango estrecho de tamaños de poro está en equilibrio con una fase móvil adecuada para que los analitos se separen. Los analitos grandes que están

completamente excluidos de los poros pasarán a través de los espacios intersticiales entre las partículas y aparecerán primero en el eluato. Los analitos más pequeños se distribuirán entre la fase móvil dentro y fuera de las partículas y, por lo tanto, pasarán a través de la columna a una velocidad más lenta, por lo que aparecerán al final en el eluato (figura 4). La fase móvil atrapada por una partícula está disponible para un analito en un grado que depende de la porosidad de la partícula y del tamaño de la molécula de analito. Por lo tanto, la distribución de un analito en una columna de partículas reticuladas está determinada únicamente por el volumen total de la fase móvil, tanto dentro como fuera de las partículas, que está disponible para él.

Para un tipo dado de partícula, el coeficiente de distribución,  $K_d$ , de un analito particular entre la fase móvil interna y externa es una función de su tamaño molecular. Si el analito es grande y está completamente excluido de la fase móvil dentro de la partícula,  $K_d = 0$ , mientras que, si el analito es suficientemente pequeño para obtener acceso completo a la fase móvil interna,  $K_d = 1$ . Debido a la variación en el tamaño de poro entre las partículas individuales, hay una fase móvil interna que estará disponible y otra que no estará disponible para analitos de tamaño intermedio; por lo tanto, los valores de  $K_d$  varían entre 0 y 1. Es esta variación completa de  $K_d$  entre estos dos límites lo que hace posible separar analitos dentro de un rango estrecho de tamaño molecular en un tipo de partícula dado.



**Figura 4.** Separación de moléculas de diferentes tamaños por cromatografía de exclusión. Las moléculas grandes excluidas se eluyen primero en el volumen vacío.  
**Fuente:** Wilson, Keith; Walker, 2010

### 2.4.3 Cromatografía de intercambio iónico

Wilson K. y Walker J. (2010) menciona que la cromatografía de intercambio iónico se basa en la atracción entre la fase estacionaria con carga opuesta, conocida como un intercambiador de iones, y el analito. Con frecuencia se elige para la separación y purificación de proteínas, ácidos nucleicos, péptidos, polinucleótidos y otras moléculas cargadas, principalmente debido a su alto poder de resolución y alta capacidad. Existen dos tipos de intercambiadores de iones, intercambiadores de cationes y aniones. Los intercambiadores de cationes poseen grupos cargados negativamente y estos atraerán cationes cargados positivamente. Estos intercambiadores también se designan como intercambiadores de iones ácidos porque sus cargas negativas provienen de la ionización de grupos ácidos. Los intercambiadores de aniones tienen grupos con carga positiva atrayendo aniones con carga negativa. El término intercambiadores de iones básicos también se utiliza para describir estos

intercambiadores, debido a que las cargas positivas generalmente resultan de la asociación de protones con grupos básicos.

#### **2.4.4 Electroforesis de proteínas**

Copeland (2000) indica que la electroforesis es una de las técnicas más utilizadas hoy en día para la separación de macromoléculas en geles hidratados de acrilamida o agarosa. La dodecil sulfato de sodio/poliacrilamida (SDS-PAGE) es la técnica electroforética más común utilizada en los ensayos enzimáticos, la cual sirve para separar proteínas y péptidos en función de sus pesos moleculares. En SDS-PAGE, las muestras de proteínas o péptidos se recubren con el detergente aniónico SDS para darles densidades de carga aniónica similares. Cuando las muestras se colocan en el gel, y se someten a un campo eléctrico, las proteínas con carga negativa migrarán hacia el electrodo con carga positiva. En estas condiciones, la migración de las moléculas hacia el polo positivo será retardada por la matriz del polímero del gel, y el grado de retraso dependerá del peso molecular de la especie sometida a electroforesis.

Las especies de peso molecular grandes serán las que pasen con mayor lentitud, mostrando una migración mínima durante un período de tiempo fijo, mientras que las especies de peso molecular más pequeño se retrasarán menos por la matriz del gel, migrando más durante el mismo período de tiempo. Se pueden encontrar diversos ejemplos del uso de SDS-PAGE para ensayos enzimáticos como enzimas proteolíticas, quinasas, nucleasas de escisión de ADN y materiales similares.

La forma más sencilla de realizar la electroforesis de proteínas es en gel, el cual sirve como medio anticonvectivo. Los resultados de la

separación se visualizan fácilmente tiñendo los geles con colorantes que se unen específicamente a las proteínas. La electroforesis de proteínas en geles se ha convertido en una técnica de separación generalizada, ya que tiene un poder de resolución muy alto, es rápida y fácil de realizar en instrumentos de diseño relativamente simple y los consumibles son económicos (Janson, 2011).

## **2.5 Caracterización**

### **2.5.1 pH**

Fromm (1975) menciona que la catálisis enzimática está marcadamente influenciada por alteraciones en la concentración de iones de hidrógeno. Las investigaciones sobre cómo el pH afecta la actividad enzimática brinda información útil sobre el mecanismo de catálisis enzimática y sobre la naturaleza de los grupos ácidos-básicos en la enzima que están asociados con la catálisis.

De la misma manera, Bisswanger (2002) indica que debido a la naturaleza poliiónica de las enzimas, los grupos cargados que no participan directamente en la catálisis establecen el comportamiento del pH de las enzimas. En el centro activo, la protonación es un proceso predominantemente reversible, mientras que los cambios en la carga de los residuos que soportan la estructura pueden causar daños irreversibles en la estructura nativa.

Asimismo, se sabe que los cambios del pH tienen influencia sobre las enzimas. El valor de pH más favorable se conoce como pH óptimo. Este es el punto en que la enzima es más activa. Los valores de pH extremadamente altos o bajos generalmente resultan en una pérdida

completa de actividad para la mayoría de las enzimas. Las enzimas generalmente son más activas en un rango de pH de 5-9 debido al hecho de que las proteínas funcionan en un entorno que refleja este pH (Fromm, 1975).

### **2.5.2 Temperatura y termoestabilidad**

La temperatura máxima es indicador de la estabilidad de una enzima. A temperaturas altas la actividad enzimática aumenta hasta cierto punto, después de lo cual la enzima se desnaturaliza, perdiendo su actividad irreversiblemente (Bisswanger, 2002).

Illanes (2008) menciona que la temperatura es una variable muy relevante en cualquier sistema biológico. Sobre todo, para el caso de procesos enzimáticos. Las enzimas son proteínas lábiles complejas y la biocatálisis se refiere a su uso en condiciones no naturales, donde sus propiedades nativas pueden alterarse significativamente. Es de esperar entonces que la temperatura tenga un profundo impacto no solo en la actividad enzimática sino también en la estabilidad enzimática.

A diferencia del pH, la temperatura ejerce efectos opuestos sobre la actividad enzimática y la estabilidad, ya que un aumento en la temperatura incrementa la velocidad de la reacción química que se cataliza mientras que también aumenta la velocidad a la que se inactiva la enzima. Bajo temperaturas moderadas (usualmente hasta 30 °C) y por períodos cortos de tiempo, la tasa de inactivación es insignificante y las tasas iniciales aumentan con la temperatura como en cualquier reacción química. A temperaturas más altas la concentración de enzima activa disminuye durante el curso de la reacción y las tasas de inactivación se vuelven preponderantes. A temperaturas suficientemente altas, la inactivación de

las enzimas mesofílicas es más alta de 60 a 70 ° C es tan rápida que las tasas iniciales de reacción se mantienen solo por un período muy corto de tiempo, lo que hace que sea muy difícil cuantificarlas; en el extremo, la velocidad de reacción inicial no dura durante el tiempo suficiente para medirlo y se considera cero. La temperatura óptima depende del tiempo, ya que la actividad enzimática es esencialmente independiente del tiempo. Por lo tanto, la temperatura óptima disminuirá al aumentar el tiempo de contacto entre la enzima y el medio de reacción.

### 2.5.3 Cinética enzimática

**2.5.3.1 Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ).** La ecuación matemática que expresa esta relación entre la tasa inicial y la concentración del sustrato se conoce como la ecuación de Michaelis-Menten tal como se muestra a continuación:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

*Donde:*

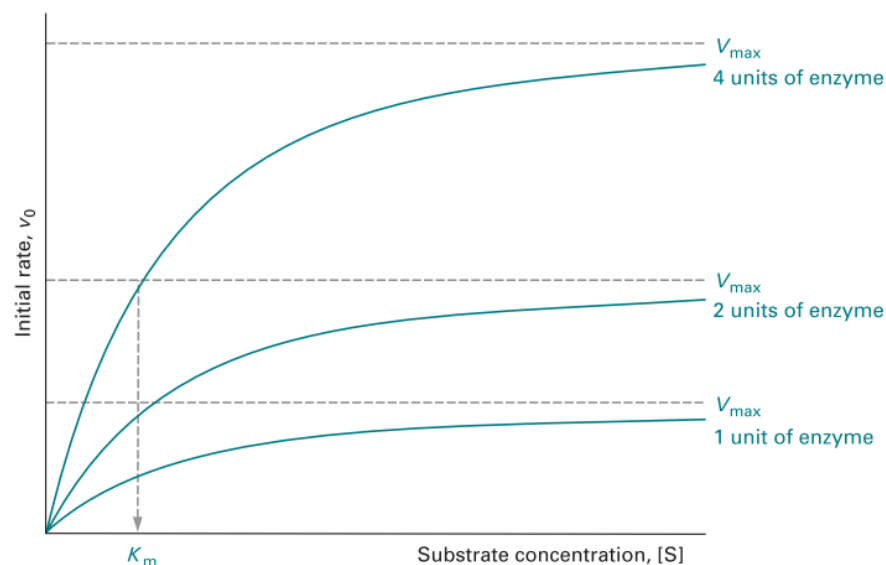
$V_{m\acute{a}x}$  : Velocidad máxima (valor límite de la velocidad inicial cuando todos los sitios activos están ocupados)

$K_m$  : Constante de Michaelis-Menten

$[S]$  : Concentración de sustrato

A bajas concentraciones de sustrato, la ocupación de los sitios activos en las moléculas de enzima es baja y la velocidad de reacción está directamente relacionada con el número de sitios ocupados. Esto se aproxima a la cinética de primer orden en que la velocidad es proporcional a la concentración del sustrato. A altas concentraciones de sustrato, todos los sitios activos están ocupados y la reacción se vuelve independiente de la concentración de

sustrato ya que no se puede formar más complejo enzima-sustrato y se observa una cinética de saturación o de orden cero. En estas condiciones, la velocidad de reacción solo depende de la conversión del complejo enzima-sustrato, ES, en productos y la difusión de los productos desde la enzima (Wilson, Keith; Walker, 2010). El  $K_m$  es igual a la concentración de sustrato a la cual la tasa inicial es la mitad de la tasa máxima (figura 5) y tiene unidades de molaridad. Generalmente los valores de  $K_m$  están en el rango de 2 a 10 M y son significativos porque permiten que se calcule la concentración de sustrato necesaria para saturar todos los sitios activos del ensayo enzimático (Illanes, 2008).



**Figura 5.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por enzimas en presencia de tres concentraciones enzimáticas diferentes. Duplicando la concentración de la enzima se duplica la tasa inicial máxima,  $V_{m\acute{a}x}$ , pero no tiene efecto en  $K_m$ .

**Fuente:** Wilson, Keith; Walker, 2010

Según Illanes (2008) a diferencia del parámetro  $K_m$ , la  $V_{m\acute{a}x}$  no es una propiedad fundamental de la enzima, ya que depende de su concentración. Esto debe tenerse en cuenta al determinar los parámetros cinéticos.

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1 Población y Muestra**

##### **3.1.1 Población**

Se encuentra constituida por 156 cepas provenientes del proyecto de investigación: “Producción Biotecnológica de enzimas industriales a partir de microorganismos termófilos de los Géiseres de Calientes, Candarave-Tacna”, las cuales estaban almacenadas en el laboratorio de biotecnología enzimática.

##### **3.1.2 Muestra**

Representada por la cepa productora de pectinasa *Geobacillus sp* P4, la cual fue escogida por ser la que mostró mejor actividad enzimática cualitativa y cuantitativa.

#### **3.2 Diseño de la investigación**

La presente investigación es de tipo experimental. El diseño para la medición y análisis de datos empleado según el propósito consistió en análisis de varianza (ANOVA) y gráficos de superficie de respuesta (RSM) los cuales fueron realizados con el software Origin Pro 9.1. y se detallan a continuación:

En los procesos de caracterización de la enzima se usó un análisis de varianza de dos vías para determinar la influencia de los factores pH y temperatura sobre la variable respuesta (actividad enzimática). Los niveles trabajados fueron, 7 para el factor pH (4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) y 6 para el factor

temperatura (4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La representación gráfica de las combinaciones de los factores se realizó a través de una gráfica de superficie de respuesta empleando la función de Gauss en 2D.

Para determinar los parámetros cinéticos, constante de Michaelis ( $k_m$ ) y velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), se estableció la relación entre la concentración de sustrato y la actividad enzimática siguiendo las ecuaciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk.

### **3.3 Materiales y Equipos:**

#### **3.3.1 Materiales**

- Algodón
- Caja de plástico para puntas 100  $\mu$ l
- Caja de plástico para puntas 1000  $\mu$ l
- Columna vacía para cromatografía
- Espátula doble de acero inoxidable
- Dispositivos Amicon de 30 kDa
- Dispositivos Amicon de 50 kDa
- Dispositivos Amicon de 100 kDa
- Frasco de vidrio transparente con tapa rosca 30ml
- Gradilla para microtubos
- Guantes de látex
- Matraz Erlenmeyer 250ml
- Micropipeta de volumen variable 20-200 $\mu$ l
- Micropipeta de volumen variable 100-1000 $\mu$ l
- Microtubos para centrifuga de 1,5ml
- Microtubos para centrifuga de 2ml
- Papel aluminio

- Plástico film
- Puntas de plástico para micropipetas 1000µl
- Puntas de plástico para micropipetas 100µl
- Termómetro digital de mercurio/graduación hasta 200°C

### 3.3.2 Reactivos

- Ácido dinitrosalicílico (DNS)
- Colorante de Coomasie Blue G-250
- Dodecil sulfato sódico (SDS)
- EDTA (Sal Disódica, Dihidratado)
- Extracto de levadura
- Fosfato monobásico de sodio anhidro
- Fosfato dibásico de sodio anhidro
- Marcador peso molecular para proteínas 10-225kDa
- Reactivo de Bradford
- Resina de intercambio aniónico DEAE-sephacell
- Seroalbúmina bovina (BSA)
- Pectina de manzana
- Polietilenglicol 8,000
- Polietilenglicol 20,000
- Seroalbúmina bovina (BSA)
- Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Sulfato de magnesio  $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$
- TBA (ácido tiobarbitúrico)
- Neurobion 5000

### 3.3.3 Equipos

- Balanza analítica
- Agitador magnético
- Autoclave
- Centrífuga con sistema de refrigeración
- Cocina eléctrica
- Equipo de electroforesis horizontal y vertical
- Incubadora (70°C)
- Lector de microplacas
- Refrigerador y congelador

## 3.4 Técnica de trabajo

### 3.4.1 Producción de la enzima pectinasa

**3.4.1.1 Preparación del material biológico.** La cepa de *Geobacillus sp* P4 con la que se realizó el presente estudio fue cedida, previa coordinación, con el proyecto de investigación: “Producción Biotecnológica de enzimas industriales a partir de microorganismos termófilos de los geiseres de Calientes, Candarave-Tacna”. Para reactivar la cepa P4 congelada se realizó un pre-inóculo en medio líquido (LB). Empleándose 10ml de caldo Luria-Bertani (LB) y se incubó a 60°C por un periodo de 24 horas.

**3.4.1.2 Medio de Producción.** La producción de pectinasa termoestable se realizó por fermentación sumergida en matraz Erlenmeyer de 250ml se inoculó al 10 % el medio fermentativo obteniendo un volumen total de 100ml con una densidad óptica (D.O) de 0,3-0,5 medido a una longitud de onda de 600nm. El medio fermentativo modificado tiene la siguiente composición: Extracto de levadura 0,1 %; MgSO<sub>4</sub> 0,05 %; CaCl<sub>2</sub> 0,05

%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 %;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,01 %; pectina de manzana 0,6338 %; salvado 0,9318 %; neurobion 0,0224 %; y  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  0,7 %.

**3.4.1.3 Cuantificación de proteínas.** La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando muestras concentradas o diluciones de los mismos. Para la curva de calibración se utilizó seroalbúmina bovina a una longitud de onda de 595 nm. Se realizaron duplicados para cada muestra (Bradford, 1976).

**3.4.1.4 Determinación de la actividad enzimática.** La medición de actividad enzimática de pectinasa se realizó de acuerdo a la tabla 2

**Tabla 2**  
*Ensayo de reacción para pectinasas*

Reactivos	Blanco de reactivo (BR)	Blanco de sustrato (BS)	Blanco de la enzima (BE)	Reacción (ES)
Tampón fosfato pH 7 a 50mM( $\mu\text{L}$ )	200	100	100	
Pectina (0,5 %) diluido en tampón fosfato pH 7 a 50mM( $\mu\text{L}$ )		100		100
Extracto enzimático ( $\mu\text{L}$ )			100	100
Incubar los tubos en baño maría a 60°C por 30 minutos				
Reactivo DNS ( $\mu\text{L}$ )	400	400	400	400
Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente enfriarlos en baño de agua corriente				
Agua destilada	800	800	800	800

**Fuente:** Chaiyasut et al., (2013)

Se agitaron bien los tubos y se leyeron las absorbancias a 540 nm contra el blanco de reactivo (BR). Calculándose la concentración de ac. D-poligalacturónico en el blanco del sustrato (BS), en el blanco de la muestra (BE) y en la muestra respectiva (ES), utilizando la curva

estándar de ac. D-galacturónico con la ecuación de regresión encontrada previamente. En el caso de los valores de la absorbancia de la muestra que escaparon del rango de la curva estándar, se realizaron diluciones de 1/2 y 1/4 según corresponda. La concentración de ac. D-poligalacturónico real de la muestra se determinó de la siguiente manera:

$$[\text{D-poligalacturónico}] = [\text{ES}] - ([\text{BS}] + [\text{BE}])$$

La actividad enzimática de pectinasas se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Act. enzimática} \left( \frac{\text{U}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{ac. D - galacturónico} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right) \times \text{Vol. Sol. total (ml)}}{\text{Extracto enzimático (ml)} \times \text{tiempo de reacción (m)}}$$

La actividad de pectinasas fue expresada en U/ml, la cual es definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ac. D-poligalacturónico por minuto (Chaiyasut et al., 2013).

### **3.4.2 Purificación de la enzima pectinasa**

#### **3.4.2.1 Precipitación por fraccionamiento con sulfato de amonio y diálisis.**

Transcurrido el período de incubación, se procedió a centrifugar a 10 000 rpm por 20 min. Al sobrenadante libre de células o extracto enzimático crudo, se le añadió lentamente sulfato de amonio hasta alcanzar saturaciones del 10%, 20% 30 %, 40% y 50 % a movimiento constante (tabla 3). Después de centrifugar a 6000 rpm por 30 min a 4°C, los precipitados se suspendieron en tampón fosfato de sodio 50mM a pH 7,0 y se dializaron a 4 °C durante 24 h contra el mismo tampón a fin de eliminar sales y otras sustancias orgánicas (Bukhari y

Rehman, 2015). Finalmente, se realizaron ensayos de actividad enzimática a las soluciones resultantes del proceso de diálisis.

**Tabla 3**  
*Tabla de Saturación con Sulfato de Amonio*

Concentración inicial de sulfato de amonio (%)

Concentración inicial de sulfato de amonio (%)	%	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767	
10		28	57	86	118	137	190	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694	
15			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657	
20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619	
25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583	
30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546	
33							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522	
35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506	
40									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469	
45										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431	
50											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392	
55												33	67	103	141	179	220	264	307	353	
60													34	69	105	143	183	227	269	314	
65														34	70	107	147	190	232	275	
70															35	72	110	153	194	237	
75																36	74	115	155	198	
80																	38	77	117	157	
85																		39	77	118	
90																			38	77	
95																				39	

Gramos de sulfato de amonio que hay que añadir a 1L de solución

Fuente: Janson, 2011

**3.4.2.2 Cromatografía de filtración en gel.** La solución dializada se cargó en una columna empaquetada con Sephadex G-100 (20 x 1,5 cm) y las proteínas se eluyeron utilizando tampón fosfato de sodio (50 mM, pH 8,0). Las fracciones se recolectaron y se determinaron el contenido de proteína y la actividad pectinolítica, luego se agruparon, concentraron y se guardaron para posteriores análisis (Demir, Nadaroglu, Tasgin, Adiguzel y Gulluce, 2011).

**3.4.2.3 Cromatografía de intercambio iónico.** La muestra concentrada se sometió a cromatografía de intercambio aniónico, empleando como resina DEAE-celulosa. La resina se equilibró con buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0 y la elución se realizó empleando soluciones de NaCl con un gradiente lineal de 0,1-0,4 M. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas con el método de Bradford y actividad enzimática para pectinasas (DNS). Las fracciones positivas de pectinasa se agruparon y guardaron para su posterior análisis (Demir et al., 2011).

**3.4.2.4 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE.** Las separaciones electroforéticas en condiciones desnaturantes se realizaron en una cámara vertical de electroforesis. Las muestras se prepararon en razón 3:1 con buffer de carga 5X, se sometieron a ebullición durante 5 minutos y posteriormente se cargaron en geles de bis-acrilamida al 12,5 % (p/v). La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 200V-250V, utilizando buffer de corrida.

Para la visualización de las proteínas en el gel de poliacrilamida, se procedió a teñirlo durante 1 h con una solución de tinción Coomassie, incubándolo a temperatura ambiente. Luego, se realizó el desteñido con la solución de metanol incubándolo a temperatura ambiente.

Finalmente, para la determinación del peso molecular se utilizó un patrón de proteínas conocidos como:  $\alpha$ -lactoalbúmina de bovino (14,4 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocito de bovino (30 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa) y fosforilasa b de músculo de conejo (94 kDa).

### 3.4.3 Caracterización fisicoquímica

**3.4.3.1 Interacción pH vs Temperatura.** Para la determinación de los efectos de la interacción de temperatura y pH sobre la actividad enzimática de la pectinasa purificada, se hicieron ensayos a 30, 40, 50, 60, 70 y 80 ° y a diferentes pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Para procesamiento de resultados se empleó el programa OriginPro 9.1 generándose las gráficas de superficie de respuesta y de contorno.

**3.4.3.2 Termoestabilidad.** Para evaluar la termoestabilidad se determinó la actividad enzimática de la pectinasa en condiciones iniciales, posteriormente, se sometió a la enzima a diferentes temperaturas 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 ° C y se procedió a medir la actividad residual a los 30, 60, 180 y 240 min. Las curvas de termoestabilidad se realizaron con el programa OriginPro 9.1.

### 3.4.4 Caracterización cinética

**3.4.4.1 Determinación del Km y Vmáx.** Para evaluar la cinética enzimática se realizó la curva de sustratos a diferentes concentraciones de pectina de manzana (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 7,5 mg/ml, 10 mg/ml y 12,5 mg/ml) a fin de poder determinar la velocidad en cada una de las concentraciones y mediante las ecuaciones de Michaelis- Menten y Lineweaver-Burk se calcularon los valores del Km y V máx de la pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Producción de la enzima pectinasa

**Tabla 4**

*Evaluación de producción de pectinasa*

	<b>Proteínas Totales (mg/ml)</b>	<b>Actividad enzimática (U/ml)</b>
Extracto crudo	0,190	0,346

En la tabla se muestran los valores de proteínas totales y actividad enzimática del extracto crudo de la pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4, la producción se realizó mediante la técnica de fermentación sumergida.

**Fuente:** Elaboración propia

#### 4.2 Purificación de la enzima pectinasa

##### 4.2.1 Precipitación con sulfato de amonio, diálisis y ultrafiltración

**Tabla 5**

*Concentración por precipitación con Sulfato de Amonio*

<b>Sulfato de amonio (%)</b>	<b>Absorbancias (540 nm)</b>	<b>Actividad enzimática (U/ml)</b>
10	0,220	0,610
20	0,350	0,897
30	0,240	0,647
40	0,185	0,546
50	0,087	0,324

En la tabla 5 se pueden observar las precipitaciones del extracto enzimático de pectinasas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio al 10, 20, 30, 40 y 50 %, a medida que va aumentando la concentración de la sal va disminuyendo la actividad enzimática.

**Fuente:** Elaboración propia

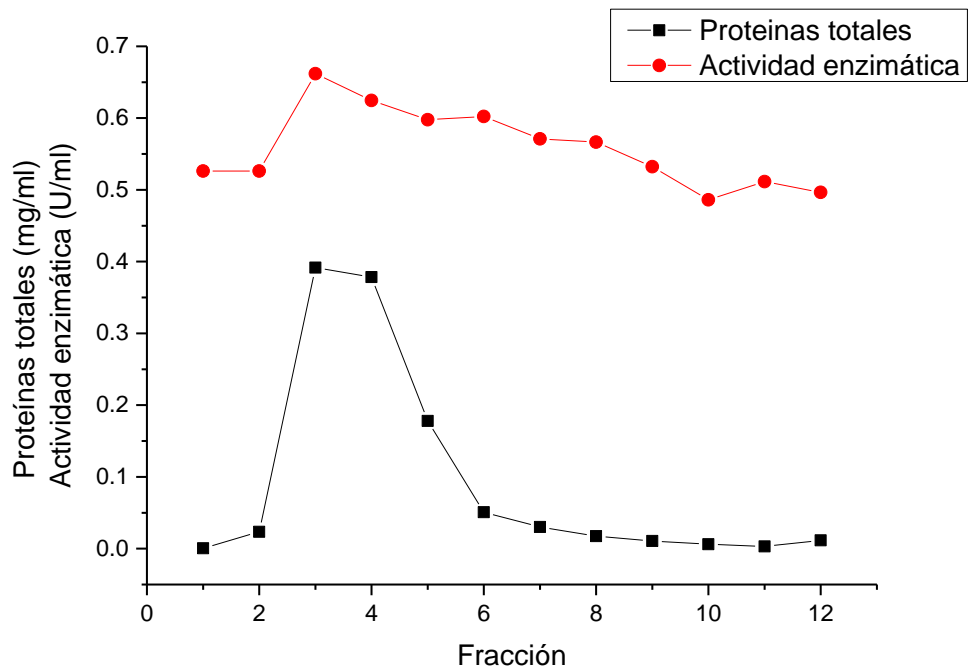
#### 4.2.2 Cromatografía de filtración en gel

**Tabla 6**

*Proteínas totales y actividad enzimática de las Fracciones de Cromatografía de Filtración en gel (Sephadex G-100)*

<b>Fracción</b>	<b>Proteínas Totales (mg/ml)</b>	<b>Actividad enzimática (U/ml)</b>
1	0,001	0,526
2	0,023	0,526
3	0,392	0,662
4	0,378	0,625
5	0,178	0,598
6	0,051	0,602
7	0,030	0,571
8	0,017	0,566
9	0,011	0,532
10	0,006	0,486
11	0,003	0,511
12	0,012	0,496

**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 6.** Cromatografía de filtración en gel de la pectinasa producida por *Geobacillus* sp P4. En la figura se observa que, en la fracción 3 se alcanzan los valores máximos de proteínas totales y actividad enzimática siendo 0,392 mg/ml y 0,662 U/ml respectivamente.

**Fuente:** Elaboración propia con software OriginPro 9.1

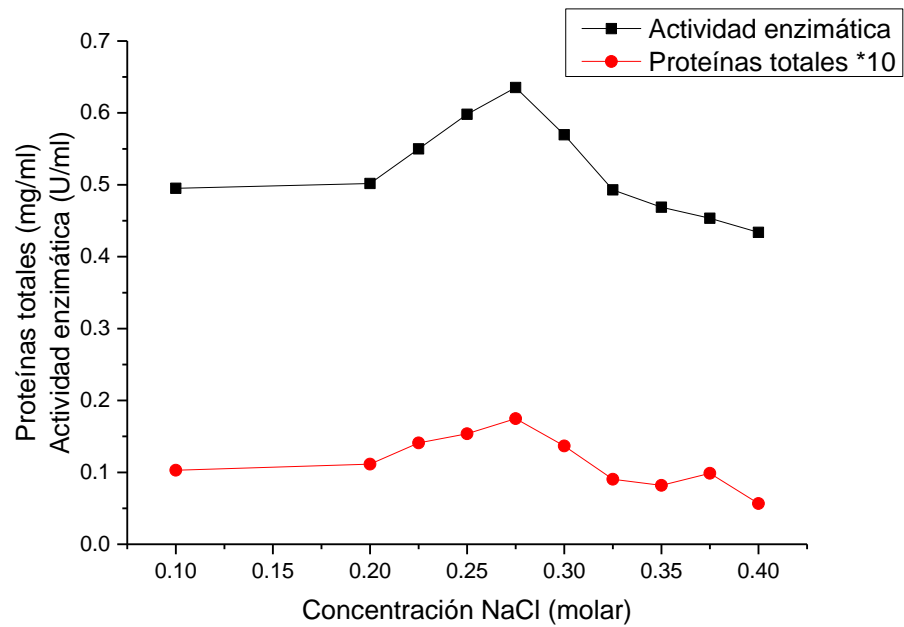
### 4.2.3 Cromatografía de intercambio iónico

**Tabla 7**

*Proteínas totales y actividad enzimática de cromatografía de Intercambio iónico*

<b>Concentración NaCl (Molar)</b>	<b>Proteínas Totales (mg/ml)</b>	<b>Actividad enzimática (U/ml)</b>
0,100	0,010	0,495
0,200	0,011	0,502
0,225	0,014	0,550
0,250	0,015	0,598
0,275	0,017	0,635
0,300	0,014	0,570
0,325	0,009	0,493
0,350	0,008	0,469
0,375	0,010	0,454
0,400	0,006	0,434

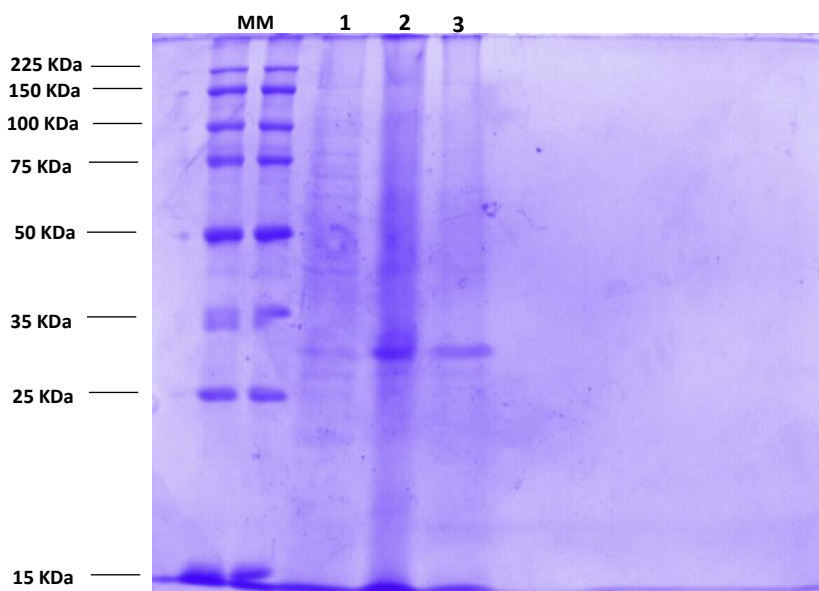
**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 7.** Cromatografía de Intercambio iónico de la pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4. En la figura se observa que, con una concentración de 0,275 M de NaCl se logra separar la enzima de interés obteniéndose los valores máximos de proteínas totales 0,017 mg/ml y actividad enzimática 0,635 U/ml.

**Fuente:** Elaboración propia con software OriginPro 9.1

#### 4.2.4 Electroforesis y determinación del peso molecular por SDS-PAGE



**Figura 8.** Fotografía de la corrida electroforética de las fases de purificación. (MM) marcador de peso molecular, (1) extracto enzimático, (2) concentrado y dializado al 20 % con  $\text{NH}_2\text{SO}_4$ , (3) Cromatografía mediante filtración en gel. El tamaño aproximado de la enzima pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4 es de 30 KDa.

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 8**

*Purificación de enzima pectinasa*

Muestras	Volumen (ml)	Actividad enzimática (U/ml)	Proteínas totales (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteínas totales (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	15	0,346	0,190	5,190	2,845	1,824	1,000	100,000
Dializado	5	0,897	0,520	4,486	2,601	1,725	0,950	86,450
Sephadex G-100	3	0,663	0,392	1,990	1,177	1,690	0,930	38,350
DEAE-Celulosa	1	0,635	0,017	0,635	0,017	37,063	20,320	12,240

En la tabla 3 se describen las etapas de la purificación de la enzima pectinasa, lográndose purificar 20 veces con un rendimiento del 12.24 % y una actividad específica de 37.06 U/mg.

**Fuente:** Elaboración propia

### 4.3 Caracterización de la enzima

#### 4.3.1 Caracterización fisicoquímica

##### 4.3.1.1 Interacción pH vs Temperatura

**Tabla 9**

*Análisis de varianza de la interacción pH - temperatura de la pectinasa producida por Geobacillus sp P4*

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Regression	6	41,506	6,91761	564,02268	0
Residual	78	0,957	0,01226		
Uncorrected Total	84	42,462			
Corrected Total	83	4,153			

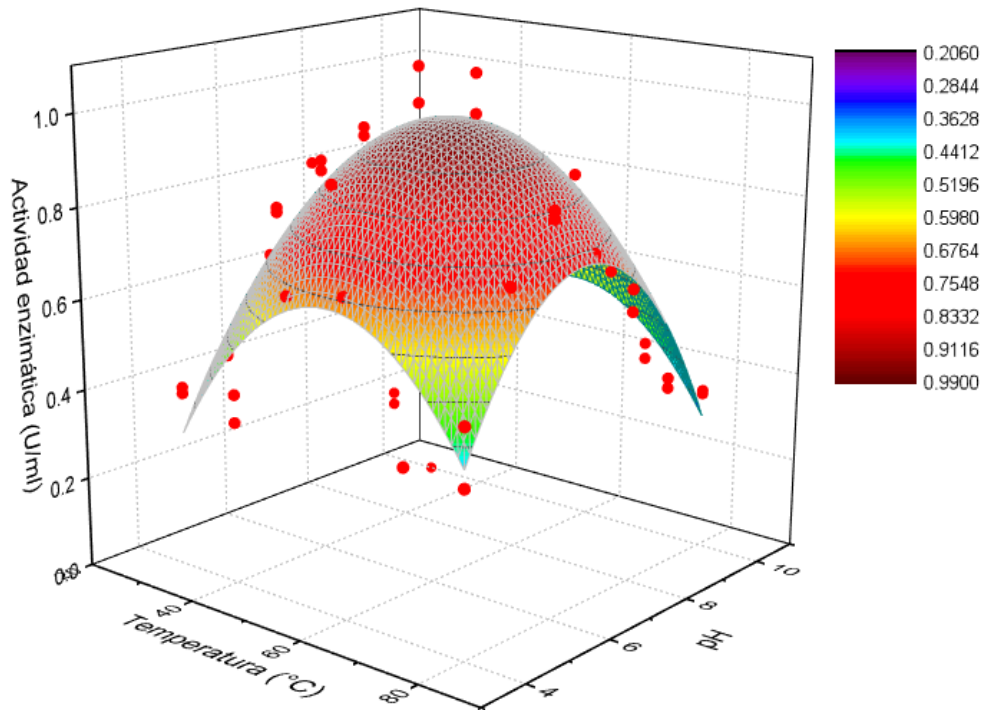
Fuente: Elaboración propia con software OriginPro 9.1

**Tabla 10**

*Análisis estadístico de la interacción pH - temperatura de la pectinasa producida por Geobacillus sp P4*

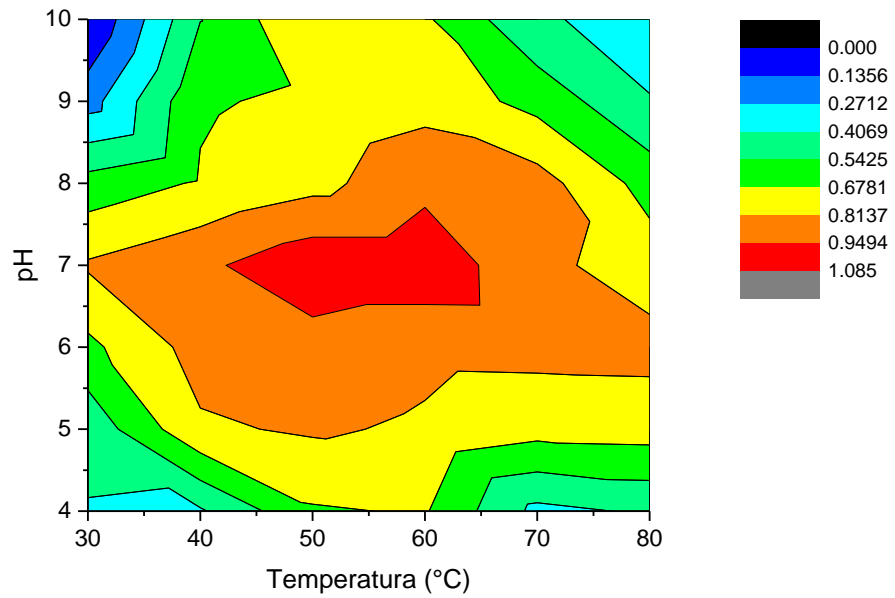
Actividad enzimática	
Number of Points	84
Degrees of Freedom	78
Reduced Chi-Sqr	0,01226
Residual Sum of Squares	0,95665
Adj. R-Square	0,75488
Fit Status	Succeeded(100)

Fuente: Elaboración propia con software OriginPro 9.1



**Figura 9.** Gráfica de superficie de respuesta de la interacción entre temperatura y pH. En la figura se observa la interacción temperatura - pH teniendo como variable respuesta la actividad enzimática de pectinasa, los valores de actividad máximo y mínimo corresponden a 0,990 U/ml y 0,206 U/ml respectivamente.

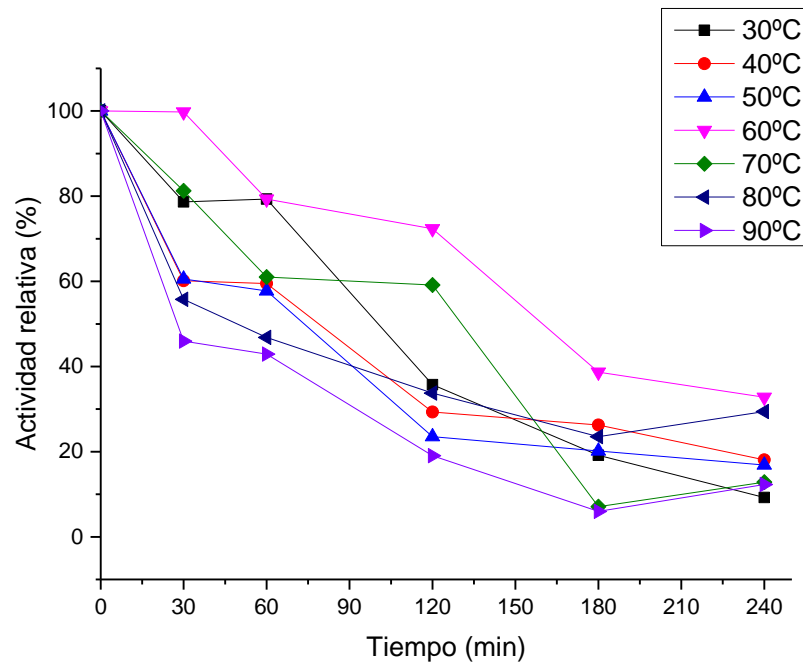
**Fuente:** Elaboración propia con software OriginPro 9.1



**Figura 10.** Gráfica de contorno de la interacción entre temperatura y pH. Las diferentes regiones representan la actividad enzimática obtenida en la interacción entre temperatura – pH. La superficie roja indica la interacción con mayor actividad enzimática de la enzima pectinasa, la cual se obtuvo en rangos de temperatura entre 50 – 60 °C y pH entre 6,5 – 7,5.

**Fuente:** Elaboración propia con software OriginPro 9.1

### 4.3.1.2 Termoestabilidad



**Figura 11.** Gráfica de termoestabilidad de enzima pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4. Se indican los valores de actividad relativa (%) después del tratamiento de la enzima a diferentes temperaturas y tiempos de incubación. A temperatura de 60 °C la enzima alcanza una actividad relativa de 99,78% a los 30 min de incubación, a los 60 min 79,30%, 72,33% a los 120 min y finalmente a partir de los 180 min la actividad es menor a 40%. A temperatura de 90°C la enzima alcanza una actividad relativa de 45,95% a los 30 min de incubación, a los 60 min 42,95%, finalmente a partir de los 120 min la actividad es menor a 20%.

**Fuente:** Elaboración propia con software OriginPro 9.1

## 4.3.2 Caracterización cinética

### 4.3.2.1 Determinación del Km y V<sub>máx</sub>

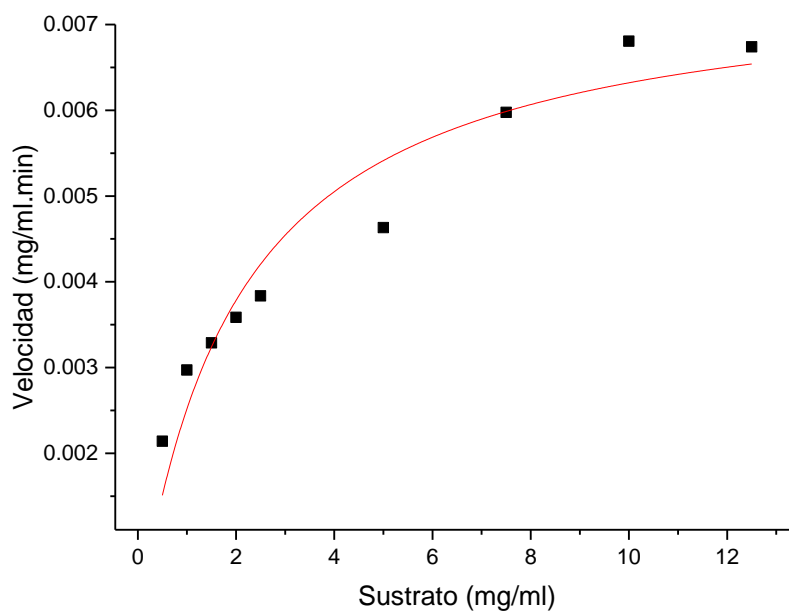
**Tabla 11**

*Tabla de las inversas 1/V y 1/S*

Sustrato (mg/ml)	Producto (mg/ml)	Velocidad (mg/ml.min)	1/V	1/S
0,00	0,000	0,0000	0,0000	0,00
0,50	0,064	0,0021	466,9767	2,00
1,00	0,089	0,0030	336,5363	1,00
1,50	0,099	0,0033	304,2424	0,67
2,00	0,108	0,0036	278,8889	0,50
2,50	0,115	0,0038	260,7792	0,40
5,00	0,139	0,0046	215,9140	0,20
7,50	0,179	0,0060	167,3333	0,13
10,00	0,204	0,0068	146,9268	0,10
12,50	0,202	0,0067	148,3744	0,08

En la tabla 11 se muestra las concentraciones de sustratos empleadas en el experimento, sus productos obtenidos y las inversas de las velocidades de reacción y sustratos.

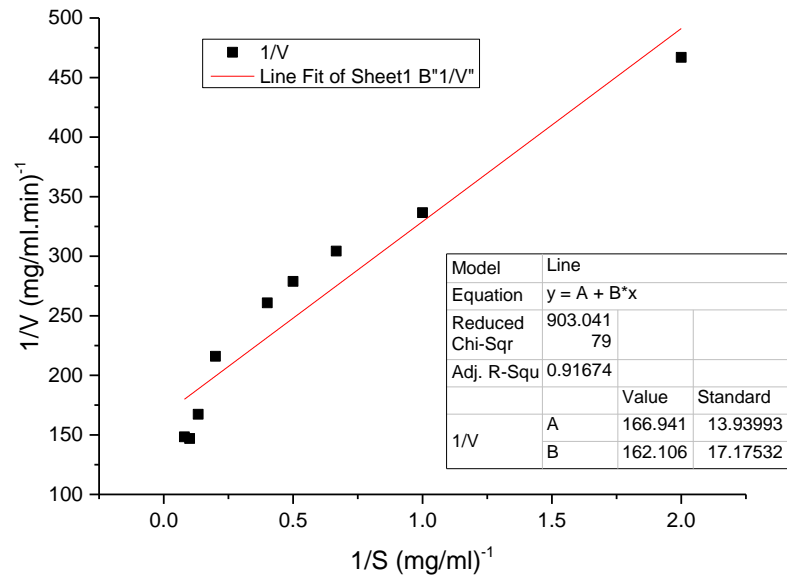
**Fuente:** Elaboración propia



Parámetros cinéticos	Valor	Error estándar
Vmax	0,00759	0,00053
Km	2,01340	0,43112

**Figura 12.** Gráfica de Michaelis-Menten. Se muestran las velocidades obtenidas a diferentes concentraciones de sustrato, a través de la ecuación generada se calcularon los parámetros cinéticos de velocidad máxima 0,00759 mg/ml.min y constante de Michaelis-Menten (km) 2,0134 mg/ml.

**Fuente:** Elaboración propia con software OriginPro 9.1



Parámetros cinéticos	Valor	Error estándar
<b>Vmax</b>	0,00759	0,00053
<b>Km</b>	2,01340	0,43112

**Figura 13.** Gráfica de Lineweaver-Burk. Se muestra la ecuación de Lineweaver-Burk obtenida a partir de las inversas de velocidad enzimática y concentración de sustrato, se calcularon los parámetros cinéticos de velocidad máxima 0,00759 mg/ml.min y constante de Michaelis-Menten (km) 2,0134 mg/ml.

**Fuente:** Elaboración propia con software OriginPro 9.1

## **CAPÍTULO V**

### **ANÁLISIS Y DISCUSIÓN**

#### **Purificación de la enzima pectinasa**

La purificación de la pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4 se realizó secuencialmente en tres etapas: precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico.

En la primera etapa se evaluaron diferentes concentraciones de saturación con sulfato de amonio (10, 20, 30, 40 y 50%), encontrándose una mayor precipitación al 20% con una actividad pectinolítica de 0,897 U/ml y 0,520 mg/ml de proteínas totales. Esto coincide con Lozano y López (2001) quienes trabajaron con una enzima endopoligalacturonasa y pectinesterasa obteniendo mejores valores de concentración al 20%, así mismo, Rodrigues, De Almeida, y Da Silva (2010) determinaron que concentraciones altas de sulfato de amonio tienen un efecto negativo en la enzima, mostrando una evidente inhibición en su actividad.

En la segunda etapa, la cromatografía de filtración en gel se llevó a cabo en Sephadex G-100, obteniendo la caída de la enzima en la fracción 3 con 0,662 U/ml de actividad enzimática y 0,392 mg/ml de proteínas totales, el uso de este tipo de resina para separación de enzimas pectinolíticas ha sido reportada en diversos trabajos tales como Demir, Nadaroglu, Tasgin, Adiguzel, y Gulluce (2011).

Finalmente, en la tercera etapa de cromatografía de intercambio iónico, la enzima de interés precipitó a una concentración de 0,275 M de NaCl con valores máximos de proteínas totales de 0,017 mg/ml y 0,635 U/ml de actividad enzimática, este tipo de purificación utilizó NaCl como agente eluyente debido a que esta sal posee iones que desplazan las proteínas de manera más eficiente.

Asimismo, la mayoría de las proteínas se eluyen a concentraciones de sal inferiores a 1 M tal como lo indica Janson (2011).

Estos resultados nos muestran un rendimiento del 86,45% en la etapa de precipitación con sulfato de amonio; 38,35% en cromatografía de filtración en gel y 12,24% en cromatografía de intercambio iónico. Con estos valores inferimos que el proceso de purificación de la pectinasa alcanza un buen rendimiento, lográndose purificar 20,32 veces con una actividad específica de 37,063 U/mg.

El análisis SDS-PAGE de la pectinasa presentó una banda de proteína con un peso molecular estimado de aproximadamente 30kDa después de la cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-100). Este tamaño de peso molecular obtenido es similar a lo descrito por Mahmoud, Amr; Elgamal, Mamdouh; Abdel, Shakour; Salem (2014) quienes reportaron una pectinasa producida por la bacteria *Anoxybacillus contaminans Wh20* de 30kDa aproximadamente. De la misma manera, Das, A., Bhattacharya, S., Reddy, N.V. y Sundara (2013) encontraron una pectinasa purificada de *Streptomyces sp.* de 32kDa al igual que Mukesh, K.J., Saranya, G.M., Suresh, K., Andal, P.D., Rajakumar, R., Kalaichelvan (2012) quienes mostraron que, el peso molecular de la enzima pectinasa purificada era de 37kDa por *Bacillus sp MFW7*. Esto indica que se ha logrado separar la enzima pectinasa producida por *Geobacillus sp P4*, con lo cual, es posible estudiar sus características fisicoquímicas y cinéticas.

### **Caracterización de la enzima**

En la determinación de las características fisicoquímicas de la enzima pectinasa purificada se encontró que los rangos de temperatura óptimos estaban entre 50 - 60°C, valores similares se encontraron en la investigación Hussain Hadri et al. (2019) quienes trabajaron con cepas de *Bacillus licheniformis* IEB-8

productoras de pectinasas encontrándose una temperatura óptima a 55°C, de la misma manera Nadaroğlu, Taşkin, Adigüzel, Güllüce y Demir (2010) encontraron una actividad enzimática óptima a 60°C en una cepa productora de pectin liasa de *Bacillus pumilus* (P9). Con respecto al pH, se encontraron valores óptimos entre 6,5 – 7,5, valores similares se encontraron en el trabajo de Oumer y Abate (2017) quienes determinaron el pH óptimo de 7,5 para una enzima pectinasa producida por *Bacillus subtilis* Btk 27.

La enzima pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4 presentó una estabilidad térmica a 60°C, manteniendo los valores de actividad residual por encima de 70 % en los primeros 120 min de incubación, valores similares se obtuvieron en el trabajo de Nadaroğlu et al. (2010) el cual encontró una mayor actividad relativa en temperaturas de 40, 50 y 60°C hasta los 120 minutos con la bacteria *Bacillus pumilus* (P9). Por otro lado, a 90°C la enzima pectinasa mostró una menor termoestabilidad debido a que los valores de actividad relativa disminuyen rápidamente, de 45,97 % a los 30 min, 42,92 % a los 60 min, 19,06 % a los 120 min y finalmente a partir de los 180 min la actividad es menor a 13 %, esto coincide con la investigación de Demir, Nadaroglu, y Tasgin (2011) quienes trabajaron con una pectinasa producida por *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 encontrando una estabilidad térmica en temperaturas de 50 y 60°C hasta 60 min, no obstante, su actividad decreció drásticamente cuando la temperatura se incrementó hasta los 70°C manteniendo solo el 13 y 8 % de su actividad residual.

Los valores de Km y velocidad máxima se determinaron a través de las ecuaciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk. El valor del Km de la pectinasa fue 2,0134 mg/ml, el cual nos muestra el grado de afinidad de la enzima por el sustrato (pectina de manzana), el Km es inversamente proporcional al grado de afinidad con respecto al sustrato (Bisswanger, 2002).

La velocidad máxima alcanzada fue de 0,00759 mg/ml.min equivalente a 39  $\mu\text{mol/ml.min}$ , este valor es superior a lo reportado por Demir et al. (2011) quienes obtuvieron una velocidad máxima de 355,3  $\mu\text{mol/L.min}$  trabajando con una pectin liasa producida por *Geobacillus stearothermophilus* Ah22, así mismo, Nadaroğlu et al. (2010) reportaron un valor de 132,6  $\mu\text{mol/L.min}$ , esto nos indica que nuestra enzima presentó una mayor velocidad de conversión de sustrato con respecto a los demás.

## CONCLUSIONES

1. Se purificó la enzima pectinasa producida por *Geobacillus sp* P4 mediante las etapas de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico, alcanzando un buen rendimiento en la etapa cromatografía de filtración en gel purificándose 1,26 veces con un rendimiento del 31,36 %.
2. En la determinación de las características fisicoquímicas de la pectinasa se encontraron rangos de temperatura óptimos entre 50 - 60°C y pH 6 – 7,5. La enzima posee una mejor termoestabilidad a 60°C, manteniendo una actividad residual superior al 40 % a 120 min. Los valores de  $k_m$  y velocidad máxima se determinaron a través de las ecuaciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk, siendo 2,0134 mg/ml y 0,00759 mg/ml.min (39  $\mu$ mol/ml.min) respectivamente.

## RECOMENDACIONES

1. En el proceso de purificación mediante filtración en gel se recomendaría el uso de columnas empaquetadas para disminuir tiempo de empaquetamiento y asegurar un adecuado flujo de las proteínas.
2. Se recomienda realizar el proceso de purificación mediante otras técnicas como el HPLC o FPLC para caracterizar la composición de aminoácidos de la proteína y para complementar la caracterización electroforética se sugiere realizar ensayos como Zimograma.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akinyemi, B. T., Buraimoh, O. M., Ogunrinde, O. O. y Amund, O. O. (2017). *Pectinase Production by Bacillus megaterium , Bacillus bataviensis , and Paenibacillus sp . Isolated from Decomposing Wood Residues in the Lagos Lagoon*. 7(3), 204–207. <https://doi.org/10.11594/jtls.07.03.03>
- Akita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Ito, S. y Yamane, T. (2000). Crystallization and preliminary X-ray analysis of high-alkaline pectate lyase. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 56(6), 749–750. <https://doi.org/10.1107/S0907444900003334>
- Alkorta, I., Garbizu, C., Llama, M. y Serra, J. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00046-0)
- Barros, F. F. C., Simiqueli, A. P. R., de Andrade, C. J. y Pastore, G. M. (2013). Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis* . *Biotechnology Research International*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/103960>
- Bisswanger, H. (2002). *Enzyme kinetics Principles and Methods*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bukhari, D. y Rehman, A. (2015). Purification and Characterization of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* Isolated from Local Environment. *Pakistan J. Zoo*, 47(4), 905–911.

- Chaiyasut, C., Jantavong, S., Kruatama, C. y Peerajan, S. (2013). Factors affecting methanol content of fermented plant beverage containing *Morinda citrifolia*. *African Journal of Biotechnology*, 12(27), 4356–4363. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1377>
- Chaplin, M. F. y Bucke, C. (1990). *Enzyme Technology* - Google Libros. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Ymc4AAAIAAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=Chaplin,+M.+F.,+%26+Bucke,+C.+\(1990\).+Sources+of+enzyme+s+Enzyme+Technology.+UK:+Cambridge+University+Press.&ots=0ajCUw4o-H&sig=gC92Vw2JE6Kk18Cv-Z5iAejQttc#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Ymc4AAAIAAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=Chaplin,+M.+F.,+%26+Bucke,+C.+(1990).+Sources+of+enzyme+s+Enzyme+Technology.+UK:+Cambridge+University+Press.&ots=0ajCUw4o-H&sig=gC92Vw2JE6Kk18Cv-Z5iAejQttc#v=onepage&q&f=false)
- Chesson, A. (1980). Maceration in Relation to the Post-harvest Handling and Processing of Plant Material. *Journal of Applied Bacteriology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1980.tb05204.x>
- Cho, S. W., Lee, S. y Shin, W. (2001). The X-ray Structure of *Aspergillus aculeatus* Polygalacturonase and a Modeled Structure of the Polygalacturonase-Octagalacturonate Complex. *Journal of Molecular Biology*, 311(4), 863–878. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4919>
- Copeland, R. A. (2000). *ENZYMES: A Practical Introduction to Structure , Mechanism , and Data Analysis* (Second). New York: Wiley-VCH.
- Das, A., Bhattacharya, S., Reddy, N.V. y Sundara, R. (2013). *Improved Production and Purification of Pectinase from Streptomyces sp . GHBA10 isolated from Valapattanam mangrove habitat , Kerala , India*. 2(3), 16–22.
- Demir, N., Nadaroglu, H., Tasgin, E., Adiguzel, A. y Gulluce, M. (2011). Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and its application in fruit juice production. *Journal of Applied Bacteriology*, 939–946. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0217-6>

- Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., ... Tsernoglou, D. (2005). Structural Basis for the Interaction between Pectin Methyltransferase and a Specific Inhibitor Protein. *The Plant Cell*, 17(March), 849–858. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028886.elongation>
- Esquivel, J. C. C. y Voget, C. E. (2004). Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, 110(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.010>
- Fromm, H. J. (1975). *The Effect of Temperature and pH on Enzyme Activity. Initial Rate Enzyme Kinetics*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-80966-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-80966-8_8)
- Gerhartz, W. (1990). Enzymes in industry: production and applications. *Enzymes in Industry: Production and Applications*.
- Hoondal, G., Tiwari, R., Tewari, R., Dahiya, N. y Beg, Q. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4–5), 409–418. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1061-1>
- Horikoshi, K. (1990). ENZYMES OF ALKALOPHILES. *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 275–294. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0765-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0765-2_8)
- Hussain Hadri, S., Javaid Asad, M., Zeeshan Hyder, M., Muhammad Saqlan Naqvi, S., Mukhtar, T., Zafar, M., ... David Wu, J. H. (2019). Characterization of a Novel Thermophilic Endopolygalacturonase Produced by *Bacillus licheniformis* IEB-8. *BioResources*, 14(2), 2873–2884. Retrieved from <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>
- Illanes, A. (2008). Enzyme biocatalysis: Principles and applications. In *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- Janson, J. (2011). Protein purification. Principles, High Resolution, Methods and Applications. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (third, Vol.

- 54). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jayani, R. S., Saxena, S. y Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931–2944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>
- Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K. y Pickersgill, R. (2001). Three-dimensional Structure of *Erwinia chrysanthemi* Pectin Methylesterase Reveals a Novel Esterase Active Site. *Journal of Molecular Biology*, 305, 951–960. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4324>
- Jensen, M. H., Otten, H., Christensen, U., Borchert, T. V, Christensen, L. L. H., Larsen, S. y Leggio, L. Lo. (2010). Structural and Biochemical Studies Elucidate the Mechanism of Rhamnogalacturonan Lyase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Molecular Biology*, 404(1), 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.013>
- Johansson, K., El-ahmad, M., Friemann, R., Jornvall, H., Markovic, O. y Eklund, H. (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters*, 514(2–3), 243–249. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02372-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02372-4)
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S. y Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)
- Kavuthodi, B. y Sebastian, D. (2018). Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 11(1), 18–30. <https://doi.org/10.21786/bbrc/11.1/4>
- Kita, N., Boyd, C. M., Garrett, M. R., Jurnak, F. y Keen, N. T. (1996). Differential Effect of Site-directed Mutations in *pelC* on Pectate Lyase Activity , Plant Tissue Maceration , and Elicitor Activity \*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(43), 26529–26535. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.43.26529>

- Kobayashi, T., Higaki, N., Yajima, N., Suzumatsu, A., Hagihara, H., Kawai, S. y Ito, S. (2001). Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(4), 842–847. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.842>
- Kubra, K. T., Ali, S., Walait, M. y Sundus, H. (2018). Potential Applications of Pectinases in Food, Agricultural and Environmental Sectors. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences.*, 6(2), 23–34. Retrieved from <https://www.jpCBS.info>
- Lozano, A. y López, E. (2001). Endopoligalacturonasa y pectinesterasa de *Aspergillus Niger* Endopolygalacturonase and pectinesterase from *Aspergillus Niger*. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 2, 85–91.
- Mahmoud, Amr; Elgamal, Mamdouh; Abdel, Shakour; Salem, S. S. (2014). PRODUCTION OF PECTINASES FROM THERMOFILIC ANOXYBACILLUS SPECIES ISOLATED FROM EL-WAHAT DESERT SOIL , EGYPT . *Egypt. J. Biotechnol*, 47(July). Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/312176416\\_Production\\_of\\_Pectinases\\_from\\_thermophilic\\_Anoxybacillus\\_species\\_isolated\\_from\\_El-Wahat\\_desert\\_soil\\_Egypt](https://www.researchgate.net/publication/312176416_Production_of_Pectinases_from_thermophilic_Anoxybacillus_species_isolated_from_El-Wahat_desert_soil_Egypt)
- Martin, N., De Souza, S., Da Silva, R. y Gomes, E. (2004). Pectinase Production by Fungal Strains in Solid-State Fermentation Using Agro-Industrial Bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(September), 813–819. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000500018>
- Matsumoto, H., Jitareerat, P., Baba, Y. y Tsuyumu, S. (2003). *Comparative Study of Regulatory Mechanisms for Pectinase Production by Erwinia carotovora subsp . carotovora and Erwinia chrysanthemi*. 16(3), 226–237.

- Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Caccamo, D. y Stackebrandt, E. (2001). A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4), 572–587. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00054>
- Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., ... Jenkins, J. (1997). Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure* 5:677-689.
- Mercimek Takcı, H. A. y Turkmen, F. U. (2016). Extracellular Pectinase Production and Purification from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain. *International Journal of Food Properties*, 19(11), 2443–2450. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1123270>
- Mukesh, K.J., Saranya, G.M., Suresh, K., Andal, P.D., Rajakumar, R., Kalaichelvan, P. (2012). Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2(3), 369–375. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/264851241\\_Production\\_and\\_Optimization\\_of\\_Pectinase\\_from\\_Bacillus\\_sp\\_MFW7\\_using\\_Cassava\\_Waste](https://www.researchgate.net/publication/264851241_Production_and_Optimization_of_Pectinase_from_Bacillus_sp_MFW7_using_Cassava_Waste)
- Nadaroğlu, H., Taşkin, E., Adigüzel, A., Güllüce, M. y Demir, N. (2010). Production of a novel pectin lyase from *Bacillus pumilus* (P9), Purification and characterisation and fruit juice application. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2), 5167–5176.
- Oumer, O. J. y Abate, D. (2017). Characterization of Pectinase from *Bacillus subtilis* Strain Btk 27 and Its Potential Application in Removal of Mucilage from Coffee Beans. *Enzyme Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7686904>
- Pickersgill, R., Jenkins, J., Harris, G., Nasser, W. y Robert-Baudouy, J. (1994). The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium.

- Nature Structural & Molecular Biology*, 1(10), 717–723.  
<https://doi.org/10.1038/nsb1094-717>
- Rahman, T. J., Marchant, R. y Banat, I. M. (2004). Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments. *Biochemical Society Transactions*, 32(2), 209–213.  
<https://doi.org/10.1042/BST0320209>
- Reid, I. y Ricard, M. (2000). Pectinase in papermaking: Solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 115–123.  
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00131-3)
- Rodrigues, S., De Almeida, F. A. C. y Da Silva, F. L. H. (2010). Pectinases production by solid state fermentation with cashew apple bagasse: Water activity and influence of nitrogen source. *Chemical Engineering Transactions*, 20(January), 121–126. <https://doi.org/10.3303/CET1020021>
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. y Vandamme, E. J. (1993). Properties , and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39, 213–294.
- Schallmey, M., Singh, A. y Ward, O. P. (2004). Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Sharma, Netta, Sasankan, A., Singh, A. y Soni, G. (2011). Production of Polygalacturonase and Pectin Methyl Esterase from Agrowaste by using Various Isolates of Aspergillus niger. *Insight Microbiology*, 1(1), 1–7.
- Sharma, Nevadita, Rathore, M. y Sharma, M. (2012). Microbial pectinase: Sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(1), 45–60. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9276-9>

- Sohail, M. y Latif, Z. (2015). Phylogenetic analysis of polygalacturonase-producing *Bacillus* and *Pseudomonas* isolated from plant waste material. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1). <https://doi.org/10.5812/ijm.28594>
- Soriano Lasheras, M. (2004). *Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de \_Paenibacillus sp. BP-23 e YvpA de Bacillus subtilis.* Universitat de Barcelona.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Thomas, L. M., Chuong, N., Oliver, R. L. y Yoder, M. D. (2002). research papers Structure of pectate lyase A: comparison to other isoforms. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58(6), 1008–1015. <https://doi.org/10.1107/S0907444902005851>
- Wilson, Keith; Walker, J. (2010). Principles and Techniques of Biochemistry and molecular Biology, 7th edition. In *Crystallography Reviews* (seven edit, Vol. 25). <https://doi.org/10.1080/0889311x.2019.1587415>
- Yoder, M. D., Keen, N. T. y Journak, F. (1993). New Domain Motif: The Structure of Pectate Lyase C, a Secreted Plant Virulence Factor. *Science*, 260 (5113), 1503–1507.
- Yoshitake, S., Numata, T., Katsuragi, T., Hours, R. A. y Sakai, T. (1994). Purification and Characterization of a Pectin-Releasing Enzyme Produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*, 77(4), 370–375.
- Yu, P. y Xu, C. (2018). Production optimization, purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from *Bacillus* sp. ZJ1407. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 972–980. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.012>

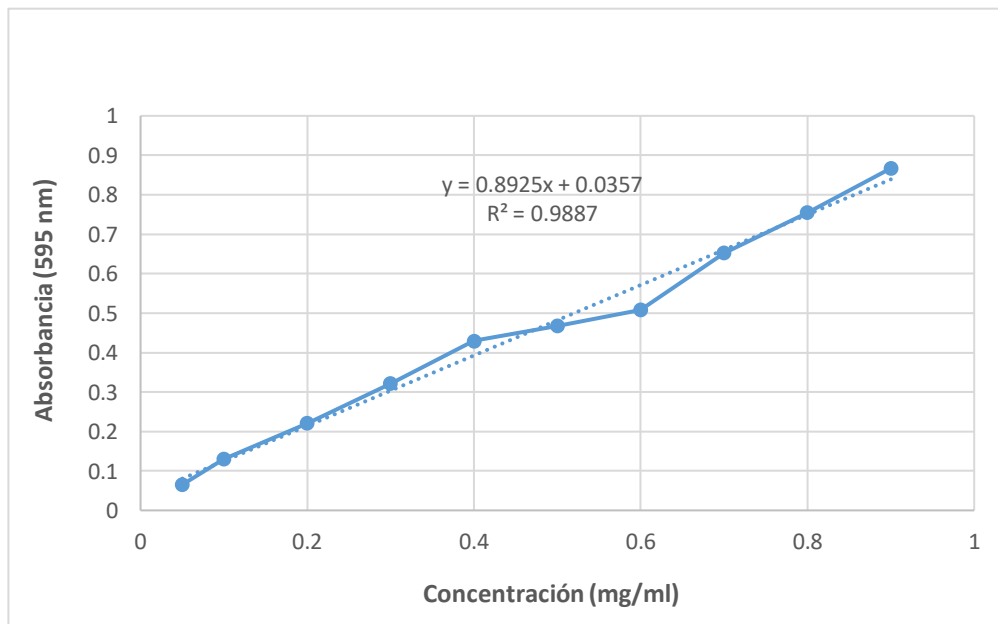
## ANEXOS

**Anexo 1.** Tabla de calibración de Bradford

Concentración (mg/ml)	I	II	Promedio ABS
0,05	0,070	0,060	0,0650
0,10	0,143	0,118	0,1305
0,20	0,201	0,242	0,2215
0,30	0,316	0,328	0,3220
0,40	0,389	0,470	0,4295
0,50	0,462	0,473	0,4675
0,60	0,510	0,506	0,5080
0,70	0,632	0,673	0,6525
0,80	0,735	0,775	0,7550
0,90	0,872	0,862	0,8670

**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 2.** Curva de calibración de Bradford



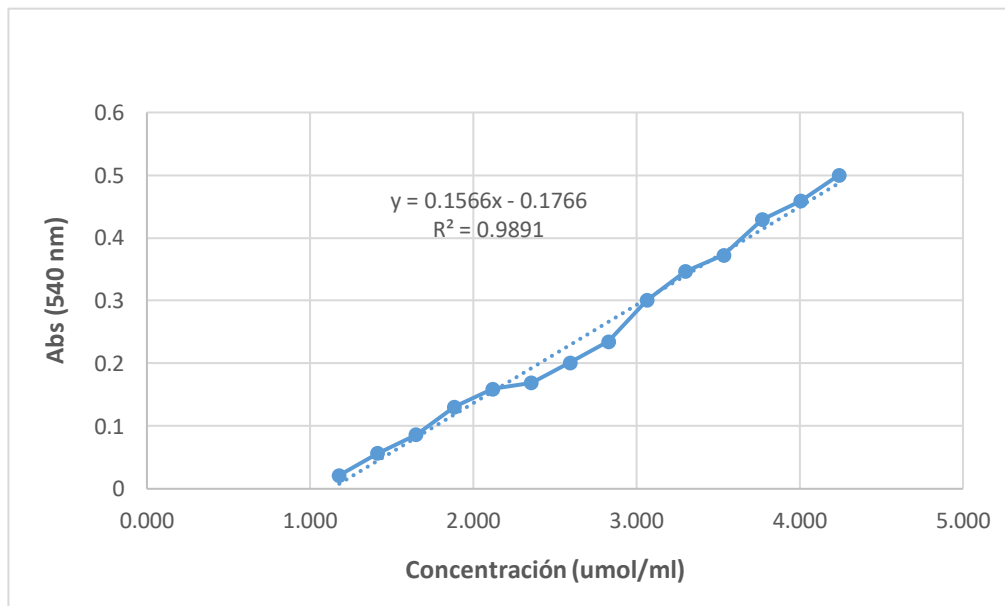
**Fuente:** Elaboración propia

### Anexo 3. Tabla de calibración del DNS

Concentración ( $\mu\text{mol/ml}$ )	Absorbancia		Promedio ( $\text{mg/ml}$ )
	I	II	
1,178	0,019	0,024	0,0215
1,414	0,055	0,059	0,0570
1,650	0,088	0,085	0,0865
1,885	0,131	0,131	0,1310
2,121	0,159	0,160	0,1595
2,357	0,169	0,169	0,1690
2,593	0,201	0,201	0,2010
2,828	0,235	0,235	0,2350
3,064	0,303	0,298	0,3005
3,300	0,352	0,341	0,3465
3,535	0,370	0,375	0,3725
3,771	0,426	0,433	0,4295
4,007	0,459	0,459	0,4590
4,242	0,500	0,501	0,5005

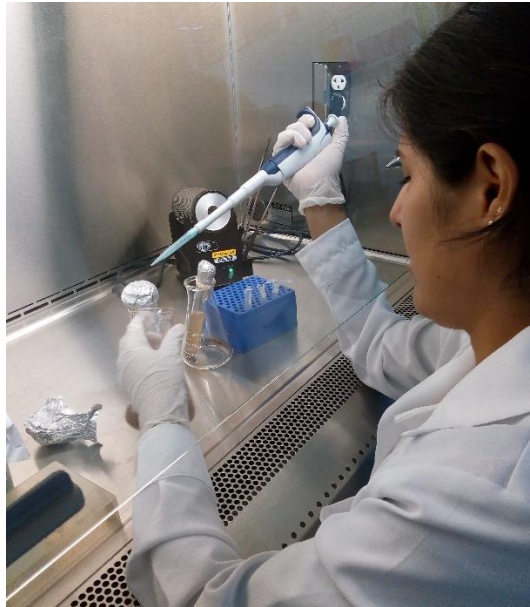
Fuente: Elaboración propia

### Anexo 4. Curva de calibración del DNS



Fuente: Elaboración propia

**Anexo 5.** Fotografía de inoculación de medio fermentativo



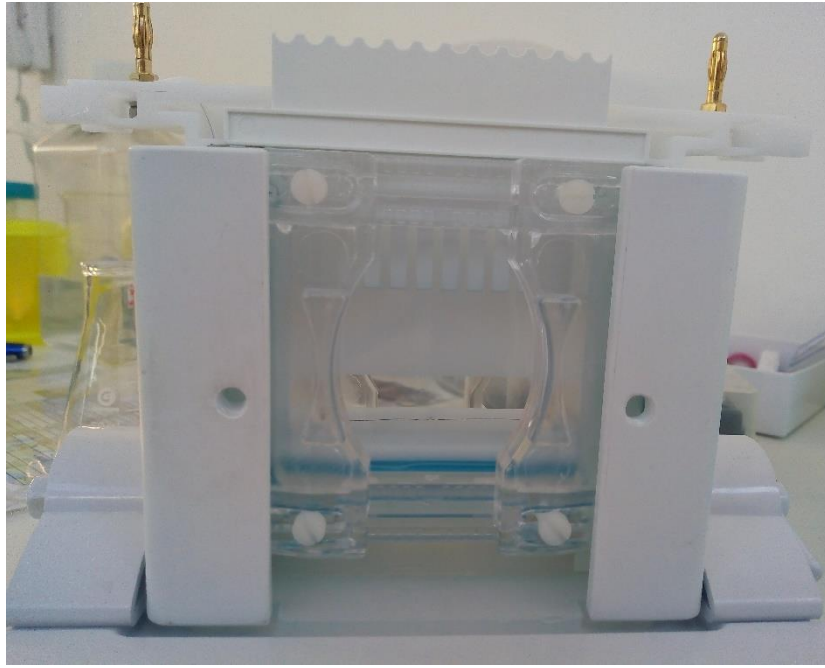
**Fuente:** Recolección propia

**Anexo 6.** Fotografía de columna de cromatografía



**Fuente:** Recolección propia

## Anexo 7. Cámara de electroforesis vertical



**Fuente:** Recolección propia



---

Bach. Tany Kristen Hinojosa Calderón  
Tesisista



---

Mgr. Roberto Castellanos Cabrera  
Asesor