



## DESARROLLO DE UN NUEVO METODO DE DETECCION ENZIMATICA RAMNOGALACTURONASA

Gerardo Espinosa-Velázquez<sup>1</sup>, Katiushka Arevalo-Niño<sup>2</sup>, Claudio Voget<sup>3</sup> y Juan Carlos Contreras-Esquivel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila Saltillo 25280, Coahuila, México, <sup>2</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. <sup>3</sup>CINDEFI-Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. E-mail: gerardoespinosa@uadec.edu.mx

*Palabras clave:* ramnogalacturonano I, zimograma, Pectinex Ultra

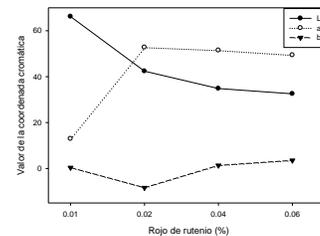
**Introducción.** El *ramnogalacturonano I* es un polisacárido péctico de estructura para la matriz de pectina en la pared celular vegetal. Su esqueleto alterna  $\alpha$ -D(1 $\rightarrow$ 4)-ácido galacturónico (GalA) y  $\alpha$ -D(1 $\rightarrow$ 2)-ramnosa (Rha). Un preparado enzimático pectolítico capaz de degradar el ramnogalacturonano es Pectinex Ultra (Novo Nordisk) el cual es producido por *Aspergillus aculeatus*. El ensayo de difusión en placa (zimograma) de agarosa permite detectar actividad enzimática en polisacáridos de interés. El colorímetro cuantifica el espacio de color L\*a\*b\* (denominado también CIELAB, siendo CIE la Commission Internationale de L'éclairage) por medio de coordenadas cromáticas para comunicar y expresar el color objetivamente.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un nuevo método de zimografía en placa de agarosa para detectar actividad enzimática ramnogalacturonasa por tinción con rojo de rutenio.

**Metodología.** Preparación de placas de agarosa (Merk®, Alemania) al 1% (p/v) con ramnogalacturonano de soja (Megazyme®, Irlanda) al 0.05% (p/v) disolviendo con buffer de ácido acético-acetato de sodio 50 Mm (pH 5.00). Una vez solidificadas las placas se agregan 5  $\mu$ l del preparado enzimático Pectinex Ultra (Novozymes®, Dinamarca). Las muestras se incubaron en cámara húmeda durante 8 horas a 37°C. Posteriormente se realizan lavados con agua destilada (5x) a 20°C y se tiñe la superficie con rojo de rutenio (Sigma-Aldrich®) al 0.04% (p/v) durante 25 min, eliminando el rojo y lavando la superficie con agua destilada (5x) a 20°C para eliminar el exceso de colorante. Para valorar con el colorímetro (Konica Minolta® Chroma Meter CR-400, Japón) se prepararon placas de agarosa con el procedimiento antes mencionado y con tinción con rojo de rutenio al 0.01, 0.02, 0.04 y 0.06% (p/v); exceptuando agregar el extracto enzimático e incubar en cámara húmeda. A las muestras teñidas con él colorante se determinaron las coordenadas cromáticas L\*a\*b\*. Siendo: L\* luminosidad, a\* coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde), b\* coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul).

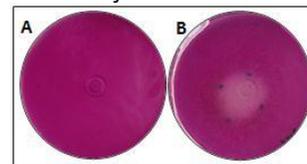
**Resultados y discusión.** En este estudio se utiliza el colorante rojo de rutenio ya que posee carga positiva y puede fijarse a la superficie de la placa al interactuar con la carga positiva del ramnogalacturonano no degradado. Para los diferentes tratamientos con el rojo

de rutenio se obtuvieron las coordenadas cromáticas correspondientes de color L\*a\*b\* (Figura 1).



**Fig. 1.** Coordenadas cromáticas de las placas de agarosa teñidas con rojo de rutenio en diferentes concentraciones.

Una vez establecidas las condiciones de rojo de rutenio se procedió a teñir las placas de agarosa con el ramnogalacturonano inmovilizado agregando el preparado enzimático Pectinex Ultra. En la Figura 2 se presentan las placas de ramnogalacturonano/agarosa teñidas con rojo de rutenio en presencia y ausencia de extracto enzimático. En la placa B observamos un halo de inhibición que indica la degradación enzimática del ramnogalacturonano de soja.



**Fig. 2.** Detección de actividad enzimática ramnogalacturonasa con Pectinex Ultra®; A: placa control (-), B: placa con enzima halo (+).

**Conclusión.** El uso de ramnogalacturonano de soja inmovilizado en placas de agar y posteriormente teñidos con rojo de rutenio resultó un método eficaz para la detección de actividad ramnogalacturonasa.

**Agradecimiento.** Agradeciendo a la M.C. Xóchitl Ruelas de la UAAAN por facilitar el colorímetro CR-400, y al Dr. Juan Carlos por su paciencia y por permitirme colaborar dentro del Laboratorio de Glicobiología.

### Bibliografía.

- Jarvis, M. C. (1984). "Structure and properties of pectin gels in plant cell walls." *Plant, Cell & Environment* 7(3): 153-164.
- Mutter, M. (1997). New rhamnogalacturonan degrading enzymes from *Aspergillus aculeatus*. Doctoral thesis. Netherlands, Agricultural University of Wageningen.
- Schols, H. A. and A. G. J. Voragen (1996). Complex Pectins: Structure elucidation using enzymes. *Progress in Biotechnology*. J. Visser and A. G. J. Voragen, Elsevier. Volume 14: 3-19.
- Waldron, K. W. and C. B. Faulds (2007). 1.05 - Cell Wall Polysaccharides: Composition and Structure. *Comprehensive Glycoscience*. H. Kamerling. Oxford, Elsevier: 181-201.