

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA-MOLECULAR DE LA β -GALACTOSIDASA PURIFICADA DE FRUTOS DE PAPAYA MARADOL

Lino-López G.J.¹, Barba de la Rosa A.P.², Osuna-Castro J.A.^{1,3}

¹ Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Autopista Colima-Manzanillo km 40, Tecmán, Col., México C.P. 28100 Tel.: 313-322-94-05 ext. 52251, osuna_juan@hotmail.com. ² División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT-SLP).

³ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, Carretera Colima-Coquimatlán km 9, Coquimatlán, Col., México.

El fruto de papaya es considerado un excelente modelo funcional para investigar el ablandamiento, ya que exhibe cambios en la textura fáciles y rápidos de detectar, y medir de forma objetiva. El ablandamiento poscosecha de la papaya se caracteriza por un incremento en la despolimerización y solubilización de los polisacáridos de la pared celular como pectina y hemicelulosa ricos en galactosa, manifestándose una pérdida de la firmeza del fruto. La β -galactosidasa (β -gal) es una enzima hidrolasa clave en el ablandamiento de la papaya que hidroliza los residuos terminales no reductores de β -D-galactosa de los citados polisacáridos, provocando un aumento de galactosa libre. La aplicación de un inhibidor de la síntesis del etileno (1-metilciclopropeno o 1-MCP) en papaya maradol provocó una disminución significativa en la actividad enzimática de la β -gal, en contraste con la firmeza de los frutos que se mantuvo constante durante el experimento. El objetivo de la presente investigación consistió en la caracterización bioquímica-molecular de la β -galactosidasa purificada de frutos de papaya variedad maradol. La extracción de la hidrolasa de papaya madura se realizó empleando buffer de citrato de sodio pH 4.6, seguida de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y diálisis. La purificación de la β -gal se efectuó por medio de cromatografía usando la resina CM-Sepharose y precipitación isoeléctrica. A la hidrolasa pura se le determinó actividad (sustrato *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) e inhibición (ZnCl_2) enzimática, punto isoeléctrico (pI), peso molecular en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) y nativos (PAGE), y detección inmunoquímica por Western blot utilizando anticuerpos policlonales contra β -gal de *Escherichia coli*.

Se obtuvo a la β -gal pura a homogeneidad electroforética constituida de dos bandas con pesos moleculares de 28 y 31 kDa, y pls de 5.8, sugiriendo que la enzima posee estructura cuaternaria, ensamblándose molecularmente como heterotetrámero. Los anticuerpos bacterianos dieron reacción cruzada con ambas subunidades de la β -gal, misma que presentó una alta actividad específica y una inhibición del 53% con ZnCl_2 .

Este proyecto fue financiado por FONDO MIXTO-CONACYT-COLIMA y el FONDO RAMÓN ALVAREZ-BUYLLA DE ALDANA de la Universidad de Colima.