

302927

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO 2

ESCUELA: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO 23  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**PURIFICACION  
Y ESTUDIO CINETICO  
DE DOS FORMAS MOLECULARES  
DE KARATASINA  
(*Bromelia Karatas*)**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN  
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

LARA OSORIO MARIA MAGDALENA

MEXICO, D. F., 1991



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>OBJETIVO</b>	6
<b>CARACTERISTICAS DE LA PLANTA</b>	7
<b>GENERALIDADES</b>	
- Historia	8
- Características estructurales de las proteínas	9
- Clasificación general de las enzimas	12
- Mecanismo de catálisis de las enzimas proteolíticas	15
- Métodos de purificación de las proteínas	17
- Especificidad enzimática y sitios activos	20
- Cinética enzimática	22
<b>DIAGRAMA EXPERIMENTAL</b>	
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
- Recolección de los frutos, extracción del jugo, purificación de la karatasina.	26
- Determinación de la actividad proteolítica	27
- Metodo de purificación de las formas moleculares de la karatasina	28

- Criterios de pureza	29
- Análisis de la concentración efectiva de enzima	30
- Determinaciones cinéticas sobre sustratos sintéticos	35
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>53</b>

## INTRODUCCION

Las proteasas fueron las primeras enzimas que se purificaron y estudiaron detalladamente con respecto a su estructura y propiedades catalíticas. La razón de esto fue que las enzimas - proteolíticas de plantas (como papaya, piña) y de fuentes microbianas, (como bacterias) podían ser purificadas en cantidades relativamente abundantes. Hasta mediados de los 60's, los grupos de investigación que demostraron interés en la hidrólisis peptídica por enzimas, enfocaron sus estudios principalmente a aspectos mecanísticos, estructurales, etc, los cuales fueron estudiados utilizando técnicas tales como espectroscopia, cinética, cristalografía de rayos x, etc. ( 1 )

Las proteasas vegetales tienen usos médicos y tecnológicos. Comercialmente el producto más importante es el de la papaína, que se utiliza como ablandador de carnes. Otros usos tecnológicos son en la preparación de cuero (tanería) y en la industria cervecera. Las enzimas proteolíticas están presentes en medicamentos que ayudan en ciertos tipos de desórdenes digestivos y en el tratamiento de algunas heridas en la piel.

La mayoría de las proteasas vegetales son capaces de digerir - gusanos parásitos vivos, tales como Ascaris lumbricoides y Trichuris trichura, pero no se les ha encontrado empleo como vermícidas. ( 2 )

Las proteasas pueden clasificarse en serínicas, las cuales tienen un residuo de serina en el sitio activo el que es indispensable para su acción; aspárticas, estas enzimas tienen un residuo de - aspártico en el sitio activo, y también se les llaman proteasas

ácidas; las metalo-proteasas que tienen un metal en el sitio activo (zinc), algunas de estas enzimas conservan su actividad cuando el zinc es reemplazado por cobalto. Además algunas moléculas de enzima pueden tener un ión calcio esencial para la actividad; y finalmente las cisteínicas que son las que se estudian en este trabajo, las cuales para su actividad dependen del grupo tiol de un residuo de cisteína. Las proteasas cisteínicas se han encontrado en bacterias, microorganismos eucariontes, en animales y en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, pero en forma muy abundante, sólo en muy escasos número de ellas.

Debido a la sensibilidad que tienen estas enzima cisteínicas, - (papaína, ficina y bromelaína) a la inactivación por reactivos bloqueantes del grupo tiol y a la recuperación de su actividad por reactivos que regeneran dicho grupo, Harthey las clasificó como "tiol-proteinasas" ( 1 )

Las tiol proteinasas secretadas por ciertas bacterias, probablemente actúan como enzimas digestivas rompiendo a las proteínas en péptidos y aminoácidos, que pueden ser asimilados por las bacterias. ( 3 )

La proteasa cisteínica más estudiada es la papaína, aislada del látex de Carica papaya. Otras enzimas aisladas de plantas superiores se han agrupado junto con la papaína, en una superfamilia, debido a la semejanza que tienen en cuanto a secuencia de aminoácidos y a la presencia de un grupo tiol indispensable para su acción. ( 4 )

De varias especies del género *Bromelia* se han aislado enzimas proteolíticas de tipo cisteínicas.

La familia Bromeliaceae se encuentra distribuida en varias regiones de la República Mexicana (fig 1): Bromelia hemisférica se encuentra en parte de los estados de Guerrero y Morelos. Bromelia karatas se encuentran en parte de los estado de Yucatán, Jalisco, Sinalóa, Michoacán, Oaxaca, Tabasco, entre otros, Bromelia palmeri en el estado de Nayarit, Bromelia pinguin en los estados de Veracruz, San Luis Potosí, Chiapas, entre otros, Bromelia sylvertris, en el estado de Veracruz. ( 5 )

Los frutos de *Bromelia* han sido reconocidos por su actividad proteolítica, y del tallo como del fruto de piña (Ananas comosus) se han aislado tiol proteasas. ( 6 )

Algunos investigadores han realizado diversos estudios sobre las enzimas de la piña, como los realizados por Whitaker ( 7 ) que aisló 5 formas moleculares de la bromelaína de tallo con diferente movilidad electroforética en gel de poliacrilamida.

Posteriormente Lynn ( 8 ) aisló por cromatografía de intercambio iónico, 4 fracciones claramente visibles, a partir de bromelaína de tallo mercuriada. Kézdy y Kaiser, ( 9 ) demostraron por medio de un estudio espectrofotométrico la liberación del p-Nitrofenol por una enzima aislada del tallo de bromelaína, obteniendo el 95% de enzima activa.

Por otra parte Silverstein ( 10 ) realizó estudios cinéticos de enzimas aisladas del tallo de piña de Bromelaína denominándolas A y B, encontrando que estas enzimas son similares en sus propiedades físicas y que tienen una alta afinidad por el

sustrato de CBZ-Lisina p-nitrofenil éster que por el de CBZ-Glicina p-Nitrofenil éster.

Por su parte Garduño, et al ( 11 ) realizaron estudios sobre - diferentes especies de bromelia detectando por enfoque isoeléctrico varias formas moleculares. Los puntos isoeléctricos de dichos componentes estaban comprendidos dentro de valores de pH de 3 a 10 y los cuales varían en número; 7 en la palmerina de Bromelia palmeri, 11 en la silvestrisina de Bromelia sylvertris, 9 en la hemisfericina de Bromelia hemisférica, y 8 en la karatasina de Bromelia karatas, todas las formas activas. Las actividades específicas sobre caseína no es igual para las diversas formas moleculares. Así mismo Ochoa, et al ( 12 ) aislaron proteasas cisteínicas a partir del jugo de Bromelia hemisférica, obteniendo 5 formas moleculares detectándolas por electroforésis en geles de poliacrilamida. Los frutos maduros de Bromelia pinguin parecen ser una de las fuentes más ricas de proteasas que existen.



DISTRIBUCION DE BROMELIACEAS

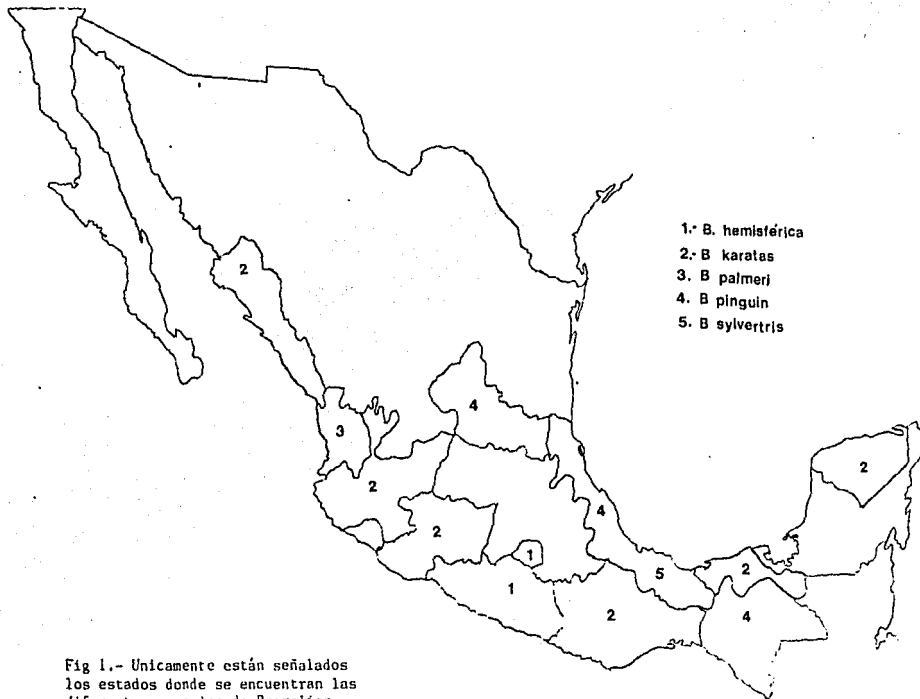


Fig 1.- Unicamente están señalados los estados donde se encuentran las diferentes especies de Bromelias.

### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo un estudio bioquímico y cinético de las formas moleculares más abundantes de Karatasina, la cual es una enzima proteolítica que se obtiene de los frutos de Bromelia Karatas. Esto se hará con el fin de tratar de determinar la especificidad de las diferentes formas moleculares, y ver si es igual o diferente para cada una de ellas, y poder comparar estos resultados con los reportados por otras tiol-proteinasas de origen vegetal.

## CARACTERISTICAS DE LA PLANTA

### Bromelia Karatas

Se le conoce como guapilla, piñuela o cardo. Es una planta sin tallo, hojas en roseta de hasta 2 cm de largo y 5 cm de ancho, con espinas ganchudas, inflorescencia sésil; fruto fusiforme de 5-8 cm, ácido, rojo violáceo. Crece principalmente en la zona del Istmo y península de Yucatán. ( 5 )

### Clasificación de la Planta

Reino	Vegetal
División	Antofitas
Clase	Monocotiledóneas
Orden	Bromeliales
Familia	Bromeliáceae
Género	<u>Bromelia</u>
Especie	<u>Karatas</u>

## GENERALIDADES

## HISTORIA

Una gran parte de la historia de la bioquímica es la historia de la investigación de las enzimas, las cuales son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. La propiedad fundamental de una enzima, como cualquier catalizador, es aumentar la velocidad de una reacción. El nombre enzima, no se empleó hasta 1877 propuesto por Rahne, pero mucho antes ya se sospechaba que ciertos catalizadores biológicos intervenían en la fermentación del azúcar para formar alcoholes. El fenómeno catálisis fue descubierto por Kirchoff en 1811-1814 y el vocablo catálisis (aflojar) fue propuesto por Berzelius en 1838, ( 13 ) el cual incluía un ejemplo de lo que ahora se conoce como enzima, la diastasa de la malta, y señalaba que la hidrólisis del almidón se catalizaba por la diastasa con más eficacia que por el ácido sulfúrico. En 1860 Pasteur postuló que tales catalizadores estaban estrechamente relacionados con la estructura y la vida de las células y no podrían ser separados de ellas sin perder su actividad. Pero en 1897 Büchner obtuvo un avance notable en la historia de la investigación enzimática al extraer de las células de levadura las enzimas que catalizan la fermentación alcohólica, con lo cual demostró que éstas pueden actuar independientemente de la estructura celular. ( 14 )

En 1926, J. B. Sumner cristalizó a la ureasa, aislada de extractos de la alubia Canavalia ensyiformis y demostró que los cristales estaban constituidos por proteínas, llegando a la

conclusión contraria a la que prevalecía por aquel entonces, de que las enzimas eran proteínas. Sus puntos de vista no fueron aceptados inmediatamente, sin embargo, en el periodo comprendido entre 1930 y 1936, Northrop aisló a la pepsina, a la tripsina y a la quimotripsina en forma cristalina, pudiendo demostrar que las enzimas eran proteínas. ( 15 ).

En el medio siglo que ha transcurrido desde entonces, el número de enzimas que se han aislado ha aumentado aproximadamente a 2 000. La mayoría ha sido aislada y estudiada como preparaciones acuosas purificadas, varias han sido cristalizadas y alrededor de 100 de estas últimas tienen su estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X. ( 16 )

#### CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS PROTEINAS

Las proteínas se pueden clasificar de diferentes maneras; en cuanto a su composición en 2 clases: 1) proteínas simples.- son aquellas que por hidrólisis producen solamente aminoácidos, sin ningún otro producto principal. 2) Las proteínas conjugadas son aquellas que por hidrólisis producen no solamente aminoácidos, sino también otros componentes orgánicos e inorgánicos. La porción no aminoácida de una proteína conjugada se denomina grupo prostético. ( 14, 15 )

También pueden clasificarse en 2 clases principales, según su conformación:

a) Las proteínas fibrosas se hallan constituidas por cadenas polipeptídicas ordenadas de modo paralelo a lo largo de un eje,

formando fibras o láminas largas. Son materiales físicamente resistentes, insolubles en el agua o en las soluciones salinas diluidas, son elementos básicos estructurales en el tejido conjuntivo de los animales superiores, tales como la colágena de los tendones y la matriz de los huesos.

b) Las proteínas globulares, están constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas. La mayor parte de las proteínas globulares son solubles en los sistemas acuosos. Generalmente desempeñan una función móvil o dinámica en la célula, cabe señalar que todas las enzimas son proteínas globulares, como también son los anticuerpos, algunas hormonas y muchas proteínas que desempeñan una función de transporte tales como la seroalbúmina y la hemoglobina. ( 14, 17 )

Su organización y las fuerzas que contribuyen a mantenerlas se consideran según diferentes niveles de complejidad en:

Nivel primario o Estructura Primaria.- Se refiere a la variedad y número relativo de cada aminoácido, así como a la secuencia de aminoácidos que están presentes a lo largo de la cadena polipeptídica al unirse por medio de sus grupos amino y carboxilo. ( 15, 17 )

Nivel secundario o Estructura Secundaria.- Se refiere a la relación espacial que guarda un aminoácido con respecto con el que sigue y al que le antecede en la cadena polipeptídica. En algunos casos el polipéptido entero o algunas zonas de éste se

mantienen extendidas, mientras que en otros casos se enrollan en forma helicoidal como si formaran un resorte. Esta estructura está determinada por los puentes de hidrógeno que se forma - dentro de la molécula y dan lugar a varios tipos de estructuras: las hélices, cuando se forman entre aminoácidos muy cercanos, las láminas cuando ocurren entre diferentes cadenas o entre aminoácidos muy lejanos de la misma cadena, giros  $\beta$  y estructuras desordenadas. ( 14, 16 )

Tercer nivel o Estructura Terciaria.- Se refiere al plegamiento que sufre la molécula sobre sí misma, obviamente dicta una necesidad de interacciones diferentes como: enlaces covalentes, de los cuales los principales son los que ocurren entre cadenas laterales de cisteína para formar puentes de disulfuro; interacciones electrostáticas entre cadenas laterales que poseen grupos iónicos cargados opuestamente; puentes de hidrógeno, en las regiones helicoidales y entre diferentes segmentos de láminas plegadas de la cadena; interacciones hidrofóbicas entre cadenas apolares, como las fuerzas de Vander Waals, que se presentan debido a que la parte no polar de la molécula se encuentra en el interior, donde los átomos están bastante compactos.

Las interacciones hidrofóbicas son las más importantes, ya que son responsables de la estabilización de la matriz interna de la molécula. ( 14, 15 ).

Cuarto nivel o Estructura Cuaternaria.- Pone de manifiesto como se disponen en el espacio las cadenas individuales polipeptídicas de una proteína que posee más de una cadena. La mayor parte de las grandes proteínas, ya sean fibrosas o globulares, contienen 2 o más cadenas polipeptídicas, entre las cuales no existen enlaces covalentes. ( 16 )

#### CLASIFICACION GENERAL DE LAS ENZIMAS

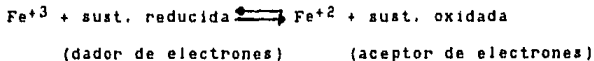
Los métodos más usuales para su clasificación son de acuerdo a su composición y con respecto al tipo de reacción que ellas catalizan.

i.- Las óxido-reductasas.- catalizan reacciones de óxido-reducción de todos los tipos.

a) Deshidrogenasa: catalizan la pérdida de 2 átomos de hidrógeno del sustrato, siendo el aceptor una molécula diferente del oxígeno molecular.

b) Oxidasa: realiza procesos de oxidación en el cual el hidrógeno es transferido directamente a la molécula de oxígeno.

c) Citocromo: El hierro del grupo hem en las citocromos actúa como un donador de electrones ( $Fe^{+2}$ ) o aceptor de electrones ( $Fe^{+3}$ ) en una reacción con otro aceptor de electrones o donador de electrones, respectivamente.





2.- Transferasas.- catalizan reacciones en el cual los grupos son intercambiados entre 2 moléculas.

a) Quinasa: Transferencia del grupo fosfato del nucleósido trifosfato (comúnmente ATP) a la molécula de sustrato generalmente para formar ésteres fosfóricos.

b) Mutasa: catalizan la transferencia de un grupo funcional (fosfato por ejemplo) entre 2 posiciones en la misma molécula.

c) Transaldolasa: catalizan la transferencia de fragmentos de carbonos entre carbohidratos reaccionantes.

d) Transcetolasa: catalizan transferencia de fragmentos de 2 carbonos entre carbohidratos reaccionantes.

e) Transaminasa: catalizan la transferencia del grupo amino ( $-NH_2$ ) desde una sustancia donadora hasta un aceptor que tiene un enlace C=O.

f) Fosforilasa: Formación de ésteres fosfóricos a partir de fosfato inorgánico ( $P_i$ ) y un sustrato que contenga enlaces R-C-OH.

3.- Liasas.- catalizan reacciones que implican la ruptura de C-O, C-C, C-N y otros enlaces fuera de hidrólisis u oxidación.

a) Descarboxilación del sustrato.

4.- Isomerasas.- catalizan reacciones que implican cualquier tipo de isomerización, epimerización e isomerizaciones (cis-trans).

a) Epimerasas: Ruptura y reconstitución, con orientación opuesta de dos enlaces unidos a un carbono asimétrico para dar un estereoisómero.

5.- Ligasas.- catalizan reacciones que implican la formación de un producto que resulta de la condensación de 2 moléculas

diferentes, acopladas a la ruptura de un pirofosfato del ATP.

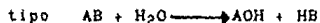
a) Sintetasa: Condensación de 2 moléculas separadas, acopladas a la ruptura de ATP.

b) Tioquinasa: Formación de tioésteres dependientes de ATP.

R-S-C-R' a partir de coenzima A(CoASH) y ácidos carboxílicos.



6.- Las enzimas hidrolíticas, las cuales catalizan reacciones del



Hay 4 clases de enzimas hidrolíticas, como las siguientes:

a) Las carbohidrasas, las cuales catalizan la hidrólisis del enlace glicósido, el cual ocurre en los di y polisacáridos y en otros sustratos.

b) Las esterasas, las cuales hidrolizan ésteres para formar ácidos y alcoholes.

c) Las desaminasas, las cuales catalizan la hidrólisis de aminas, con liberación de amoníaco.

d) Las enzimas proteolíticas, las cuales catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos.



Estas enzimas son las que se estudian en este trabajo y a continuación se explica su mecanismo de catálisis. ( 14, 16, 17 )

## MECANISMOS DE CATALISIS DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS

Los enlaces peptídicos tienen como punto susceptible de ataque, ya sea nucleofílico ( al carbono ) o electrofílico ( al oxígeno ), al grupo carbonilo C=O. Las proteasas rompen la unión por sustitución nucleofílica al carbono carbonilo (fig 2).

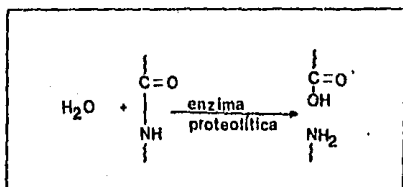


Fig 2.- Hidrólisis de la unión peptídica

El producto de la reacción es el nucleófilo acilado el cual puede ser hidrolizado en un ataque nucleofílico subsecuente por un OH. Sabemos que la vía para realizar hidrólisis de los derivados de ácidos carboxílicos es por ataque nucleofílico sobre el carbono, ésta reacción procede vía un intermediario tetrahédrico con carga negativa en el átomo de oxígeno. Los reactivos nucleofílicos más apropiados son HO, RO, RS y R-COO .

La actividad real de un nucleófilo atacante está sujeta a 2 influencias ambientales: una estérica y la otra eléctrica. El ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico conduce a un intermediario tetrahédrico a través del estado de transición. (fig3). Mientras más baja es la energía libre de Gibbs del estado

de transición, con respecto a la situación original, la reacción será más rápida. La energía del estado de transición es menor cuando una carga positiva ( $\text{NH}_2^+$ ) está opuesta, cerca del átomo de oxígeno, dicha carga positiva incrementa la polarización al enlace de carbonilo promoviendo de ésta manera el ataque nucleofílico sobre el carbono del carbonilo.  $\text{Y}^-$  es el nucleófilo atacante y  $\text{X}^+$  es llamado grupo saliente.

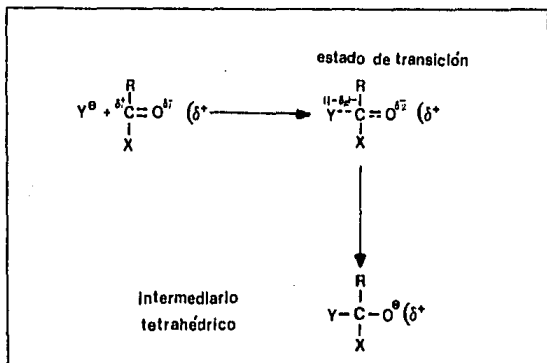


Fig 3.- El estado de transición en el ataque nucleofílico sobre el derivado de un ácido carboxílico.

La papaína es la tiol-proteínasa más estudiada hasta el momento, la cual contiene una cadena polipeptídica con 212 residuos. La Cís 25 es el nucleófilo ( $\text{SH}^-$ ) y la His 159 es el donador de protones. Aunque estos residuos están lejos en la secuencia de aminoácidos, en el espacio están cercanos.

El grupo  $\text{SH}^-$  como tal es un nucleófilo pobre, la forma de desprotonar es  $\text{S}^-$ , siendo uno de los más fuertes. El ataque por  $\text{S}^-$ , en el carbono carbonilo del sustrato conduce al intermediario con 4 enlaces en un arreglo tetrahédrico alrededor del átomo de carbóno.

La carga positiva estabilizadora, mencionada con anterioridad, se debe a la amida  $\text{NH}_2$  de Gln-19 y al NH de la cadena principal de Cis-25, los cuales están a distancia apropiada para formar un puente de hidrógeno con el oxígeno; para fijar el sustrato a la papaina formando una cavidad hidrofóbica que se une a una cadena fenilalanil del sustrato. ( 18 )

El desarrollo de métodos modernos de purificación ha permitido discernir la presencia de varios componentes en preparaciones de proteínas constituidas por especies moleculares.

#### MÉTODOS DE PURIFICACION DE LAS PROTEINAS

##### 1.- Cromatografía por filtración en gel:

Este método consiste en la separación de moléculas en cuanto a su peso molecular. El gel está formado de pequeñas partículas esféricas de poliacrilamida agarosa entrecruzadas. Las moléculas muy grandes nunca entran en las partículas de gel, por lo que se mueven más rápidamente a través de la cama cromatográfica; las moléculas más pequeñas, las cuales pueden entrar en los poros del gel, se mueven más lentamente a través de la columna. Así las moléculas de la muestra son eluidas en orden decreciente de tamaño molecular. ( 19 )

## 2.- Cromatografía de Intercambio Iónico:

El fundamento de la cromatografía de intercambio iónico consiste en la atracción electrostática entre iones de cargas opuestas, de los cuales uno es un electrolito y el otro un polímero de resina sintética. La retención en una columna de intercambio iónico se incrementa en proporción directa a la densidad de carga tanto de la matriz intercambiadora como de la proteína. Una matriz intercambiadora consiste de grupos cargados que se hallan covalentemente unidos a ella, los cuales están asociados a iones móviles que pueden ser reversiblemente intercambiados con otros iones de la misma carga sin alterar la matriz.

Las proteínas debido a su carácter anfotérico varían su carga neta con el pH y pueden existir en forma aniónica o catiónica; si se encuentran cargadas adecuadamente pueden ser unidas a la matriz con diferentes fuerzas dependiendo de la magnitud de su carga neta. (20, 21)

Ajustando el pH y la fuerza iónica del disolvente de elución, los iones mantenidos por atracción electrostática sobre la matriz son motivo de una elución diferencial, obteniéndose la separación buscada.

Esto puede llevarse a cabo en un sistema de mayor resolución como el HPLC.

Una vez purificada la enzima por los métodos antes mencionados, se llevará a cabo un criterio de pureza.

### 3.- Criterios de Pureza:

Se emplearán 2 criterios:

a) Enfoque Isoeléctrico,

b) Electroforesis en poliacrilamida.

a) Enfoque Isoeléctrico: Se define como un método en el cual una mezcla de proteínas se someten a un campo eléctrico sobre un soporte ya sea gelificado o no, en el que se ha establecido con anterioridad un gradiente de pH que contiene anfófilas. Cada proteína migra y queda enfocada, en aquella porción del gradiente de pH cuyo valor es igual al de su punto isoeléctrico, y forma allí una banda estacionaria bien definida.

Las anfófilas son mezclas de péptidos que poseen diferentes puntos isoeléctricos y que al separarse cuando se les aplica una corriente eléctrica, confiere al medio que les rodea un pH igual a su pI debido a su gran capacidad amortiguadora.

b) Electroforesis en geles de Poliacrilamida: La electroforesis consiste en la separación de componentes nativos sobre la base de su carga neta, de acuerdo a las propiedades ácido-base que tienen los grupos R ionizables de las cadenas polipeptídicas.

Cuando el pH de la proteína se encuentra por encima del pI (en el cual su carga neta es nula), la carga negativa aumentará de acuerdo al aumento del pH. Cuando el pH esté por debajo del pI la proteína posee carga positiva y migrará hacia el cátodo. ( 15 ).

## ESPECIFICIDAD ENZIMÁTICA Y SITIOS ACTIVOS

La preferencia que presentan las enzimas hacia ciertos sustratos se llama especificidad enzimática. En algunos casos se observa especificidad absoluta, cuando la enzima actúa sobre un sustrato ( se denomina sustrato al reactante cuya conversión en producto o productos es catalizada por una enzima específica).

( 17 )

La mayoría de las enzimas muestran una especificidad relativa, con un amplio pero limitado número de compuestos relacionados químicamente. Sin embargo, las velocidades de reacción y los valores de  $K_m$  ( que es la concentración del sustrato en la que la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la velocidad máxima ) frecuentemente diferirán debido a la preferencia de una enzima por un determinado sustrato.

La base de la especificidad enzimática es la existencia de un - sitio activo en la molécula de enzima, que consiste en un agrupamiento ordenado, de varios residuos de aminoácidos y de éstos 2 ó 3 pueden participar en la catálisis. ( 22 )

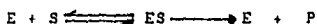
En el sitio de unión se lleva a cabo la unión de la enzima con el sustrato y en el residuo catalítico la formación del producto.

Una de las primeras teorías que dió cuenta de la formación ordenada del subcomplejo sustrato-sitio activo fue la hipótesis de la « llave y cerradura » , de Emil Fischer (1894). Lo esencial de esta teoría es el reconocimiento de que en el sustrato de la enzima, existe una compatibilidad estructural única con el sustrato. ( 14 )



Koshland por su parte propuso una versión modificada de la hipótesis de llave y cerradura a la que llamó « ajuste inducido » para relacionar la interacción del sustrato con la enzima. La enzima cambia de forma en la unión con el sustrato. El sitio activo tiene forma complementaria a la del sustrato solamente cuando el sustrato se une al sitio activo. Un mal sustrato, es decir, uno que se une al sitio activo con poca afinidad, es menos capaz de forzar a la molécula de la enzima a adoptar su forma de máxima actividad debido a que es demasiado pequeño, o bien, posee propiedades estéricas inadecuadas.

La reacción enzima-sustrato se describe mediante la siguiente reacción:



que es el comportamiento de muchos sistemas, sobre todo en la fase inicial de la reacción, antes de que se acumule una cantidad considerable del producto. Este modelo da lugar a una expresión sencilla para la velocidad de reacción si se cumple la condición de que la concentración total de la enzima [E] es mucho menor que la concentración inicial de sustrato [S] lo cual es experimentalmente realizable en la mayoría de los casos. La variable susceptible de ser medida experimentalmente es la concentración de sustrato o la de productos. Si se cumple lo anterior ( S » E ) la concentración de ES será insignificativa en relación a los cambios de [S] o [P]. ( 17 )

## CINETICA ENZIMATICA

La cinética enzimática es una rama de la enzimología que trata con los factores que influye en las reacciones catalizadas por enzimas. Los factores más importantes son : la concentración de la enzima, la concentración de los ligandos, (sustratos, productos, inhibidores y activadores ) pH, fuerza iónica y temperatura.

Cuando todos estos factores son analizados correctamente es posible obtener información acerca de la naturaleza de la reacción catalizada por una enzima. Tales estudios pueden establecer los tipos de interacción enzima-sustrato y los intermediarios enzima-producto que se puedan formar, y en algunos casos proporcionar datos estables para estudios químicos.

La constante cinética (  $K_m$  )puede ser determinada obteniendo la concentración de sustrato, productos y la dirección fisiológica de la reacción. La cinética de una reacción podría indicar el camino en el cual la actividad de la enzima está regulada in vivo. ( 22 )

Los principios generales de la cinética de reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas, pero éstas muestran un rasgo característico que no se observa en las reacciones enzimáticas: la saturación con el sustrato.

La siguiente ecuación describe la Cinética de Michaelis-Menten para determinar las constantes de  $V_{max}$  así como  $K_m$ .

$$v = \frac{V_{max} [ S ]}{[ S ] + K_m} \quad ( 1 )$$

Donde:

$v$  = expresa la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima

$V_{max}$  = Velocidad máxima de reacción.

$[ S ]$  = concentración del sustrato

$K_m$  = es la concentración de sustrato en la que la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la velocidad máxima.

La ecuación de Michaelis-Menten es la ecuación de la velocidad para las reacciones catalizadas por enzimas que solo actúan sobre un sustrato. ( 23 )

Los métodos por los cuales se determinará  $K_m$  y  $V_{max}$  son:

- Lineweaver-Burk
- Augustinsson

#### Método de Lineweaver Burk

Este método utiliza los recíprocos de la ecuación de Michaelis Menten:

$$v = \frac{V_{max}}{\frac{K_m}{S_0} + 1} \quad ( 2 )$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + S_0}{V_{max} S_0} = \frac{K_m}{V_{max} S_0} + \frac{S_0}{V_{max} S_0} \quad (3)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} S_0} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

De esta forma se obtiene una recta en donde la intersección con el eje de las ordenadas nos da el valor de  $1/V_{max}$ . Así el trazo de  $1/v$  contra  $1/[S_0]$ , es lineal, con una pendiente igual  $K_m/V_{max}$ . En la ecuación 4, encontramos que el corte en el eje de las abscisas es negativa dando el recíproco de  $K_m$ . ( 23 )

#### Método de Augustinsson

La ecuación de Lineweaver-Burk podría ser arreglada para producir la ecuación lineal para la gráfica de Augustinsson.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} S_0} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

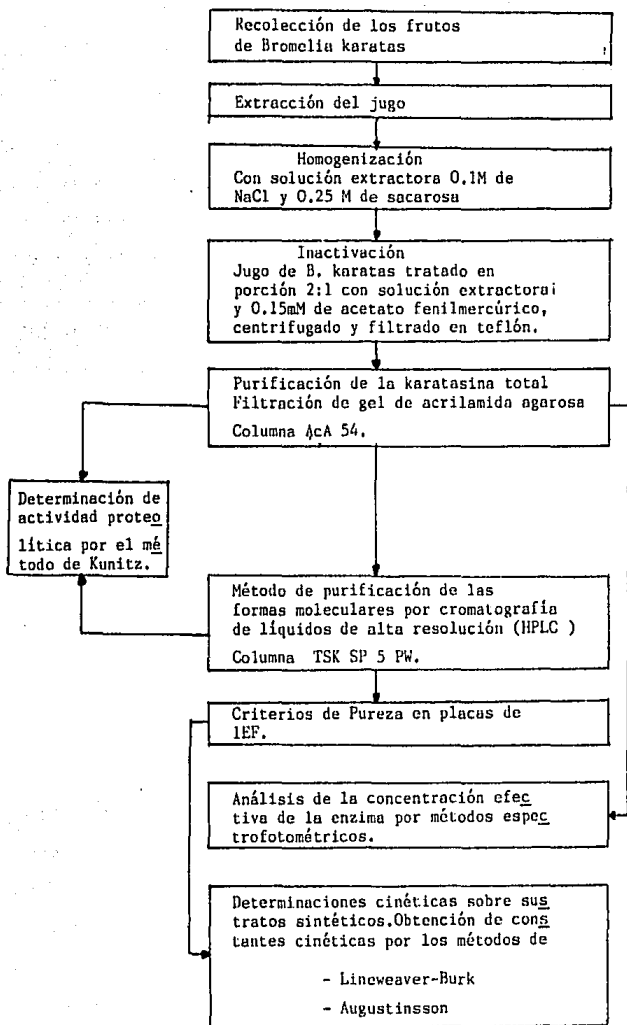
Multiplicando ambos lados de la ecuación por  $[S]$ :

$$\frac{S}{v} = \frac{S K_m}{V_{max} S} + \frac{S}{V_{max}} \quad (6)$$

$$\frac{S}{v} = \frac{1}{V_{max}} S + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (7)$$

Así, una gráfica de  $[S]/V$  contra  $[S]$  es lineal con una pendiente de  $1/V_{max}$ . A partir del corte sobre el eje  $[S]/V$  se obtiene  $-K_m/V_{max}$ . Cuando  $[S]/V = 0$ , el corte sobre el eje  $[S]$  se obtiene  $-K_m$ . ( 23 )

**PARTE**  
**EXPERIMENTAL**



## MATERIALES Y METODOS

### RECOLECCION

Los frutos de Bromelia karatas se recolectaron en la localidad de Cuilapan, Edo. de Oaxaca. Se transportaron al laboratorio y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### EXTRACCION DEL JUGO

Se llevó a cabo utilizando un exprimidor rotatorio, colocando el jugo en un baño de hielo para evitar al máximo la autodigestión de la enzima. Una vez extraída una cantidad adecuada de jugo se filtró a través de gasa y se mezcló en una porción 2:1 con una solución extractora conteniendo cloruro de sodio 0.1M y sacarosa 0.25M. Para inactivar a la enzima se agregó acetato fenilmercúrico en una concentración de 0.15mM. Esta mezcla se homogenizó en un homogenizador Ultraturrax durante 10 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Para eliminar residuos subcelulares se centrifugó a 70 000 g (39 000 rpm) durante 60 min a  $6^{\circ}\text{C}$ .

### PURIFICACION DE LA KARATASINA TOTAL

La primera etapa de purificación de la Karatasina total fue por cromatografía de filtración en gel.

Este sistema, consistió de: una columna de Ultrogel AcA (5 x 74 cm), una bomba que regula la velocidad de elución, un monitor de absorción modelo LKB que contiene un filtro para 280nm y un colector de fracciones.



Existen geles de separación para diferentes límites de peso molecular, en este trabajo se usó una columna de acrilamida agarosa AcA 54 (5 x 74cm) para moléculas con pesos moleculares entre 5 000 y 70 000, utilizando como eluyente acetatos-acético 0.05M con 0.3M de NaCl y 0.1 mM de acetato fenilmercúrico, pH 6.0, como eluyente.

El experimento se llevó a cabo equilibrando la columna AcA 54 con el regulador antes mencionado introduciendo posteriormente 20 ml- de la muestra de Karatasina centrifugada e inactiva. Se colectaron fracciones de 3 ml.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA

La actividad proteolítica se determinó por el método de Kunitz( 25 ) que consiste en adicionar en un tubo 1.9ml de caseína al 1% en regulador de fosfatos 0.05M con EDTA  $1 \times 10^{-4}$  M, pH 7.5. Para iniciar la reacción se adicionaron 0.1 ml de enzima activada con cisteína 1M, para dar una concentración final de cisteína de 0.02M en el tubo de reacción, permaneciendo 30 min en incubación a 37°C. Para detener la reacción proteolítica se agregaron 3ml de ácido tricloracético al 5%, se centrifugó a 3 500 rpm durante 30 min y se determinó absorbancia del sobrenadante a 280 nm contra un testigo que fue preparado de igual manera, solamente que la enzima fue adicionada después del ácido tricloracético. A 280nm se mide la absorción de los aminoácidos aromáticos liberados y se puede calcular la actividad específica en U/mg.

Una unidad de actividad se define como el incremento de una unidad de absorción en el sobrenadante, en un minuto a 37°C y pH 7.

Una unidad de actividad específica se define como los miligramos de enzima necesaria para lograr un incremento de una unidad de absorción en el sobrenadante en un minuto a 37°C y pH 7.5.

En nuestro caso las concentraciones de proteína utilizadas para el experimento se calcularon por absorción a 280 nm mediante el coeficiente de extinción ( $\Delta E_{280}^{1\%}$ ,  $1_{cm}$  de la karatasina que es 13.6).

#### METODO DE PURIFICACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA KARATASINA

Para separar y purificar las diferentes formas moleculares se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y una columna de intercambio iónico.

El aparato de cromatografía de intercambio iónico consistió en un sistema de bombas de alta presión, un inyector, un mezclador de gradiente, un detector espectral UV con un límite de absorción de 190 a 370 nm, un colector de fracciones y una columna de intercambio iónico. El detector espectral está conectado a una microcomputadora IBM para el procesamiento de los datos.

En este trabajo se usó una columna TSK SP 5 PW de intercambio catiónico, que posee grupos sulfopropilo cargados negativamente a los cuales se unen las proteínas que poseen cargas positivas; es decir, si el experimento se realiza a un valor de pH inferior al **pl de la proteína**

Se inyectaron a la columna volúmenes de 1 ml de la muestra de karatasina total, conteniendo aproximadamente 1.48 mg de proteína. Esta proteína fue previamente dializada contra agua destilada en bolsa de celofán para diálisis con límites de retención de 6 000 a 8 000 de peso molecular a 10°C, durante 24 hrs. La elución se llevó a cabo en 49 min, con un flujo de 0.7 ml/min utilizando un gradiente de NaCl de 0.05M a 1M en regulador de acetatos-acético 0.05M, acetato fenilmercúrico 0.1 mM, pH 5; y colectando fracciones de 0.7 ml.

En cada corrida, se observan en el cromatograma 7 picos diferentes a los que se les ha denominado formas moleculares: K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>, K<sub>5</sub>, K<sub>6</sub> y K<sub>7</sub>.

Las formas moleculares más abundantes se recircularon por separado a pH 4 para llevar a cabo la purificación de cada una de ellas.

#### CRITERIOS DE PUREZA

Se emplearon 2 criterios de pureza: a) Enfoque Isoeléctrico, b) Electroforesis en poliacrilamida.

##### a) Enfoque Isoeléctrico

Para determinar la pureza de cada forma molecular se llevó a cabo un enfoque isoelectrico en microplaca en un equipo de Phast system. Las condiciones de corrimiento fueron un potencial de - 2 000 V, y una corriente de 2.5 mA a 15°C. En este trabajo se usaron microplacas (Pharmacia) que contienen anfólicas que proporcionan un gradiente de pH de 3 a 9.

#### b) Electroforesis en geles de Poliacrilamida.

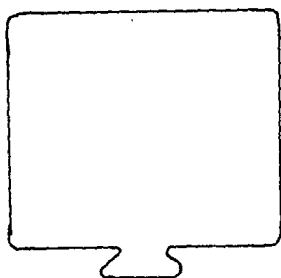
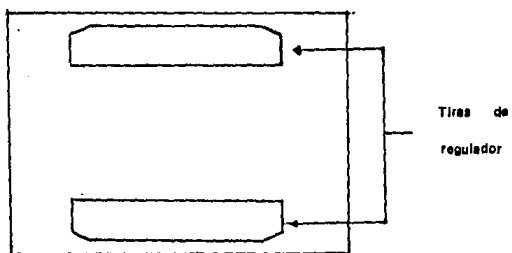
En el laboratorio se usó un gel homogéneo de poliacrilamida - (Phast Gel Homogeneous media 12.5%). Este gel tiene 13mm de gel de concentración y 32 mm en la zona de separación. Los geles son de aproximadamente 0.45mm de grosor y el sistema de regulador en el gel es de 0.112M de acetatos, 0.112M Tris pH 6.5. El experimento se llevó a cabo con tiras de regulador Phast Gel nativa. El sistema de regulador en estas tiras es de L-alanina 0.88M, Tris 0.025 M pH 8.8. Las tiras de regulador están hechas de 2% de agarosa para enfoque isoelectrico (IEF). ( Fig 4 )

#### ANALISIS DE LA CONCENTRACION EFECTIVA DE ENZIMA

Para llevar a cabo este punto se empleó el método propuesto por Bender ( 26 ) el cual se basa en la reacción estequiométrica, en condiciones de pre-equilibrio de las enzimas con varios ésteres específicos de un alcohol coloreado como el p-nitrofenol.

En éste trabajo se llevó a cabo un estudio cinético de la enzima de karatasina total sobre un sustrato de N- $\alpha$ -CBZ-L-Lisina p-nitrofenil éster con un espectrofotómetro Cary 1 de doble haz. El espectrofotómetro está conectado a un recirculador de agua marca LKB (Multitemp 2) que mantiene la temperatura de las celdas constantes, así como una microcomputadora para el procesamiento de datos.

El experimento se llevó a cabo colocando 2 celdas de cuarzo conteniendo 2.9 ml de regulador de acetatos 0.05M, EDTA  $1 \times 10^{-4}M$  a pH 4.6, en las chaquetas del espectrofotómetro en las cuales se

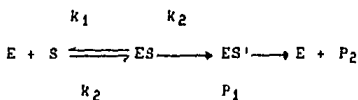


Gel Homogéneo

fig4

mantuvo la temperatura a 25°C. Posteriormente, a una de las celdas se le adicionaron 0.1 ml de sustrato N- $\alpha$ -Carbobenzoxi - L-Lisina p-nitrofenil éster 15mM disuelto previamente en una mezcla acetonitrilo-agua 8:2 ( 10 ), para determinar si había hidrólisis espontánea del sustrato en esas condiciones, y a la celda testigo se le adicionó 0.1ml de acetonitrilo-agua; en este momento se empezó a registrar la hidrólisis espontánea del sustrato dando lugar a la aparición del p-Nitrofenol, esto fué observado espectrofotométricamente a 340 nm durante 2 min. Finalmente para iniciar la reacción se adicionaron 50 $\mu$ l de enzima activa obteniendo un volúmen final de 3.05 ml y registrando el aumento de absorción a la misma longitud de onda en función del tiempo.

En las reacciones de hidrólisis del éster N- $\alpha$ -CBZ-L-Lisina de p-nitrofenil, en condiciones donde la concentración de sustrato - es mucho mayor que la de enzima, se observa la formación del compuesto intermediario acil-enzima (ES') en el pre-equilibrio y la liberación instantánea del primer producto P<sub>1</sub>, que en este caso es el p-Nitrofenol, seguido por la desacilación. ( 27, 28 )



Esta reacción es estequiométrica con respecto a un sitio individual, o sea se liberará un equivalente de p-nitrofenol por mol de enzima. Por lo tanto, si la primera etapa de la reacción

mol de enzima. Por lo tanto, si la primera etapa de la reacción puede observarse antes de que la enzima se regenere, será posible medir directamente la concentración efectiva de ésta.

De la gráfica obtenida, absorbancia en función del tiempo (fig.5) se puede determinar  $A_0$  así como  $A_s$  y de esta forma calcular la cantidad de enzima activa  $\pi$ , mediante:

$$\pi = \frac{A_0 - A_s}{\Delta E} \quad ( B )$$

Donde:

$A_0$  = es la absorbancia del sistema de reacción extrapolada a tiempo cero, es decir, la producida por la liberación del p-nitrofenil, equivalente a la enzima antes de establecer el equilibrio de flujos. (Steady state)

$A_s$  = es la absorbancia obtenida de la celda conteniendo el sustrato al momento de añadir la enzima (liberación inmediata del producto) (Tiempo cero).

$\Delta E$  = es la diferencia de los coeficientes de extinción molares del producto y del sustrato donde el  $\Delta E_{340}$  fue de 6150.

El dato de concentración de enzima activa se utilizó para corregir los valores de velocidad en los experimentos cinéticos.

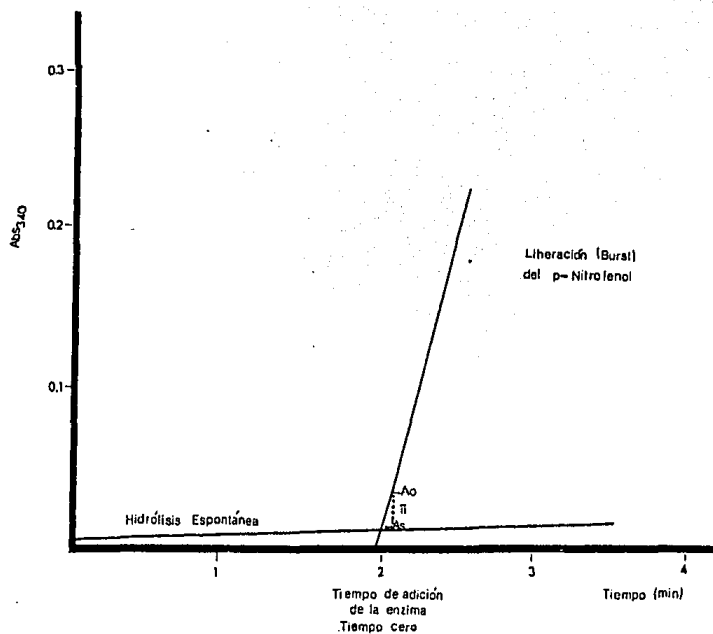


Fig 5.- Determinación de la concentración efectiva de enzima.  
Gráfica obtenida en el registrador, absorbancia en función del tiempo, para el cálculo de  $\pi$ .



#### DETERMINACIONES CINÉTICAS SOBRE SUSTRATOS SINTÉTICOS

Para determinar la especificidad de 2 de las formas moleculares de la Karatasina se obtuvieron las velocidades iniciales de reacción sobre diferentes sustratos sintéticos:

- N- $\alpha$ -Benzoil-DL-Arginina p-Nitroanilida (BAPNA). En este caso se usó el método propuesto por Englend ( 29 ), que consiste en preparar el sustrato a una concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M en 1 ml de dimetilsulfóxido y llevarlo a 100ml con regulador de fosfatos 10mM a pH 7. En este caso se mide la disminución de la absorción a una longitud de onda de 410nm a 35°C.
- N-CBZ-Glicina p-Nitrofenil éster. Se usó el método propuesto por Silverstein( 10 ), que consiste en preparar el sustrato en una concentración 4mM en acetonitrilo-agua 8:2. En este caso se mide disminución de la absorción con respecto al tiempo a 340nm a 25°C.
- N- $\alpha$ -Benzoil-L-arginina etil éster (BAEE). Se usó el método propuesto por Bender y Whitaker ( 30 ). El sustrato se prepara a una concentración de 10 mM en regulador de fosfatos 0.05M pH 7, EDTA  $1 \times 10^{-4}$ M. En este caso se mide la disminución de la absorción con respecto al tiempo a una longitud de onda de 285nm a 35°C.
- N- $\alpha$ -Benzoil-L-arginina etil éster (BAEE) usando el método propuesto por Mendel ( 30 ) con un regulador de Hepes(N-2-Hidroxi-etil-piperazina-N'-2 etano-sulfónico) 0.05M, EDTA

$1 \times 10^{-4} \text{M}$ , pH 7.5. a una longitud de onda de 253 nm y  $35^\circ \text{C}$ .

- N- $\alpha$ -CBZ-L-Lisina p-Nitrofenil éster. Por el método de Silverstein (10), que consiste en preparar el sustrato a una concentración de 15 mM en 8:2 de acetonitrilo-agua, en regulador de acetatos 0.05 M, EDTA  $1 \times 10^{-4} \text{M}$ , pH 4.6, midiendo a una longitud de onda de 340 nm a  $25^\circ \text{C}$ .

Los 2 sustratos que se eligieron para la determinación de las constantes cinéticas fueron: N- $\alpha$ -Benzoil-L-Arginina etil éster (BAEE) y N- $\alpha$ -CBZ-L-Lisina p-Nitrofenil éster, debido a los que presentaron mayor actividad sobre la karatasina purificada.

Para el cálculo de  $K_m$  y  $V_{max}$  se usaron concentraciones desde 0.05mM a 0.2mM y de 0.075mM a 0.450mM respectivamente. El tiempo de reacción fue de 10min y el volùmen final de la mezcla se mantuvo en 1ml. En el primer caso se registró disminución de la absorción en función del tiempo, en el segundo, el aumento en absorción del producto liberado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### PURIFICACION DE LA KARATASINA TOTAL

El extracto del jugo de los frutos de Bromelia Karatas homogenizado y centrifugado a 39 000 rpm durante 60 min a 6°C, se sometió a cromatografía de filtración en gel. Desde esta etapa, así como las subsecuentes la enzima se mantuvo inactiva ya que contenía acetato fenilmercúrico 0.15mM. En la figura 6 se presenta el patrón de elución de la columna de Aca 54, donde se observan 3 componentes. A cada fracción se le determinó actividad proteolítica por el método de Kunitz, encontrándose la máxima actividad en el pico del centro.

### DETERMINACION DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA

La enzima inactivada con acetato fenilmercúrico 0.15mM se activaba reversiblemente al ponerla en presencia de cisteína 0.02 M y EDTA  $1 \times 10^{-4}$ M. Se probó entonces la actividad proteolítica de la fracción obtenida por filtración en gel de enzima total, obteniendo un valor de 0.48U/mg, que resulta mayor a la reportada por Ota et. al. ( 32 ) que obtuvo valores de 0.37, 0.2 y 0.15 U/mg.

Por otro lado Lynn ( 33 ), obtuvo una actividad especifica de 0.66 U/mg para la peptidasas A y B de papaya, aisladas y purificadas por recirculación en gel de celulosa CM, que resulta mayor a la obtenida de la enzima total de Karatasina purificada en gel.

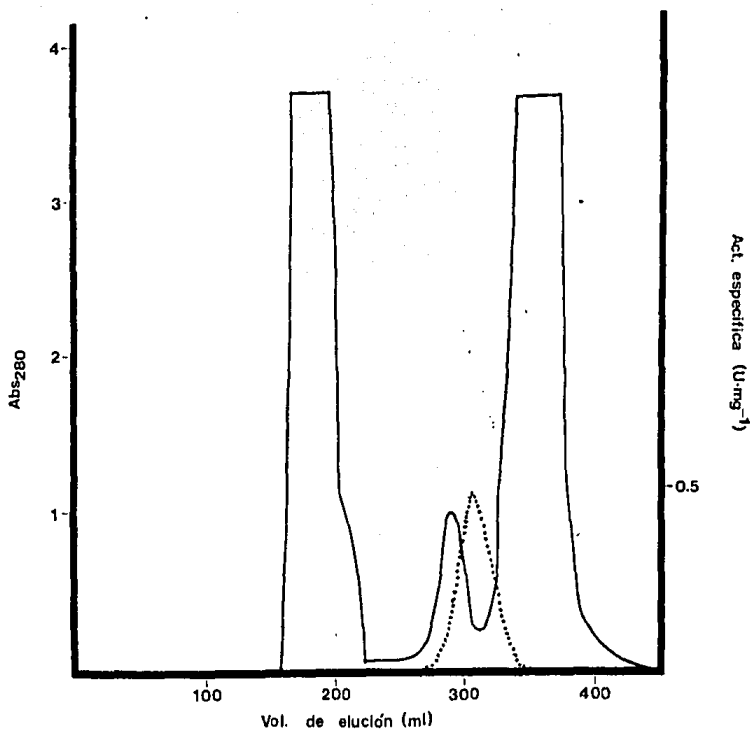


Fig 6.- Perfil de elución obtenido en el fraccionamiento de 50 ml de jugo de Bromelia karatas en una columna de Ultrogel AcA 54 ( 5 x 74 cm) con regulador de Acetatos 0,05 M, 0,3 M de NaCl y 0,1 mM de acetato fenilmercúrico a pH 6,0 (—).  
 (.....) fracciones con actividad proteolítica.

#### METODO DE PURIFICACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE KARATASINA

Para tratar de separar las formas moleculares de la Karatasina se utilizó la técnica de cromatografía de intercambio catiónico como se describe en la sección de materiales y métodos. La elución se llevó a cabo con un regulador de acetatos-acético 0.05M, acetato fenilmercurico 0.1mM, pH 5 utilizando un gradiente de NaCl de 0.05M a 1M (0.022 M/min).

En la figura 7 se muestra el cromatograma donde se observan 7 picos bien definidos con diferentes tiempos de retención y todos ellos con actividad proteolítica, excepto la forma molecular K<sub>1</sub>, la cual presentó una absorción muy baja, por lo que no se le probó actividad proteolítica, ni se usó para ningún experimento. Con anterioridad Sánchez ( 34 ) obtuvo en este laboratorio, 6 formas moleculares por enfoque isoeléctrico, con actividad proteolítica, y en una columna de intercambio catiónico obtuvo 8 formas moleculares, todas ellas con actividad proteolítica.

En este trabajo cada forma molecular se recirculó por separado en la misma columna de intercambio catiónico a pH 4. En la fig. 8, se muestran los diagramas de elución para estas formas moleculares donde pueden apreciarse picos bien definidos y homogéneos.

La tabla I muestra los valores de actividad específica y tiempos de retención de las formas moleculares.

Los puntos isoeléctricos así como el peso molecular de estas proteínas fueron determinados con anterioridad por Sánchez (34 ) los cuales son: K<sub>1</sub> 4.6, K<sub>2</sub> 5.5, K<sub>3</sub> 6.0, K<sub>4</sub> 7.6, K<sub>5</sub> 7.8, K<sub>6</sub> 8.1, K<sub>7</sub> 8.2 y K<sub>8</sub> 8.7; y su peso molecular es de 21 800.

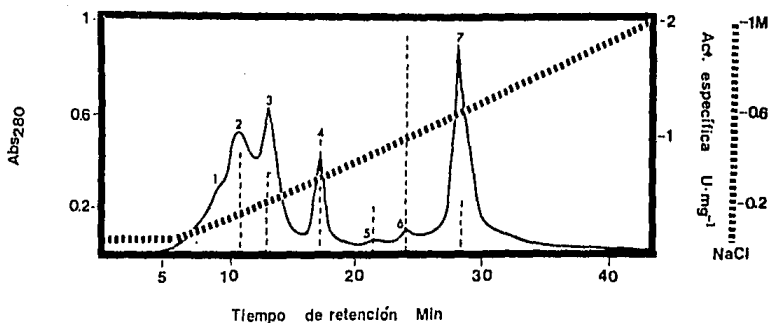


Fig 7.- Perfil de elución de 1.46mg de karatasina total obtenida en una columna TSK SP 5 PWpor intercambio catiónico en HPLC (—).Fracciones con actividad proteolítica(-----). El gradiente de NaCl(0-1M) se muestra con línea punteada (0.022M/min). ······

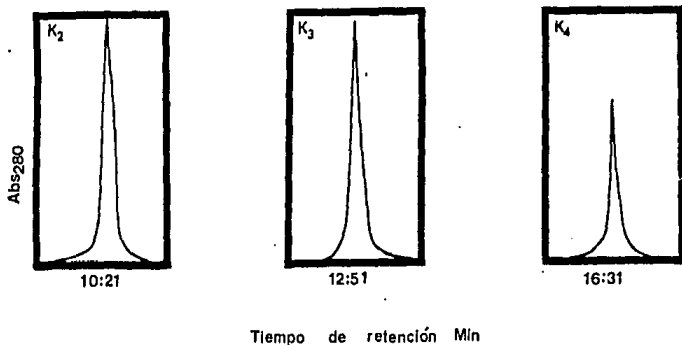


Fig 8.- Recirculación de  $K_2, K_3, K_4$  en las mismas condiciones del experimento anterior, únicamente se modificó el gradiente(0.023M/min).

Tabla I

Características de las formas moleculares de la karatasina, en columna TSK SP 5 PW de intercambio catiónico en HPLC.

Forma molecular	Act. esp. U/mg	tiempo de retención
K <sub>1</sub>	No se determinó	9 : 01
K <sub>2</sub>	0.889	10 : 21
K <sub>3</sub>	0.723	12 : 51
K <sub>4</sub>	0.985	16 : 41
K <sub>5</sub>	0.371	20 : 51
K <sub>6</sub>	1.8	23 : 21
K <sub>7</sub>	0.490	27 : 41

## CRITERIOS DE PUREZA

De acuerdo a los 2 criterios para determinar la pureza se obtuvieron los siguientes resultados.

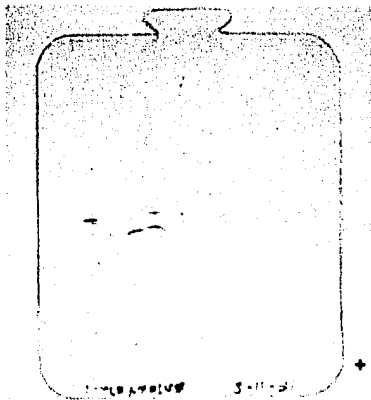
a) En la fotografía 1, se muestra el microgel de enfoque isoeléctrico con cada una de las formas moleculares recirculadas por HPLC. En el carril 3 se observa una sola banda para  $K_3$  1 por lo que se puede decir que ésta es la única forma pura. En el caso de  $K_2$  (2),  $K_3$  2 (4) y  $K_4$  (5) se observa una banda abundante y pequeñas contaminaciones de otras formas moleculares, las cuales no pudieron ser eliminadas al recircularlas en la columna de intercambio catiónico.

b) En la fotografía 2 se muestra el gel de electroforesis donde se aplicaron 4 formas moleculares, obteniéndose en el carril 7 una sola banda correspondiente a la forma molecular  $K_3$  1 que indica la presencia de proteasa pura. Con respecto a las formas moleculares  $K_2$ (8),  $K_3$  2 (6) y  $K_4$ (5) se observan 3 bandas para cada una de ellas, que corresponden a contaminaciones de otras formas moleculares; a pesar de que por HPLC (fig 8) se observan los picos homogéneos y bien separados.

( ) número de carril.

Estas contaminaciones es debido a que presentan pI muy similares y por lo tanto es difícil separarlas entre sí.

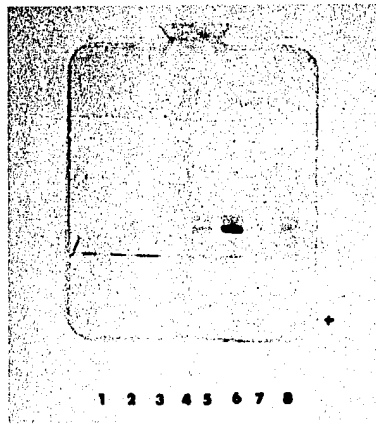




1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fotografía 1.- Enfoque isoelectrico en microgeles con gradiente de pH 3 a 9.

Carril 1  $K_1$   
 2  $K_2$   
 3  $K_3$  1  
 4  $K_3$  2  
 5  $K_4$   
 6 Patrones



1 2 3 4 5 6 7 8

Fotografía 2.- Electroforesis en microgeles de poliacrilamida de 12.5%

Carril 5  $K_4$   
 6  $K_3$  2  
 7  $K_3$  1  
 8  $K_2$

#### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION EFECTIVA DE ENZIMA

Este estudio se realizó utilizando la Karatasina total, esto es, la fracción con actividad que se recirculó en la columna de Ultrogel AcA 54, a una concentración de 6.11mg/ml sobre N- $\alpha$ -CBZ-L-Lisina p-Nitrofenil éster 15mM. En la tabla II se presentan los resultados comparado con los obtenidos por Bender ( 26 ) sobre tripsina que es una enzima proteolítica serínica y sobre papaína que es una enzima proteolítica cisteínica.

Para la Karatasina total se obtuvo un valor de 66 % de enzima activa, que está dentro de los valores reportados por Bender para tripsina ( 59 a 69 % ), utilizando el mismo sustrato, en las mismas condiciones Bender obtuvo el 42% de enzima activa para papaína ( con sustrato de N-Benzoil carbonil-L-tirosinato p-nitrofenil ) que es otra tior-proteinasa que comparado con Karatasina total es muy bajo, así como el que obtuvo para tripsina.

#### DETERMINACIONES CINETICAS SOBRE DIFERENTES SUSTRATOS

Debido a los resultados obtenidos en los diferentes criterios de pureza, se seleccionaron 2 formas moleculares de Karatasina, ya que presentaban bandas con ligera contaminación de otras formas moleculares, por lo que podemos decir, que no están puras por completo. Estas fueron K<sub>2</sub>, y K<sub>4</sub>. (Ver fotografía 1 )

Para el cálculo de las constantes cinéticas Km y Vmax se usaron las formas moleculares K<sub>2</sub> y K<sub>4</sub> sobre 2 sustratos sintéticos donde previamente habíamos observado mayor actividad: N- $\alpha$ -Benzoil-L-arginina etil éster (BAEE) ( 31 ) y N- $\alpha$ -CBZ-L-Lisina

Tabla II

Comparación de la concentración efectiva de enzima  
(karatasina y tripsina) sobre el sustrato de CBZ--  
L- Lisina p-nitrofenil éster.

Enzima	Volúmen final ml	[ S ] M	% Enzima activa
karatasina total	3.05	$4.9 \times 10^{-4}$	66
tripsina	3.0	$10.5 \times 10^{-4}$	59 a 69
papaína*	3.0	$2 \times 10^{-3}$	42

$$[ E ] = 4.4 \times 10^{-5} \mu M$$

\* Para esta enzima se usó el sustrato de N- Benzoil carbonil  
-L- Tirosinato p-nitrofenil.

p-Nitrofenil éster ( 10 ).

En la tabla III se muestran los resultados de este experimento: las formas moleculares de Karatasina usadas, las concentraciones de las mismas, así como de los sustratos empleados.

Los cálculos realizados para determinar  $K_m$  así como  $V_{max}$  se hicieron en forma comparativa por 2 métodos, que están basados en formas lineales de la ecuación de Michaelis-Menten, como son: el Método de Lineweaver-Burk ( $1/v$  vs  $1/S$ ) y el de Augustinsson ( $S/v$  vs  $S$ ). El trazo de Lineweaver ayuda a detectar cualquier desviación tal como la inhibición por exceso de sustrato. Por otra parte consideraciones estadísticas sugieren que se obtienen estimaciones más precisas al usar el método de Augustinsson, ya que en un intervalo determinado de concentración de sustrato, el peso relativo de  $1/v$  varía por un factor de 80, mientras que el peso relativo de  $S/v$  varía en un factor menor de 2. ( 35 ).

En la tabla IV se muestra la comparación de los valores de  $K_m$  usando el sustrato de BAEE a  $37^\circ\text{C}$  y pH 7, de la forma molecular  $K_2$  de karatasina con otras proteasas de tipo cisteínicas, así como los valores obtenidos para  $V_{max}$  por los 2 métodos comparativos.

Los valores de  $K_m$  obtenidos por  $K_2$  son muy bajos, por lo que se puede decir que ésta tiene gran afinidad por dicho sustrato.

En la tabla V se muestran los resultados de  $K_m$  obtenidos por Silverstein ( 10 ) para las bromelaínas de tallo (A y B) sobre el sustrato de N- $\alpha$ -CBZ-L-Lisina p-Nitrofenil éster, a  $25^\circ\text{C}$ , pH 4.6, comparándolos con los obtenidos con las formas moleculares de  $K_2$  y  $K_4$  de la Karatasina. En esta tabla, también aparecen los

Tabla III

Formas moleculares de karatasina usadas para determinar Km, concentraciones de las misma, así como de los sustratos empleados.

Formas moleculares conc.	[ E ]		[ S ]
	mg/ml	$\mu\text{M}$	mM
$K_2^a$ 0.3022mg/ml	$5 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{-7}$	0.05 a 0.20
$K_2^b$	$9 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-7}$	0.12 a 0.45
$K_4^b$ 0.2617mg/ml	$7 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-7}$	0.075 a 0.255

a) Sustrato de BAEE

b) Sustrato de CBZ-L- Lisina p-Nitrofenil éster.

Tab IV

Comparación de los valores de Km, sobre BAEE a 37 C y pH 7, de las formas moleculares K<sub>2</sub> de karatasina con otras proteasas de tipo cisteínicas, así como los valores de Vmax por los 2 métodos comparativos.

ENZIMA	METODOS	Km	Vmax	Ref
karatasina K <sub>2</sub>	Lineweaver	0.08	1x10 <sup>7</sup>	
	Augustinsson	0.08	2.7x 10 <sup>6</sup>	
Ficina E		27		(36)
Ficina H		42		(36)
Papaína		23		(36)
Bromelia		170		(37)
Asclepaina		17.7		(38)
Aracaína		0.11		(31)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla V

Resultados comparativos de Km obtenidos de las formas moleculares  $K_2$  y  $K_4$ , así como los obtenidos por -- Silverstein sobre el sustrato de CBZ- L- Lisina p-nitrofenil éster a 25 C y pH 4.6

Enzimas	Métodos	Km mM	Vmax M/seg
$K_2$	Lineweaver	0.14	$7.6 \times 10^{-7}$
$K_4$		0.065	$1.1 \times 10^{-7}$
$K_2$	Augustinsson	0.12	$1.4 \times 10^6$
$K_4$		0.07	$1.0 \times 10^7$
Bromelia A		0.057	
Bromelia B		0.122	

resultados de  $V_{max}$  por los 2 métodos descritos. Como se puede observar las 2 formas moleculares  $K_2$  y  $K_4$  presentan resultados un poco más altos comparados con los obtenidos por Sylverstein. Los valores de  $K_m$  obtenidos para  $K_2$  y  $K_4$  sobre el sustrato de N- $\alpha$ -CBZ-L-Lisina p-Nitrofenil éster son ligeramente mayores a los obtenidos por las bromelainas, pero siguen siendo bajos comparados con las otras tiol-proteinasas, demostrando que tienen también una gran afinidad por este sustrato.

Los valores de  $V_{max}$  no están reportados para ninguna de las enzimas, por lo que no se pueden comparar con los obtenidos con karatasina.



## CONCLUSIONES

- 1.- La Karatasina es una enzima proteolítica, la cual se inhibe - al ponerse en contacto con acetato fenilmercúrico, recuperando su actividad en presencia de reactivos que regeneran dicho grupo tiol. Esto nos indica que se trata de una proteasa - sulfhidrónica que contiene un grupo tiol.
- 2.- En la primera etapa de purificación se obtiene una buena actividad específica ( 0.48 U/mg ) comparada con otras proteasas cisteínicas.
- 3.- La Karatasina presentó 7 formas moleculares bien definidas en columna de intercambio catiónico, por lo que es una proteasa cisteínica polimórfica.
- 4.- Todas las formas moleculares presentaron actividad proteolítica, excepto la forma molecular  $K_1$ , a la cual no se le determinó.
- 5.- La Karatasina presentó el 66 % de concentración efectiva de enzima, por lo que un 34 % es irreversiblemente inactiva.
- 6.- El valor para  $K_m$  de  $K_2$  sobre el sustrato de BAEE fue de 0.08 mM lo que indica que esta forma molecular tiene gran afinidad sobre el sustrato.

- 7.- La forma molecular  $K_4$ , presentó mayor afinidad sobre el sustrato de CBZ-L-Lisina p-nitrofenil éster, ya que se obtuvo un valor promedio de 0.0675 mM.
  
- 8.- La enzima de karatasina no presentó actividad sobre amidas, pero si presentó actividad sobre ésteres, por lo que se puede decir que presentan especificidad sobre ésteres.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dalling, J. M. ; Cysteine Proteinases. Plant proteolytic enz. ( 1986 ) 1, pp 2 - 10.
- 2.- Greenberg, M. D. ; Plant proteolytic enzymes. Meth in enz. ( 1955 ) Vol II. pp 55 - 63.
- 3.- Baker, N. Edward. ; Drenth, Jan. ; The thiol proteases  
Structur and mechanism biological macromolecules f  
Assemblies. ( 1987 ) 3, pp 314 - 367.
- 4.- Lowe, G. ; The cysteine proteinasea. Tetrahedrom  
( 1976 ) 32, pp 291 - 302.
- 5.- Martínez, M. ; Catálogo de nombres vulgares y científicos de  
plantas mexicanas. Fondo Cultural Económico.  
México ( 1979 )
- 6.- Takashi,; and Murachi. Bromelain enzymes. Meth in enz.  
( 1970 ). 19, pps 273 - 283.
- 7.- Whitaker, R. J.; Freinsten, G.; On the molecular weights of  
the proteolitic enzyme of stem bromelain. Biochem ( 1964 )  
pp 1050 - 1054.
- 8.- Lynn, R. K.; The fractionation of bromelain. Anal. Biochem.  
( 1977 ) 77, pp 33 - 38.

- 9.- Kézdy, F. J. ; Kaiser, T. E.; Active site titration of cysteine proteases. Meth. in enz. ( 1970 ) 19, pp 273 - 283.
- 10.- Silverstein, M. R.; The assay of the bromelains using N- $\alpha$ -CBZ-L-Lysine p-Nitrophenyl ester and N-CBZ-Glycine p-Nitrophenyl ester as substrates. Anal. Biochem. ( 1974 ) 62, pp 478-484.
- 11.- Garduño, R.; et al; Proteinassas de plantas mexicanas II. Puntos isoeléctricos y caracterización de formas moleculares multiples en enzimas de Bromeliáceas. Rev. Latin. de Quim. ( 1974 ) 5, pp 243 - 248.
- 12.- Ochoa, N.; et al; Isolation and partial characterization of Bromelia hemisphaerica protease by affinity chromatography. Prep. Biochem. ( 1987 ) 17, pp 337 - 347
- 13.- Sumner, J. B. and Somers. G. F. Chem. and Meth. in enz. Academic Press Inc. N. Y. ( 1943 ).
- 14.- Bohinsky, C. R.; Bioquímica . Fondo Educativo Americano. 2a. edición. ( 1978 )
- 15.- Lenhinger, A. L.; Bioquímica. Omega. ( 1984 )
- 16.- Creighton, E. T. Protein structure and molecular properties. Freeman and Company, N. Y. ( 1984 )

- 17.- Bernhard, A. S.; Estructura y función de las enzimas. H. Blume. ( 1977 )
- 18.- Drenth, Jan.; Proteolytic enzymes general features of their mode of action. Rect. Trav. Chem. Pays-Bas. ( 1980 ) 99, pp 185 - 191.
- 19.- Scopes, K. R.; Protein purification. Springer-Verlang. New York. 2nd edition. (1978 ) pp 151 - 163.
- 20.- Regnier. F. E. High performance ion-exchange chromatography Meth. in enz. ( 1984 ) 104, pp 170 - 181.
- 21.- Rendina, George. ; Técnicas de bioquímica aplicada. Interam. 1a. edition, (1984)
- 22.- Segel, H. I. Biochem. Calculation. Britain, 2nd edition. ( 1976 )
- 23.- Bender, L. M.; Kezdy, J. F.; Wedler, C. F.;  $\alpha$ -Chymotrypsin: enzyme concentration and kinetics. J. Chem Educ. ( 1967 ) 44, pp 84 - 86.
- 24.- Dawson, C. M.; et al.; Data for Biochemical Reserch. Oxford. 2nd edition ( 1969 )

- 25.- Kunitz, M.; Gen. Physiol. ( 1974 ) 30, pp 291 - 310.
- 26.- Bender, L. M.; et al.; The determination of the concentration of hydrolytic enzyme solution:  $\alpha$ -Chymotripsina, tripsin, Papain, Elastasa, Subtilisin and Acetylcholinesterase. J. Chem. Soc.( 1966 ) pp 5891 - 5811.
- 27.- Rodríguez R. A.; Parámetros de activación sobre la hidrólisis tripsica del L-Lisinato de metilo. Tesis profesional para obtener el título de Ing. Bioquímico. Instituto Politécnico Nacional ( 1974 ) .
- 28.- Stanley, A.; Steady-state enzyme Kinetics. Gread Britán ( 1977 ) pp 1 - 50.
- 29.- Engel, C. P.; Enzyme Kinetics chapman ; John-Wiley & ( 1977 ) pp 7 - 25.
- 30.- Bender, L. My. and Whitaker, R. J.; Kinetics of papain catalyzed hidrolisis of  $\alpha$ -N-Benzoyl-L-argininamida. J. of the Amer. Chem. Soc. ( 1965 ), pp 2728 - 2737.
- 31.- Mendel, M.; Camerón, C. E.; A Nonproteolytic "Tripsin-like" enzyme purification and properties of Arachain. ( 1971 ) 48, pp 278 - 281.

- 32.- Ota, S.; Moore, J.; Stein, W. H.; Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelains. *Biochem.* ( 1964 ) 3, pp 180 - 185.
- 33.- Lynn, R. K.; A purification and some properties of two proteases from papaya latex. *Biochem. Biophys. Acta.* ( 1979 ) 569, pp 193 - 201.
- 34.- Sánchez S. R.; Aislamiento y caracterización de formas moleculares de Karatasina. Tesis profesional para obtener el Título de Químico-Farmacéutico-Biólogo. Inst. de Química UNAM ( 1989 ).
- 35.- Wilkinson, G. N.; Statistical estimations in enzyme kinetics. *J. Biochem.* ( 1964 ) 86, pp 324 - 331.
- 36.- Jones, K. I.; and Glazer, N. A.; Comparative studies on four sulfhydryl endopeptidases ( Ficus ) of Ficus glabrata latex. *J. Biochem. Chem.* ( 1970 ) 245, pp 2765 - 2772.
- 37.- Inagami, T. and Murachi, T.; Kinetic studies of bromelia catalysis. ( 1963 ) 2, pp 1439 - 1444.
- 38.- Barragán, E. B.; Hernández, A. A. et al; Proteinases of mexican plants XII, Kinetics and conformation studies with Asclepain. *Rev. Latin. Quim.* ( 1986 ) 16, pp 158 - 160.