



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA FOSFATASA ALCALINA (PA)
DE SUERO DE LECHE DE BOS TAURIS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

JIMENA LUNA LAVIADA



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN

VOCAL: Profesor: MIREYA RODRIGUEZ PENAGOS

SECRETARIO: Profesor: MARIA EUGENIA TORRES MARQUEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: EUCLIDES AVILA CHAVEZ

2° SUPLENTE: Profesor: ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EDIFICIO B, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, LABORATORIO DE BIOQUIMICA
EXPERIMENTAL**

ASESOR DEL TEMA:

M EN C. LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMÁN

SUSTENTANTE (S):

JIMENA LUNA LAVIADA

INDICE

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE GRÁFICAS

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. HIPÓTESIS	2
2. 1 JUSTIFICACIÓN	2
2. 2 OBJETIVOS	3
3. ANTECEDENTES	
3.1 MARCO HISTÓRICO	4
3.2 MARCO TEÓRICO	5
3.2.1 ¿QUÉ ES UNA PROTEÍNA?	5
3.2.2 QUE ES UNA ENZIMA	6
3.2.2.1 PROPIEDADES GENERALES DE LAS ENZIMAS	6
3.2.2.2 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS ENZIMAS	7
3.2.2.3 CLASIFICACIÓN DE TIPOS DE ENZIMAS	8
3.2.2.4. MODELOS DE RECONOCIMIENTO ENZIMA-SUSTRATO	9
3.2.3 CONCEPTOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA	9
3.2.3.1 FACTORES QUE INTERVIENEN EN CINÉTICA ENZIMÁTICA	11
3.2.3.2 ECUACIONES DE VELOCIDAD	11
3.2.3.3 MODELO DE CINÉTICA ENZIMÁTICA DE MICHAELIS-MENTEN	13
3.2.3.4 EFICIENCIA CATALÍTICA	15
3.2.4 FOSFATASA ALCALINA	16
3.2.4.1 FORMAS MÚLTIPLES DE FOSFATASA ALCALINA	17
3.2.4.2 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN	18

3.2.4.3 IMPORTANCIA DE LA PA EN LA LECHE DE VACA	20
4. METODOLOGIA	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 AISLAMIENTO DE PAM A PARTIR DE LECHE BRONCA DE <i>B. TAURUS</i>	37
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA PA	39
5.3 CINÉTICA DE LA ENZIMA PA_M OBTENIDA A PARTIR DE SUERO DE LECHE BRONCA DE <u><i>BOS TAURUS</i></u>	43
5.4 CROMATOGRAFÍAS DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	49
5.5 PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO	50
5.6 EFECTO DE LA ADICIÓN DE OTROS GRUPOS FOSFATO	52
5.7 EFECTO DE LA ADICIÓN DE COFACTORES	53
6. CONCLUSIONES	54
7. PERSPECTIVAS	55
8. REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1	6
REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS DISTINTOS NIVELES DE ESTRUCTURA PROTEICA	
FIGURA 2.1	7
REPRESENTACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL SITIO ACTIVO Y EL SUSTRATO	
FIGURA 2.3.1	7
REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ENERGÍA DE ACTIVACIÓN	
FIGURA 2.5.1	9
REPRESENTACIÓN MODELO LLAVE-CERRADURA	
FIGURA 2.5.2	9
REPRESENTACIÓN MODELO AJUSTE INDUCIDO	
FIGURA 3.1.1	13
REPRESENTACIÓN MODELO MICHAELIS-MENTEN	
FIGURA 4.1.1	16
REPRESENTACIÓN DE FÓRMULA GENÉRICA ORGÁNICA QUE CONTIENE UN GRUPO FOSFORILO	
FIGURA 4.1.2	16
REPRESENTACIÓN FOSFATASA ALCALINA	
DIAGRAMA DE FLUJO	36
FIGURA α.	41
GEL SDS-PAGE 1.	

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 3.2	12
RELACIÓN ENTRE EXPRESIONES DE VELOCIDAD, ORDEN Y UNIDADES K	
TABLA A	23
ELABORACIÓN DE UNA CURVA PATRÓN DE P-NITROFENOL	
TABLA B	24
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	
TABLA C	25
ELABORACIÓN DE UNA CURVA PATRÓN PARA TÉCNICA DE BRADFORD	
TABLA Δ	25
ELABORACIÓN DE TÉCNICA DE BRADFORD	
TABLA λ	26
ELABORACIÓN DE TÉCNICA DE LOWRY	
TABLA ε	27
ELABORACIÓN DE GELES DE SDS-PAGE	
TABLA D	28
ELABORACIÓN DE GELES NATIVOS	
TABLA E	29
EFFECTO DEL PH	
TABLA F	30
DETERMINACIÓN DEL PH ÓPTIMO USANDO LA MISMA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA CON GRADIENTE DE PH	
TABLA G	
DETERMINACIÓN DE PA_M Y PA_B	31
TABLA H	31
DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO	
TABLA I	32
DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL INHIBIDOR (1ª CONCENTRACIÓN)	

TABLA J	33
DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL INHIBIDOR (2° CONCENTRACIÓN)	
TABLA K	34
EVALUACIÓN DE PAM UTILIZANDO FUENTE ALTERNATIVA DE FOSFATO INORGÁNICO	
TABLA 5.1	38
COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN DISTINTAS MUESTRAS DEL SUERO DE LECHE BRONCA DE <i>BOS TAURUS</i> UTILIZANDO LA TÉCNICA DE BRADFORD	
TABLA 5.2	39
COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN DISTINTAS MUESTRAS DEL SUERO DE LECHE BRONCA DE <i>BOS TAURUS</i> UTILIZANDO LA TÉCNICA DE LOWRY	
TABLA 5.3.1	45
PARÀMETROS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA PAM	
TABLA 5.3.2	47
PARÁMETROS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA PAM UTILIZANDO INHIBIDORES	

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1	37
COMPARACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE P-NITROFENOL FORMADO A PARTIR DE P-NITROFENIL FOSFATO MEDIANTE LAS ENZIMAS AISLADAS A PARTIR DE SUERO Y CREMA	
GRÁFICA 2	40
COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PA TRATADA TÉRMICAMENTE CON LA PA NO TRATADA	
GRÁFICA 3	42
COMPARACIÓN ENTRE LA VELOCIDAD ENZIMÁTICA DE LAS MUESTRAS DE PA UTILIZANDO DIFERENTES SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.	
GRÁFICA 4	43
COMPARACIÓN ENTRE VELOCIDADES DE PAM EN UN GRADIENTE DE PH UTILIZANDO LA MISMA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA.	
GRÁFICA 5	44
EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN EN PAM	
GRÁFICA 6	45
EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO EN PAM	
GRÁFICA 7	46
EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y ADICIÓN DE UN INHIBIDOR EN LA PAM	
GRÁFICA 8	48
EFECTO DEL INHIBIDOR EN PAM	
GRÁFICA 9	49
VELOCIDADES ENZIMÁTICAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOGRFÍA	
GRÁFICA 10	50
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR LA CROMATOGRFÍA	
GRÁFICA 11	51
COMPARACIÓN ENTRE LA VELOCIDAD ENZIMÁTICA DE LAS MUESTRAS DE PA EN SUERO DE LECHE PRECIPITADAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SULFATO DE AMONIO	
GRÁFICA 12	52
EFECTO DE LA ADICIÓN DE OTRAS FUENTES DE FOSFATOS	
GRÁFICA 13	53
EFECTO DE LA ADICIÓN DE COFACTORES	

ABREVIATURAS

Abs	Absorbencia
BSA	Albúmina Sérica bovina
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i> (vaca común)
cm	Centímetros
C	Celsius (grados)
CO ₃ ²⁻	Carbonatos (solución amortiguadora)
DE	Desviación Estándar
EN	Enzima Normal (PA _m) aislada de suero de leche de <i>B tauris</i>
Gly	Glicina (solución amortiguadora)
K	Kelvin (Unidades Internacionales)
λ	Longitud de Onda
M	Mol
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
μ L	Microlitro
μ g	Microgramo
μ mol	Micromol
nm	Nanómetros
pI	Punto Isoeléctrico
PA	Fosfatasa Alcalina
PA _b	Fosfatasa Alcalina bacteriana
PA _m	Fosfatasa Alcalina aislada de mamífero
PA _{TNS}	Fosfatasa Alcalina aislada de mamífero isoenzima no específica de tejido
pH	potencial de Hidrógeno
RPM	Revoluciones Por Minuto
s	Segundos
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide gel Electrophoresis
TRIS	Tris(2-carboxietil)fosfina
U	Unidad de actividad enzimática
V _c	Volumen de Crema
V _i	Volumen Inicial
V _f	Volumen Final
V _s	Volumen Suero



RESUMEN

La leche proveniente de la especie bovina siempre ha tenido una especial importancia debido a que se destina para el consumo humano y por ello, ha sido objeto de estudio a lo largo del siglo XX. Existen varios tipos de enzimas en la leche de los mamíferos y destacan las fosfatasas, las cuales se encargan de hidrolizar a los enlaces éster fosfóricos. Los objetivos del presente trabajo fueron el aislamiento y el estudio de las propiedades bioquímicas de la enzima Fosfatasa Alcalina (PA) obtenida a partir del suero de leche de *Bos taurus*, lo cual resulta novedoso, puesto que diseños experimentales anteriores se basan en la extracción de la PA utilizando la crema de la leche bronca, así como de los productos lácteos derivados.

En el presente trabajo experimental, resultó importante diferenciar la PA de *B. taurus* de aquella PA bacteriana residual, para lo cual se realizaron diferentes técnicas para identificarla. Estas incluyen uso de temperaturas extremas, metodología de reactivación térmica y geles SDS-PAGE.

Para caracterizar parcialmente las propiedades cinéticas identidad de la Fosfatasa Alcalina mamífera aislada de la leche bronca, se determinó el pH óptimo de la actividad enzimática, y se propuso trabajar con Glicina como amortiguador óptimo y se estudió el efecto de la concentración del sustrato en la actividad enzimática de PA y se compararon los efectos de inhibidores. Por otra parte, se analizó el efecto de diferentes iones en la actividad enzimática de PA.



INTRODUCCIÓN

La presente tesis forma parte del proyecto del programa: "Apoyo a la docencia experimental en Bioquímica", el cual tiene como objetivos optimizar la administración de recursos de la Universidad, así como obtener mejores resultados experimentales en el desarrollo de las prácticas efectuadas por los alumnos de Licenciatura de las diversas carreras de la Facultad de Química, por lo que se busca la purificación y caracterización bioquímica de distintas enzimas de interés didáctico, mediante el uso de métodos y técnicas que puedan reproducirse en los laboratorios de pregrado.

1. HIPÓTESIS

A partir del suero de la leche de *Bos taurus*, se puede aislar y caracterizar cinética y parcialmente a la Fosfatasa Alcalina.

2.1 JUSTIFICACIÓN

Las enzimas de los mamíferos siempre se han estudiado meticulosamente debido a su importancia médica e industrial. Particularmente aquellas provenientes de seres vivos que constituyen un beneficio económico, tales como los ovinos y los bovinos. Se han desarrollado varias metodologías no invasivas para el aislamiento y estudio de enzimas que puedan resultar semejantes a las enzimas humanas.

Por otra parte, resulta importante proponer técnicas para obtener enzimas purificadas a partir de recursos de fácil acceso que permitan mejorar el aprovechamiento de los recursos en los laboratorios de pregrado. Existen reportes del aislamiento de las diferentes Fosfatasas, a partir de la crema de la leche de *B. taurus*. Sin embargo, no se ha reportado el aislamiento utilizando el suero, por lo que en la presente tesis se propone aislar la PA utilizando el suero de leche y compararlo con aquel que se reportado.



2.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de la presente investigación es aislar y caracterizar bioquímicamente a la enzima Fosfatasa Alcalina de suero de leche de vaca.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislamiento de la enzima Fosfatasa Alcalina (PA) a partir de leche bronca de *Bos taurus*.
- Determinación de la actividad de la enzima de PA aislada.
- Determinación del efecto del pH en la actividad enzimática.
- Determinación del uso de cofactores en la actividad enzimática.
- Determinación del efecto de la concentración del sustrato en la actividad enzimática de PA.
- Determinación del uso de grupos fosfatos provenientes de distintos sustratos
- Determinación del efecto de un inhibidor en la actividad enzimática de PA.



3. ANTECEDENTES

3.1 MARCO HISTÓRICO

Resulta comprensible la importancia de las investigaciones de las distintas enzimas, ya que gran parte de la historia de la bioquímica se ha entrelazado al descubrimiento y estudio de enzimas en la Medicina y otros campos incipientes de la Química; estas investigaciones pueden remontarse al siglo XVII. Se considera precursor directo del estudio de la enzimología a Jan Van Helmont, quien a principios del siglo XVII propuso que la digestión de los alimentos implicaba necesariamente una transformación a partir de distintos “**fermentos**” (puesto que acuñó el término utilizado en la enología) y realizó diferentes comparaciones entre el proceso digestivo y la producción vinícola, lo cual dio pauta a las investigaciones acerca de otros procesos enzimáticos (Debus,1990)(Sloan, 1996).

No obstante, el primero en acuñar el término enzima, fue Wilhelm Friedrich Kuhne en 1878, quien investigaba a los agentes involucrados en la digestión humana y encontró que los responsables de la digestión humana y animal eran agentes catalizadores orgánicos capaces de llevar a cabo distintas reacciones químicas (Rezende,2006).

La ureasa fue la primera enzima aislada fue en 1923 por el bioquímico James B. Sumner, quien además confirmó la naturaleza proteica de las enzimas mediante diversos experimentos realizados en su laboratorio, lo cual le ameritó el premio Nobel en 1948 (Maynard, 1958).

En el caso particular de la PA, en 1912, dos grupos independientes de investigadores (primero el grupo de Grosser y Hussler y posteriormente von Euler) (McKenna, 1979) comprobaron que la PA se encontraba presente en distintos tejidos humanos (Debus,1990)(McKenna,1979). Para ello en 1912, se propuso que existía una enzima capaz de hidrolizar el glicerofosfato en la mucosa intestinal y la denominaron a dicha enzima fosfatasa (Parmjitt, 2010).



3.2 MARCO TEÓRICO

3.2.1 ¿Qué es una Proteína?

Una proteína es una macromolécula constituida por una secuencia establecida de aminoácidos, unidos covalentemente entre sí mediante enlaces peptídicos, formando cadenas no ramificadas caracterizadas por la composición de su secuencia (Lehninger, 2005).

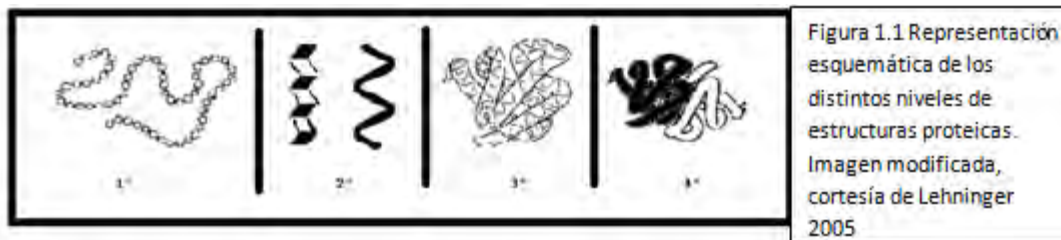
A diferencia de las amidas y de los ácidos carboxílicos, los aminoácidos (a.a) son sólidos cristalinos no volátiles, insolubles en disolventes no polares y sus soluciones acuosas se comportan como soluciones de sustancias de elevado momento dipolar (Morrison, 1990).

Existen cuatro niveles estructurales que se utilizan para clasificar a una proteína. La estructura básica, denominada primaria, implica la disposición proteica determinada por la unión covalente de los aminoácidos, formando cadenas polipeptídicas. (Devlin, 2006) Posteriormente, se encuentra la estructura secundaria, referente a la disposición espacial de las cadenas, misma que puede darse en forma de hélices y hojas plegadas; dicha estructura se debe a los puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno y nitrógeno entre diferentes cadenas o partes distintas de una misma cadena. (Lehninger, 2005).

Se denomina estructura terciaria a la estructura tridimensional del polipéptido, a la forma globular de la cadena polipeptídica, siendo característico un interior conformado mayormente de residuos no polares; también se incluyen las relaciones conformacionales en el espacio de las cadenas laterales y las relaciones geométricas entre regiones distantes de la cadena polipeptídica. Finalmente se entiende como estructura cuaternaria a la asociación de subunidades polipeptídicas discretas en una proteína conformada por múltiples subunidades (Devlin, 2006) (Lehninger, 2005).



De manera esquemática, los conceptos anteriores se resumen en la Fig 1.1



3.2.2 ¿Qué es una Enzima?

Una *enzima* es aquella proteína cuya acción biológica consiste en catalizar las reacciones de los sistemas vivos, cuando éstas sean termodinámicamente posibles (Voet et Voet, 2006). Las sustancias que conforman los reactivos de las reacciones metabólicas catalizadas por las diferentes enzimas reciben el nombre de *sustratos*. De acuerdo a la enzima que se describa, la especificidad puede ser relativa (lo que algunos autores refieren como *actividad promiscua*, lo que implica que la enzima pueda catalizar las reacciones de un grupo de sustratos) (Babtie, Tokuriki y Hollander, 2010) o bien *especificidad absoluta* (es decir que una enzima cataliza exclusivamente un solo sustrato) (Bohinski, 1987).

3.2.2.1 Propiedades generales de las enzimas.

Debido a su naturaleza proteica, la estabilidad de las enzimas depende de las condiciones fisicoquímicas del medio en el cual se encuentran, donde destacan el pH, la temperatura y la fuerza iónica de la solución en la cual se encuentra, entre otros factores. (Voet et Voet, 2006). Las enzimas poseen *sitios activos*, también denominados *sitios catalíticos*, que son aquellas regiones enzimáticas donde se une la enzima al sustrato, con la finalidad de que se lleve a cabo la reacción. Estructuralmente, el sitio activo se forma por un arreglo tridimensional particular de la proteína, diferente al resto de la



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA FOSFATASA ALCALINA (PA) DE SUERO DE LECHE DE BOS TAURUS

cadena de aminoácidos, debido a que está formado por cadenas laterales de residuos de aminoácidos específicos (Douglas, 1992).

Debido al reconocimiento estructural entre la región del sitio activo con algunas regiones características del sustrato, puede llevarse a cabo la catálisis enzimática. (Lehninger, 2005)

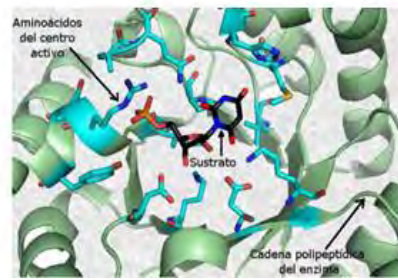


Figura 2.1 Representación de la interacción entre los aminoácidos del sitio activo y el sustrato.
Imagen cortesía de Ayala-Esquivel, 2010.

3.2.2.2 Importancia biológica para las enzimas

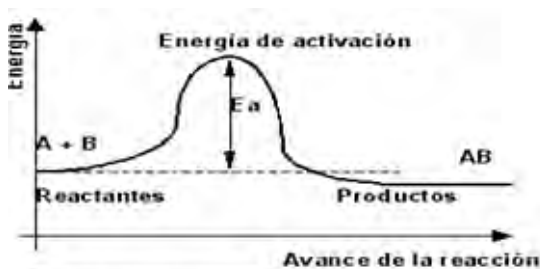


Figura 2.3.1 Representación de la Energía de Activación, mediante la gráfica de la Energía en función del Avance de la reacción

Cortesía de Engel 2010

La energía de activación se requiere para la interacción de las moléculas en las reacciones químicas, lo que permite que se alcance el estado de transición y por ende, puede decirse que es la magnitud energética necesaria para que todas las moléculas contenidas en un mol de sustancia se transformen en el complejo

del estado de transición (Ghélis, 1998)

La energía de activación es el factor determinante para que una reacción química pueda llevarse a cabo, por lo cual resulta objeto de estudio para la Cinética Química. La diferencia en el nivel de energía libre entre los reactivos y los productos se representa como ΔG° . Si la diferencia de energía (ΔG°) es negativa, es decir si los productos están en un nivel energético menor que los sustratos, la reacción se lleva a cabo en forma espontánea. Las enzimas, aceleran exclusivamente a las reacciones que podrían producirse espontáneamente (cuyo $\Delta G^{\circ} < 0$) sin catalizar reacciones energéticamente desfavorables (Ghélis, 1998). Para ello, simplemente disminuyen la energía de activación, con lo cual un mayor número de moléculas de los sustratos tienen la energía requerida para poder llevar a cabo la interacción necesaria para dar como resultado el producto sin modificar la constante de equilibrio.



La eficiencia de las reacciones enzimáticas vendrá dada lógicamente en función de que la **energía de activación** de la reacción enzimática, catalizada por una enzima, sea significativamente menor que la **energía de activación** de la energía de activación de la reacción no catalizada por la enzima correspondiente.

3.2.2.3 Clasificación de Tipos de enzimas

A manera de consenso internacional, basándose en la clasificación oficial de la *Enzyme Commission number* (EC); y con la finalidad de estandarizar la nomenclatura enzimática, las enzimas suelen clasificarse en distintas categorías acorde a la reacción que catalizan:

- Oxidorreductasa (EC 1) Puesto que catalizan reacciones de reducción- oxidación, y por consiguiente se involucra la transferencia de electrones (e^-). Ejemplos de las oxidorreductasas son alcohol deshidrogenasa y glicerol deshidrogenasa.
- Transferasas (EC 2) Catalizan las transferencias de distintos grupos funcionales, como por ejemplo las transaminasas y las transacetilasas.
- Hidrolasas (EC 3) Las cuales catalizan las reacciones de hidrólisis siendo ejemplos de ellas las glicosidasas y estererasas. En el presente trabajo, se trabajó con Fosfatasa, misma que se caracteriza por ser una enzima hidrolasa.
- Liasas (EC 4) Mismas que permiten la creación de dobles enlaces, ligando de esta manera a los productos, entre las cuales se encuentran descarboxilasas y aldehído liasas.
- Isomerasa (EC 5) Cuya función consiste en catalizar las reacciones de isomerización, como las racemasas y las epimerasas.



3.2.2.4 Modelos de reconocimiento enzima-sustrato (Fisher y Koshland)

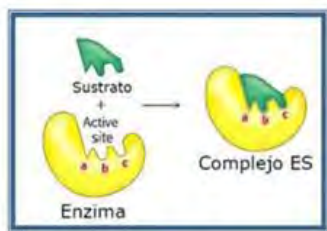


Figura 2.5 Modelo de llave-cerradura, propuesto por Fisher en 1984. Imagen modificada Ayala-Esquivel 2010

El *modelo de la llave-cerradura*, propuesto por Fisher en 1984, donde se asume que el sitio activo posee un ajuste perfecto para un sustrato específico; a este ajuste se denominó *complementariedad espacial* y se propuso que no se requieren modificaciones en el sustrato, tal como se ilustra en la figura 2.5.1

(Feduchi, 2011)

Por otra parte, se propuso el *modelo de ajuste inducido*, donde se expuso la hipótesis de cambios conformacionales en la enzima debido al sustrato, mismo que provoca la alineación apropiada de los grupos funcionales del sitio activo, y con lo cual se genera la formación del complejo *enzima-sustrato*, como se ilustra en la figura 2.5.2 (Ayala Esquivel, 2011)

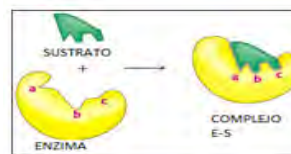


Figura 2.5.2 Modelo del ajuste inducido, propuesto por Koshland. Imagen modificada Ayala-Esquivel

3.2.3 Conceptos de cinética

La cinética enzimática puede definirse como la rama de la fisicoquímica que analiza la variación de la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas en función de distintos parámetros experimentales como la concentración del sustrato, la temperatura, pH o inhibidores. (Engel, 2007)(Logan, 2000)

La cinética enzimática debe considerar la *saturación* de la enzima debido al sustrato. El comportamiento de la velocidad enzimática en función de la concentración de sustrato presenta un comportamiento muy particular, para concentraciones bajas de sustrato, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración del mismo (con un comportamiento similar a las cinéticas químicas de reacciones no enzimáticas); no obstante, conforme se va incrementando la concentración de sustrato, el comportamiento de la



velocidad de reacción no es proporcional a éste. Finalmente, al seguir incrementando las concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción se vuelve totalmente independiente de la concentración del sustrato y se aproxima a la asíntota de un valor máximo característico de cada enzima (denominado *velocidad máxima*). (Engel, 2007)(Engel ,1981)

Al representar el esquema general de una reacción catalizada

enzimáticamente,
$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} EP$$
 puede definirse a la K_m como

El valor de K_m permite obtener una idea de la afinidad de la enzima por su sustrato, ya que cuanto mayor es K_m , menor es la afinidad (puesto que predominan las formas E y S libres). Por el contrario, si se trata de una K_m menor, la afinidad de la enzima por el sustrato es alta, puesto que predomina la forma ES.

La constante k_2 , misma que define el poder catalítico de la enzima, se denomina *número de recambio*, puesto que refiere al número de moléculas de sustrato convertidas en producto per unidad de tiempo. Las unidades utilizadas para medir la actividad enzimática son:

- Unidades de actividad enzimática (U), mismas que representan la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un μmol de sustrato en un minuto.
- Katales (kat), las cuales refieren a la cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato en un segundo. Los katales son la unidad del sistema internacional (SI).

Con la finalidad de que exista una correlación, se ha estipulado la equivalencia de 60, 000,000 U para 1 kat.



3.2.3.1 Factores que intervienen en cinética enzimática

El medio donde transcurre la reacción enzimática requiere la presencia de distintos compuestos y condiciones: sustratos, condiciones óptimas de pH, temperatura óptima y presencia de iones característicos. Cabe mencionar que los sustratos y los iones requeridos para la reacción enzimática deben encontrarse en condiciones saturantes, con la finalidad de que la velocidad de reacción dependa solamente de la cantidad de enzima presente. Por regla general, se utiliza una concentración de sustrato 10 veces mayor que la K_m de la enzima, puesto que así se garantiza que la velocidad sea el 91% de la velocidad máxima. (Engel, 1981)

3.2.3.2 Ecuaciones de velocidad

La cinética enzimática propone, estudia y describe los mecanismos de reacción mediante los cuales resulta plausible explicar la manera en la cual se llevan a cabo las distintas interacciones entre sustratos y enzimas; de igual manera, permite el planteamiento de modelos matemáticos que permitan expresar las relaciones que describan la velocidad de las reacciones químicas (Logan, 2000). Por ejemplo, una reacción química unidireccional puede ser descrita mediante un mecanismo de reacción de

un paso elemental, como se muestra: $A + B \longrightarrow C$

Por lo cual la ecuación inferior puede describir la ley de la velocidad de la reacción anteriormente descrita:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [B]$$

Y la anterior ecuación refiere a que la velocidad de la reacción se define por la velocidad con la que los reactivos desaparecen o bien la velocidad con la cual se forma el producto C.



A la constante con la cual se indica la proporcionalidad para la ecuación, k , se le conoce como *constante de velocidad de la reacción* y sus unidades dependen del *orden de la reacción*, como puede observarse en la Tabla 3.2 Para determinar el orden de la reacción, debe considerarse el valor que suman los exponentes propios de las concentraciones de A y B, los cuales pueden resultar números enteros o fraccionarios. (Aguirre-Martínez, 2010)

Tabla 3.2 Relación entre expresiones de velocidad, orden y unidades de k

Orden de reacción	Ley de velocidad	Unidades de k
0	$v = k \cdot [A]^0 = k$	$M \cdot s^{-1}$
1	$v = k \cdot [A]$	s^{-1}
2	$v = k \cdot [A]^2$	$M^{-1} \cdot s^{-1}$

De la tabla anteriormente descrita pueden inferirse los siguientes comportamientos:

- En el caso de las Cinéticas enzimáticas de Orden Cero, la velocidad de reacción será totalmente independiente de la concentración de los reactivos, y las unidades de la constante de velocidad serán $M \cdot s^{-1}$
- Por otra parte, en el caso de las Cinéticas enzimáticas de Primer orden, la Velocidad de reacción será directamente proporcional a la Concentración del reactivo, y las unidades de la constante de velocidad serán s^{-1}
- En contraparte, en el caso de las Cinéticas enzimáticas de Segundo orden, la Velocidad de reacción será directamente proporcional al cuadrado de la Concentración del reactivo, por lo cual las unidades de la constante de velocidad serán $M^{-1} \cdot s^{-1}$ (Logan, 2000).



3.2.3.3 Modelo de cinética enzimática de Michaelis- Menten

El mecanismo cinético de reacción para la cinética enzimática más conocido es el modelo propuesto por Michaelis-Menten en 1913. (Feduchi 2011) Este mecanismo consta de dos pasos:

- En el primer paso se forma, de manera reversible, el complejo E-S (complejo enzima-sustrato).
- En el segundo se lleva a cabo la acción catalítica de la enzima irreversiblemente (hidrólisis, condensación, reacciones de óxido-reducción). Éste paso está caracterizado por la *constante catalítica* (k_{cat}).

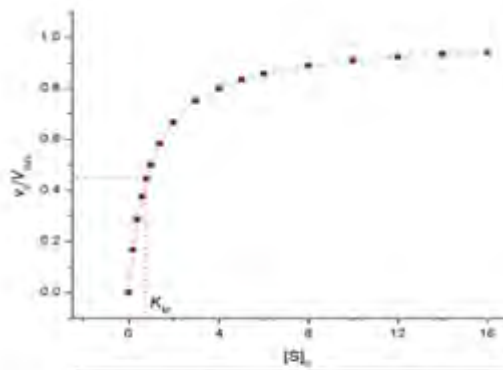
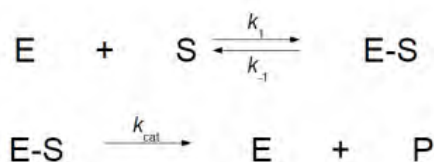


Figura 3.1.1 Representación de una curva que se ajusta al comportamiento del modelo Michaelis-Menten. Figura modificada de Aguilar-Martinez, 2014.



De forma esquemática, al graficar la Velocidad (V_0) en función de la Concentración del Sustrato $[S]$, las cinéticas enzimáticas que se comportan de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten, representan una hipérbola rectangular característica, como se representa en la Figura 3.1.1

Matemáticamente, el desarrollo del modelo se describe de la siguiente manera

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[E-S] + k_{cat}[E-S]$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[E-S]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[E-S]$$

$$\frac{d[E-S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[E-S] - k_{cat}[E-S]$$



Con la finalidad de analizar el comportamiento lineal de la cinética enzimática que se desea representar, puede utilizarse la aproximación del estado estacionario a la especie E-S (al cual puede denominarse ee) como denomina la ecuación siguiente:

$$0 = k_1[E][S] - k_{-1}[E - S]_{ee} - k_{cat}[E - S]_{ee}$$

Posteriormente mediante el despeje de E-S

$$[E - S]_{ee} = \frac{k_1 \cdot [E][S]}{k_{-1} + k_{cat}}$$

y mediante un balance de materia donde se asume que $[E]_{total} = [E] + [E - S]$, para posteriormente reorganizar términos,

nos queda que $[E - S]_{ee} = \frac{[E][S]}{K_M + [S]}$ y por lo cual se define que se utiliza una concentración de sustrato inicial conocida denominada $[S]_0$. De esta manera

$$v_0 = \frac{k_{cat} \cdot [E][S]_0}{K_M + [S]_0}$$

se obtiene la ecuación general de Michaelis-Menten:

En la ecuación anterior, se define v_0 como la velocidad inicial de la reacción; k_{cat} como la constante catalítica (también denominada como tasa de recambio) y K_M como la constante de Michaelis, que tiene unidades de concentración y su valor numérico es igual a la concentración inicial de sustrato en la cual la velocidad inicial de la reacción corresponde a la mitad de la velocidad máxima de la reacción ($V_{max} = k_{cat} \cdot [E]$). (Aguilar Martínez, 2014).



3.2.3.4 Eficiencia catalítica

Al considerar a la constante catalítica de una enzima, (k_{cat}), el cociente que resulta entre el número de ciclos catalíticos (recambios) que realiza el sitio activo en un intervalo de tiempo y la duración del mismo intervalo. (Atkins, 2008) Este parámetro tiene unidades de una constante de primer orden y es numéricamente equivalente a k_b (constante de velocidad para la liberación del producto desde el complejo enzima-sustrato). Se propuso que si se parte de la identificación de k_{cat} utilizando k_b , puede afirmarse

entonces que:

$$k_{cat} = k_b = \frac{v_{mix}}{[E]_0}$$

Considerando lo anterior, se define como eficiencia catalítica (ϵ) a la relación k_{cat} / K_M . **Debe considerarse que cuanto mayor es el valor de (ϵ),** más eficiente resulta la enzima así que algunos autores afirman que puede considerarse a la actividad catalítica como la constante de velocidad efectiva de la reacción enzimática y se considera que

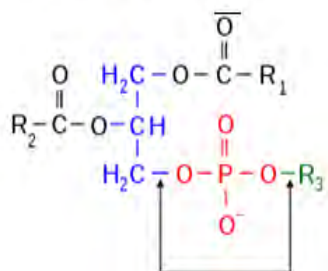
$$\epsilon = \frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_2 k_b}{k_a + k_b}$$

(Atkins, 2008).



3.2.4 Fosfatasa alcalina

Figura 4.1.1 Ejemplo de fórmula genérica orgánica que contiene señalado un grupo fosforilo



Las Fosfatasas alcalinas son una superfamilia de metaloenzimas diméricas. Su función es hidrolizar, en un pH alcalino, los enlaces mono-esteres-orto-fosfóricos, entre el grupo orgánico y el grupo fosforilos. Por lo que reciben en conjunto el nombre de *hidrolasas de monoéster ortofosfórico*.

Entre los sustratos más importantes que las fosfatasas alcalinas hidrolizan se encuentran a los nucleótidos, proteínas y alcaloides. (Mercado-Mercado, 2012) (Millán, 2006).

Su reacción catalítica se da en dos pasos: en el primero de ellos se genera un intermediario covalente de fosfoserina y en el segundo se da un ataque nucleofílico (en medio acuoso) para liberar un fosfato inorgánico y un fosfoester (especie libre) (Coleman, 1992).

Se ha descrito que la superfamilia de Fosfatasas Alcalina, posee cierto grado de *promiscuidad*, ya que resultan capaces de hidrolizar enlaces de tipo fosfomonodiéster así como fosfodiéster, lo cual se presume es consecuencia de las interacciones establecidas entre los residuos de aminoácidos del centro activo y los átomos de oxígeno del grupo fosfato (Zalatan, 2008).

Asimismo, se ha descrito la importancia de los distintos cofactores dependiendo del órgano del cual provenga la enzima (Gugliemi, 2006). Así, el ambiente en cual se encuentre la isoenzima favorece en gran medida la actividad enzimática que desarrolle (Herschlag, 2001).

Las fosfatasas alcalinas provenientes de mamífero (PA_m), poseen una estructura secundaria del sitio activo consistente en dos cadenas de

Figura 4.1.2 Representación de Fosfatasa Alcalina (PA) Imagen modificada cortesía BRENDA





polipéptidos que al plegarse, forma regiones basadas en α -hélices, vueltas β así como espirales aleatorios (Eguchi, 1995). En el caso de las PA de humano, algunas se encuentran como glicoproteínas, puesto que contienen un glicósido asociado, ya sea fructuosa o manosa que pueden llegar a representar un 20% del peso total de la molécula madura (Mercado-Mercado, 2012)

3.2.4.1 Formas múltiples de Fosfatasa Alcalina

La PA posee diferentes formas dentro del organismo de los mamíferos, puesto que son resultado de la expresión de genes distintos tal es el caso de la diferencia de PAm de placenta con respecto a la PAm intestinal, ambas procedentes de distintos *loci* (Gugliemi, 2006). También pueden ser producto de las modificaciones post-traduccionales como resulta el caso de las isoformas ósea, hepática y renal. (Panadero, 1986).

En el caso de los seres humanos, existen cuatro tipos de isoenzimas:

- Isoenzima no específica a tejido (TNSP), misma que posee isoformas de hueso, hígado y riñón (todas codificadas por el cromosoma 1) (Harris, 1989)
- Isoenzima placentaria (PLAP), misma que se encuentra en el suero sanguíneo de las mujeres embarazadas, en la placenta e inclusive en la leche materna (*ibid*)
- Isoenzima de células germinales (denominada GCAP), misma que se encuentra exclusivamente en las células germinales, por lo cual durante la elaboración del presente trabajo no se consideró.
- Isoenzima intestinal (cuyo acrónimo se representa como PLAP), presente en las células epiteliales del intestino. De igual manera, se encuentran codificadas en el segundo cromosoma.



Se ha demostrado que en la mayoría de los tejidos, la PA se encuentra asociada a las membranas celulares con su centro y capacidad catalítica orientados al citoplasma. También en algunas células como los neutrófilos se encuentran en los *fosfosomas* (Panadero, 1986)(Mercado-Mercado, 2012).

En el caso de mamíferos adultos, con una función hepática normal, el 50% de la actividad de PA corresponde a la isoenzima hepática. En crías que se encuentran en periodo de crecimiento el 90% corresponde a la actividad enzimática de PA de hueso (Rosalki, 1984).

Como se mencionó anteriormente, se ha utilizado a la PA como un marcador bioquímico en diversos padecimientos. Por otra parte, se han desarrollado técnicas de Biología Molecular utilizando PAs, como las técnicas inmunohistoquímicas, reacciones de identificación de proteínas (Western blots, por ejemplo) o ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) así como anticuerpos acoplados a otras enzimas. (Harris, 1989)

La PA ha sido objeto de estudio, debido a su uso como parámetro de distintas enfermedades del ser humano, particularmente enfermedades óseas y hepáticas.(Bourne, 1942)

Conforme a lo publicado por (Moss, 1982) existen varias diferencias estructurales en la isoenzima placentaria. Estas pueden inferirse de su termoresistencia, ya que resiste temperaturas de 65°C (Moss, Whitby, 1975). Al igual que las diferencias antigénicas características (McKenna, 1979).

3.2.4.2 Métodos de cuantificación y detección

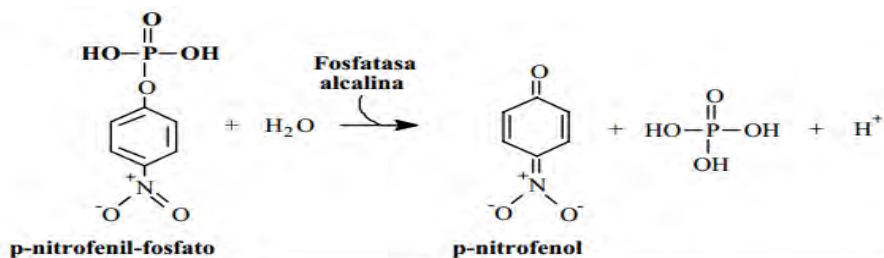
La espectroscopía permite el estudio entre la emisión y absorción de la energía electromagnética con la materia; la característica de la materia más fácilmente apreciable respecto a la absorción de luz es el color. Es por ello, que se aprovecha la propiedad de la absorción de energía por una muestra a



una determinada longitud de onda, misma que depende de las características de la sustancia. (Battaner-Arias, 2013)

La relación entre la cantidad de energía absorbida y la cantidad de materia está establecida por la ley de Lambert-Beer (Logan, 2000) (Battaner-Arias, 2013)

Las fosfatasa, ácidas y alcalinas, pueden cuantificarse de manera colorimétrica utilizando para ello la formación de un compuesto que absorbe a una longitud de onda de 415 nm (Bowers and McComb 1966). Para ello, se utiliza la hidrólisis alcalina del p-nitrofenilfosfato, mediante la siguiente reacción:



Se ha reportado que existe la posibilidad de que puede monitorearse la cinética enzimática de la PA bacteriana presente en el lodos o procesos industriales (Xie,2010) (Bhattacharjee,2004). utilizando dos fuentes distintas de grupos fosfatos, siendo la primera un compuesto que permita la formación del compuesto cromógeno y la segunda un compuesto que libere fosfato inorgánico. En el presente trabajo, se estudió utilizar un segundo compuesto inorgánico con la PA mamífera con la finalidad de estudiar el comportamiento de ésta y comparar los resultados de PA_m con los de PA_b.

La determinación de la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en suero en humanos se emplea en el diagnóstico de diversas enfermedades, particularmente hepáticas y óseas. Cabe destacar que la actividad catalítica de PA en los sueros, es la resultante de la correspondiente a varias



actividades procedentes de distintos tejidos, principalmente isoenzimas hepáticas, óseas, intestinales y placentarias. (Moss, 1975)

3.2.4.3 Importancia de la PA en la leche de vaca

La leche proveniente de la especie bovina siempre ha tenido una especial importancia debido a que se destina al consumo humano (Alais, 1985). Sin embargo, al considerar el origen de las enzimas contenidas en la leche, donde se encuentran células provenientes de las glándulas mamarias o incluso células sanguíneas resulta comprensible que la actividad enzimática de la leche varíe (Fox, 2003). Otro punto importante a considerar es el estado de salud de la vaca, puesto que factores fisiológicos como la lactancia, gestación, dieta, stress y otros factores afectan la concentración enzimática y por ende, la actividad de las enzimas. (Kelly, 2006). En experimentos de nuestro laboratorio, se ha detectado variación en la cantidad de PA presente en distintos sueros de leche por lo cual en el presente trabajo experimental se utilizó suero de leche del mismo ejemplar bovino y se utilizó el mismo lote para todos los experimentos realizados. (Pommeto, 2005)

Por otra parte, se ha documentado que en el caso de trabajar con ejemplares que se encuentren enfermos de mastitis, las concentraciones de distintas enzimas endógenas (destacando entre ellas la PA) se ven modificadas. (Atroschi, 1996).



4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIAL Y REACTIVOS

- Acetona
- Ácido Clorhídrico (HCl) 0.1 N,
- Ácido acético
- Acrilamida 30%
- Albúmina Sérica Bovina (BSA)
- Solución Amortiguadora concentrador pH 8.8
- Solución Amortiguadora de fosfatos de potasio pH 7.2
- Solución Amortiguadora Tris-HCl 0.05 M pH 8.2
- Solución Amortiguadora Tris-HCl 0.05 M pH 7.2
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10%
- Etanol 70%
 - Solución Amortiguadora Glicina (Gly) pHs 9, 9.2, 9.4, 9.6, 9.8, 10, 10.2 10.3, 10.4, 10.5 y 10.6
- Hexametáfosfato de potasio (HMNa)
- p-Nitrofenol $2 \times 10^{-4} \text{M}$
- p-Nitrofenil fosfato $2 \times 10^{-4} \text{M}$
- Leche bronca *B. taurus*
- Persulfato de amonio (AP) 10%
- Reactivo de Bradford
- Sosa (NaOH) 0.25 M
- Suero
- TEMED
- Azul de bromofenol 1%
- Solución Amortiguadora de carga para geles nativos pH 8.3
- Solución Amortiguadora de carga para geles desnaturalizantes pH 8.3



4.2 EQUIPOS Y MATERIAL

- Balanza analítica
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Prepcell ModelEquipo
Biorad
- Espectofotómetro
- Potenciómetro
- Microcentrífuga
- Termo bloque
- Tubos Microcentrífuga
- Micropipetas



1. Aislamiento de PA utilizando suero *Bos taurus*

- i. Se inició con la determinación del volumen de leche bronca de *B.taurus* correspondiente (1700 mL de leche con crema)
- ii. Se procedió a separar la crema, mediante el uso de matraces Kitasato y extracción de vacío y se determinó el volumen de crema (450 mL de crema)
- iii. Se centrifugó la leche bronca, en tubos de 50 mL, utilizando para ello la Centrífuga, 10,000 RPM durante 10 minutos a 4°C, por duplicado
- iv. Se determinó si existía actividad enzimática en la crema.

2. Elaboración de una curva patrón de p-nitrofenol

Utilizando como modelo la tabla que se muestra a continuación, denominada Tabla A, se procedió a preparar los tubos correspondientes, añadiendo a cada tubo, la cantidad correspondiente de reactivo.

Reactivos	Blanco	1	2	3	4	5	6
p-nitrofenol 2×10^{-4} M (μ L)	0	50	100	150	200	250	300
H ₂ O (μ L)	500	450	400	350	300	250	200
Glicina pH 10 (μ L) 0.06 M	250	250	250	250	250	250	250
NaOH 0.25 M (μ L)	750	750	750	750	750	750	750

Tabla A Elaboración de una curva patrón de p nitrofenol

- a. Utilizando un espectrofotómetro UV-Visible, con la λ de 415 nm, determinar las Absorbancias de cada uno de los puntos
- b. Relacionar gráficamente la Absorbancia, en función de la Concentración Conocida de p-nitrofenol
- c. Utilizar un modelo matemático lineal para determinar los parámetros (donde y representa la Absorbancia determinada, b resulta la Absorbancia de la curva patrón, m alude a la pendiente calculada y finalmente x representa la concentración de p-nitrofenol formado)



3. Determinación de la actividad enzimática

1. Con base a lo reportado anteriormente en el Laboratorio, con la finalidad de observar si existe actividad enzimática, se utilizó la Tabla B para preparar en tubos de 13x150 respetando los tiempos de incubación antes y después de agregar la enzima
2. Se procedió a leer las Absorbencias en la λ de 415 nm

Tabla B Determinación de la actividad enzimática

Tubos	Blanco	1	2	3
p-nitrofenil fosfato (μL)	250	250	250	250
H ₂ O (μL)	210	210	210	210
Glicina 0.06 M pH 10 (μL)	250	250	250	250
PREINCUBAR A 37 °C 2 MIN				
Enzima (μL)	-	30	30	30
INCUBAR A 37 °C				
Tiempo (min)	20	20	20	20
NaOH 0.25 M (μL)	750	750	750	750
Enzima (μL)	40	-	-	-

4. Obtención del suero de leche bronca

- a) Una vez descremada la leche bronca, se agregaron 3 gotas de renina, con la finalidad de separar las proteínas en dos grandes grupos: la caseína (misma que se condensa y forma queso) y aquellas que se encuentran disueltas en el suero de leche. El proceso anterior debe llevarse a cabo en un baño térmico a temperatura constante de 37°C.
- b) Remover suavemente y observar la formación del queso, separarlo y filtrar.
- c) Almacenar en frascos el suero obtenido y añadir 0.5% m/m de Azida de Sodio
- d) Tomar muestras del suero de los distintos filtrados y etiquetar
- e) Determinar la actividad enzimática del suero de leche, utilizando la Tabla B como modelo



4.1 Extracción de PA de la crema mediante butanol

- a) Para determinar si existía PA_m en la crema de la leche bronca, se procedió a centrifugar (10,000 RPM) nuevamente el suero de leche preservado (4°C durante dos ciclos de 5 minutos)
- b) Se aisló la crema y se resuspendió con 10 mL de la mezcla de Butanol/Etanol (70:30)
- c) Se homogeneizó con ayuda del vórtex con pulsos de 10 segundos
- d) Se cuantificó la actividad del extracto de crema con base a la tabla B

5. Cuantificación de la proteína mediante la técnica de Bradford

- 1) Primero, debe realizarse una curva patrón para la cuantificación de proteínas en tubos Microcentrifuga, agitando en el vórtex. Para ello, utilizar como base la **tabla C**.

TUBO	BLANCO	1	2	3	4	5	6
Agua (µL)	800	790	770	760	740	720	700
BSA (µL)	0	10	30	40	60	80	100
Reactivo de Bradford (µL)	200	200	200	200	200	200	200

Tabla C Elaboración de una curva patrón para la técnica de Bradford

- 2) Leer las Absorbencias a una longitud de 595 nm
- 3) Construir una curva patrón, utilizando el modelo de mínimos cuadrados
- 4) Determinar las proteínas que se encuentran en los distintos procesos de muestreo (sueros denominados 1, 2, 3, 4) del suero de leche bronca de *Bos taurus*, considerando la Tabla ΔT

TABLA Δ ELABORACIÓN DE TÉCNICA DE BRADFORD

Agua (µL)	Reactivo de Bradford (µL)	Muestra o Dilución* (µL)
795	200	5

- 5) Leer las Absorbencias a una longitud de 595 nm
- 6) Repetir esta técnica 2 veces, obtener promedios y DE

6. Cuantificación de la proteína mediante la técnica de Lowry

- a) Construcción de la curva patrón



1. Utilizar como guía la tabla λ , preparar los tubos para la curva patrón, considerando que la muestra corresponde al suero de leche utilizado el Reactivo A corresponde a la disolución de partes iguales de CTC, 10% SDS, 0.8 N NaOH y H₂O destilada y el Reactivo B

TABLA λ ELABORACIÓN DE TÉCNICA DE LOWRY .Tabla Cortesía del Manual para Bioquímica Experimental Castellanos 2010

Tubo	H ₂ O	BSA (1mg/mL)	Reactivo A	Reactivo B
1	450 μ L	—	500 μ L	250 μ L
2	445 μ L	5 μ L	500 μ L	250 μ L
3	440 μ L	10 μ L	500 μ L	250 μ L
4	435 μ L	15 μ L	500 μ L	250 μ L
5	430 μ L	20 μ L	500 μ L	250 μ L
6	425 μ L	25 μ L	500 μ L	250 μ L
7	420 μ L	30 μ L	500 μ L	250 μ L
8	415 μ L	35 μ L	500 μ L	250 μ L
Tubo	H ₂ O	Muestra	Reactivo A	Reactivo B
9	425 μ L	25 μ L	500 μ L	250 μ L
10	400 μ L	50 μ L	500 μ L	250 μ L

Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos

2. Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos.
3. Encender el espectrofotómetro y seleccionar la de 750 nm.
4. Colocar la mezcla en cada celda, utilizar siempre sólo una celda y leer en orden creciente de concentración
5. Ajustar el espectrofotómetro con la disolución del primer tubo de la tabla (tubo blanco).
6. Construir la gráfica de Absorbencia vs. Cantidad de proteína (g).
7. Con los datos de regresión lineal y la alícuota de proteína añadida al ensayo, calcular la concentración de la proteína en la muestra (g/ L o mg/mL).



7.1 Elaboración de geles SDS-PAGE

a) Para elaborar un gel de Poliacrilamida al 12%, debe considerarse la tabla **ε** que se muestra a continuación

TABLA ε ELABORACIÓN DE GELES DE SDS-PAGE

GEL	REACTIVO	CANTIDAD
GEL CONCENTRADOR: 4%	Agua destilada	900 µL
	Acrilamida:Bisacrilamida 30%:0.8%	199.5 µL
	Trizma*HCl 0.5 M pH 6.8	375 µL
	SDS 10%	15 µL
	TEMED 10%	1.5 µL
	Persulfato de amonio 10% m/v	7.5 µL
GEL SEPARADOR: 12%	Agua destilada	1.32 mL
	Acrilamida:Bisacrilamida 30%:0.8%	1.6 mL
	Trizma*HCl 2M pH 8.8	1.0 mL
	SDS 10%	40 µL
	TEMED 10%	2 µL
	Persulfato de amonio 10% m/v	25 µL

b) Montar los geles en la cámara de electroforesis y cubrir con Solución Amortiguadora de corrida 1X

c) Preparar el equivalente a 25 µg de proteína de cada fracción con 6 µL de Solución Amortiguadora muestra 5X y completando un volumen máximo de 30 µL con agua destilada. (Para ello debe utilizarse el cálculo de la proteína según lo mostrado en la técnica de Bradford)



- d) Calentar cada muestra identificada 95 °C por 5 minutos, en el termobloque, con la finalidad de desnaturalizar la proteína y con base al esquema deseado (mismo que debe documentarse) cargar las muestras en el gel
- e) Conectar la cámara de los geles a la corriente eléctrica, aplicando 80 mV durante hora y media, y asegurarse que la energía eléctrica se distribuya uniformemente en el gel (observar corrimiento de cada pozo)
- f) Desmontar el gel y enjuagar el gel con agua del grifo
- g) Dejar aproximadamente 5 minutos en agua destilada, con la finalidad de eliminar perfectamente el SDS del gel de corrida
- h) Sumergir el gel en una solución de β -Ciclodextrina 0.3% m/v y Coomassie 0.15% m/v en CH₃COOH 7% v/v por 2 minutos
- i) Enjuagar y desteñir hasta observar bandas diferenciadas
- j) Escanear el gel y analizar los resultados

7.2 Elaboración de geles nativos

Para elaborar un gel de Poliacrilamida al 12%, debe considerarse la tabla D

TABLA D ELABORACIÓN DE GELES NATIVOS

Gel	Reactivo	Cantidad
Gel Concentrador: 4%	Agua destilada	900 μ L
	Acrilamida: Bisacrilamida 30%:0.8%	199.5 μ L
	Trizma*HCl 0.5 M pH 6.8	375 μ L
	TEMED 10%	1.5 μ L
	Persulfato de amonio 10% m/v	7.5 μ L
Gel separador: 12%	Agua destilada	
	Acrilamida: Bisacrilamida 30%:0.8%	1.6 mL
	Trizma*HCl 2M pH 8.8	1.0 mL
	TEMED 10%	2 μ L
	Persulfato de amonio 10% m/v	25 μ L
	p-nitrofenil fosfato de sodio[2×10^{-2} M]	40 μ L



- b) Montar los geles en la cámara de electroforesis y cubrir con Solución Amortiguadora de corrida 1X
- c) Preparar el equivalente a 25 µg de proteína de cada fracción con 6 µL de Solución Amortiguadora muestra 5X y completando un volumen máximo de 30 µL con agua destilada.
- d) Para revelar la PA_m añadir 900 µL de pnnf 2x10⁻³ M y 300 µL de amortiguador Gly 10 directamente sobre el carril de la muestra. En caso de que presente actividad enzimática, se apreciarán en el gel bandas amarillas correspondientes.

8. Efecto del pH

Con base a la metodología que se ha desarrollado en el Laboratorio 307 (Castellanos-Román, 2013), y los datos que fueron reportados previamente en el Informe de Servicio Social (Luna-Laviada 2015) y considerando la Tabla E, se procedió a la preparación de los tubos de ensayo de 13x150

Tubos	Blanco*			GLICINA				TRIS			CARBONATOS			
				9	9.6	10	10.4	7	8	9	10.4	10.8	11.5	
p-nitrofenil fosfato (µL)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
H ₂ O (µL)	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220
Solución Amortiguadora (µL)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
PREINCUBAR A 37 °C 2 MIN														
Enzima (µL)	-	-	-	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
INCUBAR A 37 °C 5 minutos														
NaOH 0.25 M (µL)	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Enzima (µL)	30	30	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA E Efecto del pH

- a) Para leer los tubos y minimizar el efecto de interferencia iónica, los tubos deben leerse con diferentes blancos*. Por ello debe considerarse que los tubos de Glicina, debe utilizarse el blanco elaborado con la Solución Amortiguadora de glicina pH 9; para leer los tubos de TRIS, debe utilizarse un blanco que contiene la Solución Amortiguadora TRIS pH 7; mientras que para leer los tubos preparados con Carbonatos, debe prepararse la Solución Amortiguadora de Carbonatos pH 10.4



- b) Todas las lecturas de Absorbencia deben llevarse a cabo en el mismo espectro, con la longitud de onda de 415 nm
- c) Construir la gráfica

8.1 Determinación del pH óptimo usando la misma solución amortiguadora con gradiente de pH

- a) Utilizar la tabla E para la preparación de distintos tubos de 13x150
- b) Repetir el experimento 3 veces para cada tubo

pH	9.0	9.0	9.2	9.4	9.6	9.8	10	10.2	10.3	10.4	10.5
Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
p-nitrofenil fosfato $2 \times 10^{-3} M$ (μL)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Agua destilada (μL)	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210	210
Buffer (μL) Gly	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Preincubar a 37°C 2 minutos											
Enzima (μL)	0	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Incubar a 37°C											
NaOH 0.25 M (μL)	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Enzima (μL)	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla F Determinación del pH óptimo usando la misma solución amortiguadora con gradiente de pH

9. Determinación de PA_m y PA_b

- i) En un tubo de microcentrífuga, cargar 500 μL de Suero de leche bronca de *Bos taurus*, el cual será el control, denominado (EN), colocarlo en hielo
- ii) En un tubo de microcentrífuga, cargar 500 μL de Suero de leche bronca de *Bos taurus*, para someterlo al tratamiento térmico, denominado (88°C)
- iii) Utilizando el Termobloque, calentar el Tubo de microcentrífuga a 88°C durante 2 minutos



- iv) Homogenizar el suero del tubo de microcentrífuga en el vórtex durante 10 segundos
- v) Colocar el tubo de microcentrífuga en hielo, para posterior uso
- vi) Con base a la Tabla G, preparar tubos de 13 x150
- i) Deben prepararse los tubos utilizando ambas enzimas, (EN) y (88°C)
- ii) Todas las lecturas de Absorbencia deben llevarse a cabo en el mismo

Tubo	B	REP1	REP2	REP3
p-nitrofenil fosfato $2 \times 10^{-3}M$ (μL)	250	250	250	250
Agua destilada (μL)	210	210	210	210
Buffer (μL) Gly	250	250	250	250
Preincubar a 37°C 2 minutos				
Enzima (μL)	0	40	40	40
Incubar a 37°C				
NaOH 0.25 M (μL)	750	750	750	750
Enzima (μL)	40	0	0	0

- iii) Construir la gráfica **TABLA G Determinación de PA_m y PA_b**
- iv) Con base a la curva patrón construida y el método de regresión lineal, calcular la actividad enzimática de cada enzima

En caso de que exista PA_b, deberá haber una disminución dramática en la actividad enzimática, puesto que la PA_b residual no resiste altas temperaturas

9.0 Determinación del efecto de la concentración del sustrato

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9
p-nitrofenil fosfato $2 \times 10^{-3}M$ (μL)	0	50	75	100	150	200	250	300	400	450
Agua destilada (μL)	510	460	435	410	360	310	260	210	110	60
Buffer (μL) Gly	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Preincubar a 37°C 2 minutos										
Enzima (μL)	0	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Incubar a 37°C										
NaOH 0.25 M (μL)	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Enzima (μL)	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla H Determinación del efecto de la concentración del sustrato



- a) Para elaborar el ensayo enzimático de la PAm presente en el suero de leche bronca de *Bos taurus*, puede utilizarse la **tabla H**, considerando que la Enzima refiere al suero de leche de vaca.
- c) Todas las lecturas de Absorbencia deben llevarse a cabo en el mismo espectro, con la longitud de onda de 415 nm
- d) Repetir cada ensayo 3 y obtener el promedio correspondiente
- e) Construir la gráfica
- f) Con base a la curva patrón construida y el método de regresión lineal, calcular la actividad enzimática de cada enzima
- g) Graficar 1/V en función de 1/C de p-nitrofenil fosfato.
- h) Generar una línea de tendencia y extrapolar en 15,000 unidades

10 Determinación del efecto de un inhibidor en función de la concentración de sustrato

- **Construcción de la tabla general para 1° Concentración de Inhibidor**
- Puede utilizarse la **tabla I**, considerando que el primer inhibidor será [50 mM] de Molibdato de Sodio

TABLA I. Determinación del efecto del Inhibidor (1° Concentración)

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9
p-nitrofenil fosfato 2×10^{-3} M (µL)	0	50	75	100	150	200	250	300	400	450
Agua destilada (µL)	460	410	385	360	310	260	210	160	60	10
Buffer (µL) Gly	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Inhibidor (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Preincubar a 37°C 2 minutos										
Enzima (µL)	0	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Incubar a 37°C										
NaOH 0.25 M (µL)	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Enzima (µL)	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0



- a) Todas las lecturas de Absorbencia deben llevarse a cabo en el mismo espectro, con la longitud de onda de 415 nm
- b) Repetir cada ensayo 3 y obtener el promedio correspondiente
- c) Construir la gráfica
- d) Con base a la curva patrón construida y el método de regresión lineal, calcular la actividad enzimática de cada enzima
- e) Graficar 1/V en función de 1/C de p-nitrofenil fosfato.
- f) Generar una línea de tendencia y extrapolar en 15,000 unidades
- g) Observar el comportamiento de cada curva de inhibición y compararlo con respecto al comportamiento reportado previamente acerca de la concentración de sustrato.

Construcción de la tabla general para el 2° Inhibidor

1. Después de considerar el efecto de la primer concentración de inhibidor y con la finalidad de observar el estudio de una segunda concentración de inhibidor, debe considerarse que para determinar el efecto de la 2 puede utilizarse la **tabla J**, considerando que el inhibidor será [30 mM] de Molibdato de Sodio

Tabla J Determinación del Efecto del Inhibidor (2° Concentración)

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9
p-nitrofenil fosfato 2×10^{-3} M (µL)	0	50	75	100	150	200	250	300	400	450
Agua destilada (µL)	460	410	385	360	310	260	210	160	60	10
Buffer (µL) Gly	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Inhibidor (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Preincubar a 37°C 2 minutos										
Enzima (µL)	0	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Incubar a 37°C										
NaOH 0.25 M (µL)	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Enzima (µL)	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**11 Evaluación de PA_m utilizando fuente alternativa de Fosfato Inorgánico**

Para el presente experimento se utilizarán tres juegos de tubos:

El primer juego de tubos se le denomina **pnnf** ya exclusivamente utiliza p-nitrofenil fosfato de sodio [2×10^{-3} M], para lo cual se elabora con la Tabla H que se describió anteriormente, misma que es modificada de la metodología propuesta por Castellanos-Román 2010.

El segundo juego de tubos se confecciona utilizando como modelo la Tabla K, y se denominará **PO_{4s}**, ya que utiliza Hexametáfosfato de Sodio(HMNa)[1×10^{-3} M] mientras que el tercer juego de tubos igual que p-nitrofenil fosfato de sodio (pnnf) [1×10^{-3} M]

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pnnf + HMPNax10-3 M (μL)	0	50	75	100	150	200	250	300	400	450
Agua destilada (μL)	510	460	435	410	360	310	260	210	110	60
Buffer (μL) Gly	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Preincubar a 37°C 2 minutos										
Enzima (μL)	0	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Incubar a 37°C										
NaOH 0.25 M (μL)	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Enzima (μL)	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla K Evaluación de PA_m utilizando fuente Alternativa de Fosfato Inorgánico

a) El Tercer juego de tubos será pnnf 0.001M puesto que se construye utilizando como modelo la Tabla J

b) Todas las lecturas de Absorbencia deben llevarse a cabo en el mismo espectro, con la longitud de onda de 415 nm



- c) En caso que la Enzima PA_m posea actividad enzimática sobre la fuente alternativa de Fosfatos (HMNa), se observará la generación del cromógeno, y con base a la determinación del tubo (mismo que debe observarse a simple vista, distinto del blanco)
- d) Repetir cada ensayo 3 y obtener el promedio correspondiente
- e) Construir la gráfica
- f) Con base a la curva patrón construida y el método de regresión lineal, calcular la actividad enzimática de cada enzima.

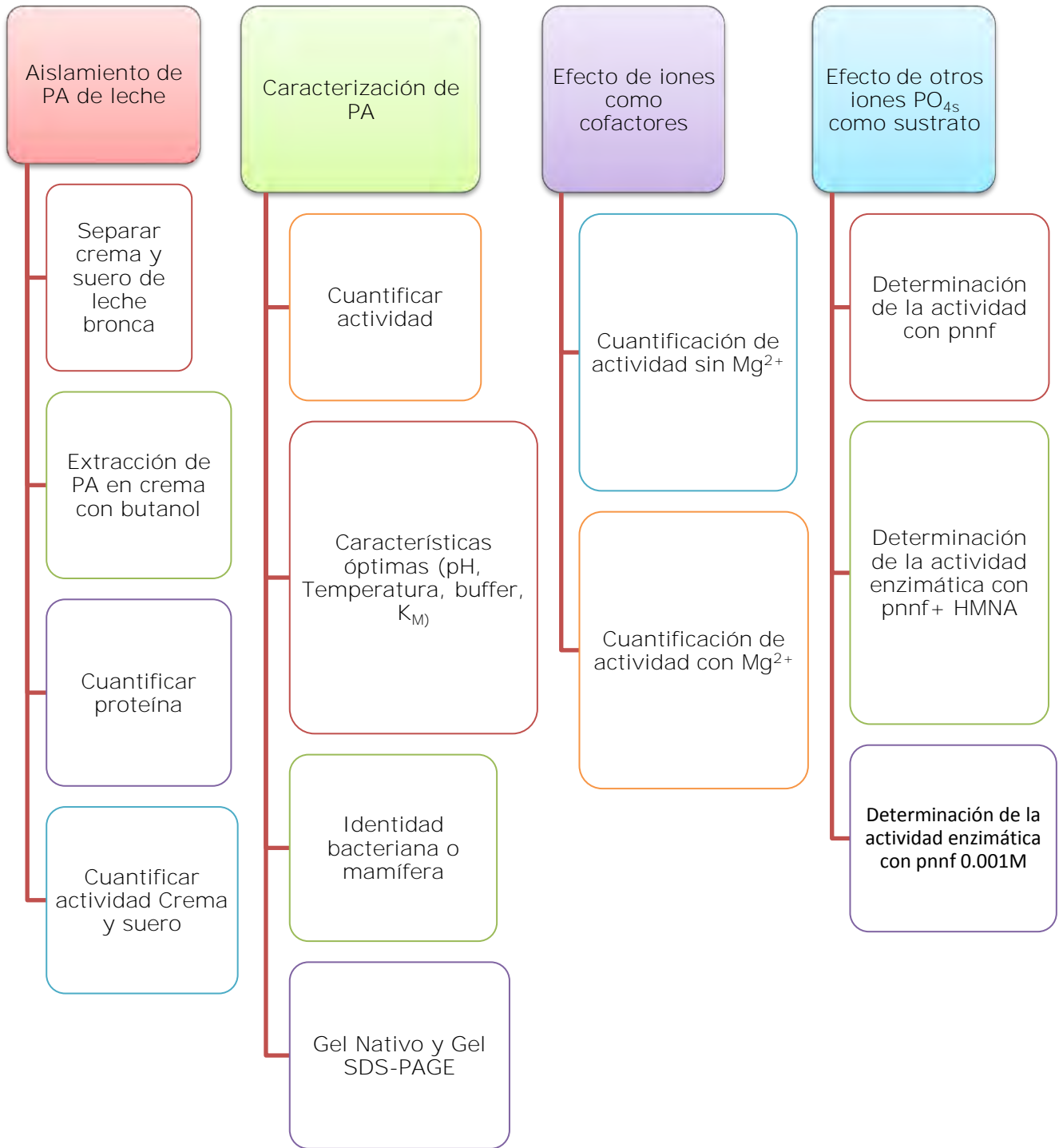


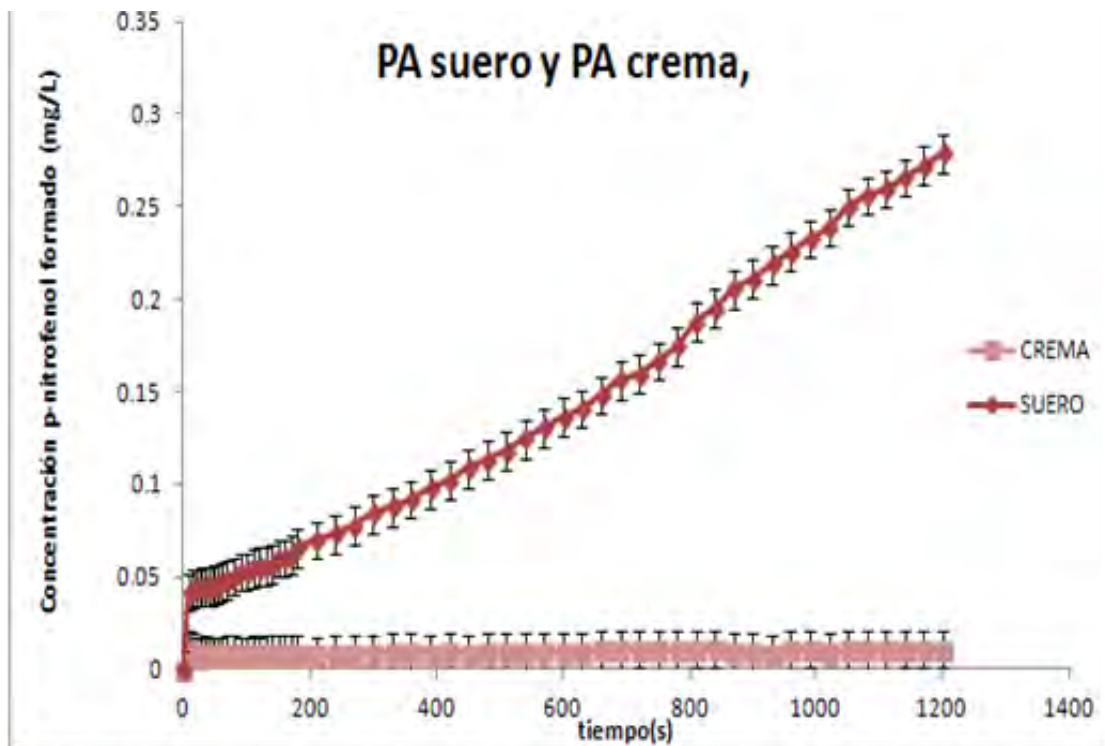
DIAGRAMA DE FLUJO



5. Resultados y discusión

5.1 Aislamiento de PA_m a partir de leche bronca de *B. taurus*

En el presente desarrollo experimental se inició con $V_i = 2700$ mL de la leche bronca y se obtuvo un $V_s = 2200$ mL, así como un $V_c = 350$ mL de crema. Se midió la actividad enzimática del suero obtenido, utilizando la metodología señalada en las páginas 25 y 26, y se observó que sí resulta factible aislar la enzima Fosfatasa Alcalina (PA) a partir del suero de la leche bronca de *Bos taurus*. Lo cual resulta interesante, puesto que en la literatura se menciona que las pruebas de PA deben realizarse en presencia de los productos lácteos obtenidos a partir de la crema, en lugar de trabajar con el suero de leche. (Kelly and Fox 2006) (Murthy 1979). Se buscó actividad enzimática de PA presente en la crema sobrenadante de la leche bronca bovina, para comparar el método de aislamiento de PA a partir del suero bovino, reportando las actividades de crema y suero en la Gráfica 1.



Gráfica 1 Comparación entre la Concentración de p-nitrofenol formado a partir de p-nitrofenil fosfato mediante las enzimas aisladas a partir de suero y crema de leche bronca de *Bos taurus*

En la gráfica superior se muestran los resultados promedios de 3 experimentos independientes $\pm ES$ $n=3$ donde se compara la actividad enzimática del suero y la de la crema



A partir de dicha comparación, se encontró que **Sí** existía una diferencia significativa entre la actividad que presentaba la PA del suero de leche comparada con la actividad de la PA encontrada de crema de la leche, por lo cual se continuó trabajando con la PA del suero de leche.

También se purificó PA de la crema, usando Butanol/Etanol (70:30), conforme la metodología de DellaMonica (Zittle, 1952) y durante la determinación para cuantificar la cantidad de p-nitrofenol formado, se observó que la actividad enzimática propia de la crema era significativamente menor comparada con la actividad enzimática del suero, por lo cual se descartó el uso de crema y se utilizó exclusivamente el suero.

Al confirmar la presencia de PA en el suero de leche, se realizó la cuantificación de proteína total con la Técnica de Cuantificación de Bradford, donde se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 5.1.

Tabla 5.1 Comparación de la Concentración de proteínas en distintas muestras del suero de leche de *Bos taurus* utilizando la técnica de Bradford. En la tabla inferior se aprecia la cuantificación de proteínas totales de Bradford, resultados de 2 experimentos independientes \pm E.S. n=2 de distintas muestras del mismo lote de suero de leche

TUBO	Abs(1 μ l de Fracción 1:10)	CONCENTRACIÓN (μ g/ μ l)
A	0.222	25.1163
B	0.253	28.9106
C	0.261	29.8898
D	0.25	28.543

En la Tabla 5.1 se aprecia que la concentración total de proteínas permaneció constante en el mismo lote del suero conservado con azida de sodio, ya que los resultados obtenidos resultan similares entre sí. Lo anterior se realizó puesto que se dividió el lote del suero en distintos volúmenes para utilizarlos en el Laboratorio de Bioquímica Experimental



Para corroborar los resultados acerca de la determinación total de proteínas, se utilizó la Técnica de Cuantificación de Lowry, y se construyó la tabla 5.2. Donde puede observarse que las concentraciones totales de proteínas de los distintos volúmenes corresponden entre sí.

Tabla 5.2 Comparación de la Concentración de proteínas en distintas muestras del suero de leche de *Bos taurus* utilizando la técnica de Lowry. En la tabla inferior se aprecia la cuantificación de proteínas totales de Lowry, resultados de 2 experimentos independientes \pm E.S. n=2 de distintas muestras del mismo lote de suero de leche

FRACCION	CLAVE	CONCENTRACION
2014-1	A	24.2202
2014-2	B	30.0292
2014-3	C	33.0265
2014-4	D	31.7268

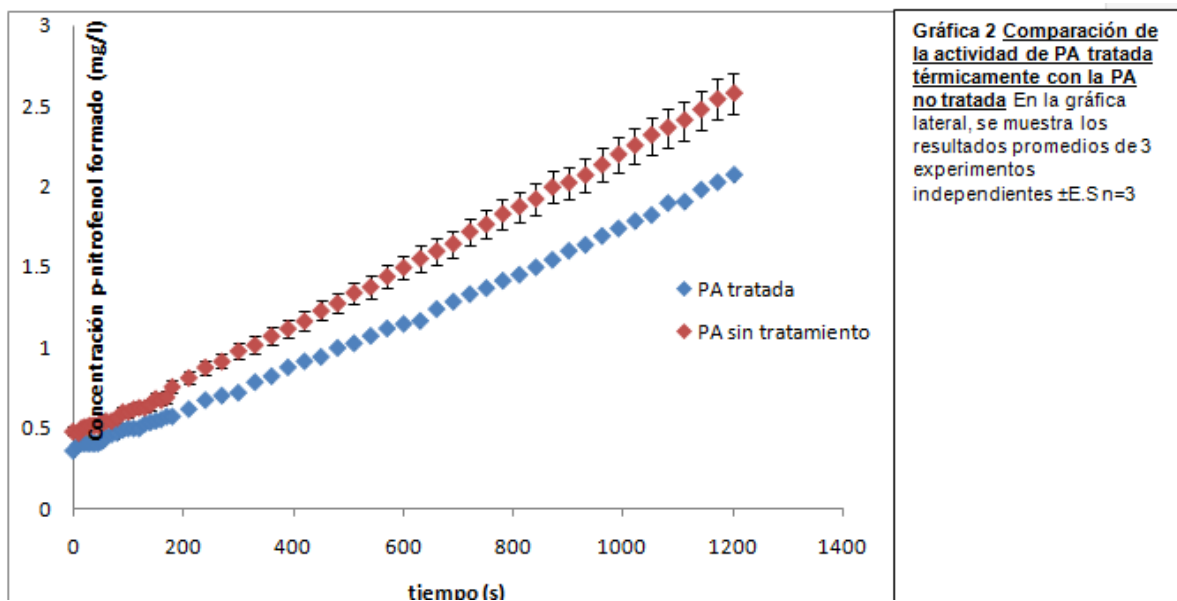
Al comparar las tablas 5.1 y 5.2 se observa que los resultados reportados son similares entre sí, lo cual permite inferir que la concentración de proteínas totales en el suero de leche resulta homogénea.

5.2 Caracterización de la Enzima PA

Durante el desarrollo experimental de la presente tesis se caracterizó la identidad de la PA, mediante el uso de temperaturas extremas, de acuerdo con lo propuesta en la metodología, basada en la metodología propuesta por (Kleyn, 1977), con la finalidad de determinar si la enzima que se aisló a partir del suero de leche bronca de *B. taurus* correspondía a PA mamífera o PA bacteriana. Por lo tanto, se realizaron determinaciones de la actividad enzimática posteriores a los tratamientos de temperaturas extremas y reactivación térmica, presentadas en la Gráfica 2.



Se consideró que en caso de que se tratase de PA_b, al someterse a la temperatura propuesta por Kley, la enzima se inactivaría y por lo tanto no se produciría ninguna reacción catalizada y en caso de que se tratase de PA_m, existiría actividad enzimática y se produciría p-nitrofenol. Al igual que la NOM-184-SSA1-2002, se analizó la actividad de fosfatasa residual en leche. Por lo tanto, se realizaron determinaciones de la actividad enzimática posteriores a los tratamientos de temperaturas extremas y reactivación térmica, mismas que se muestran en la Gráfica 2, donde pueden observarse las actividades enzimáticas de las muestra sin tratar y la muestra tratada con temperaturas extremas son similares entre sí.



De igual forma, una vez realizada la prueba estadística t-student se confirmó que no existía una diferencia significativa entre el comportamiento de la enzima tratada térmicamente y la PA sin tratamiento, lo cual indica que la PA aislada del suero de leche bronca de *B.taurus*, corresponde en su totalidad a PA proveniente de mamífero, puesto que las concentraciones de p-nitrofenol formadas por la muestra tratada térmicamente resultaron similares a las concentraciones obtenidas por la muestra sin tratar. Al mismo



tiempo, se comprobó con ello la resistencia de la PA_m y se descartó la presencia de PA_b.

De igual manera, se procedió a realizar un gel SDS-PAGE, mismo que se muestra en la figura α , donde se muestra el suero de la leche, denominado (EN) y los Marcadores de Peso Molecular.



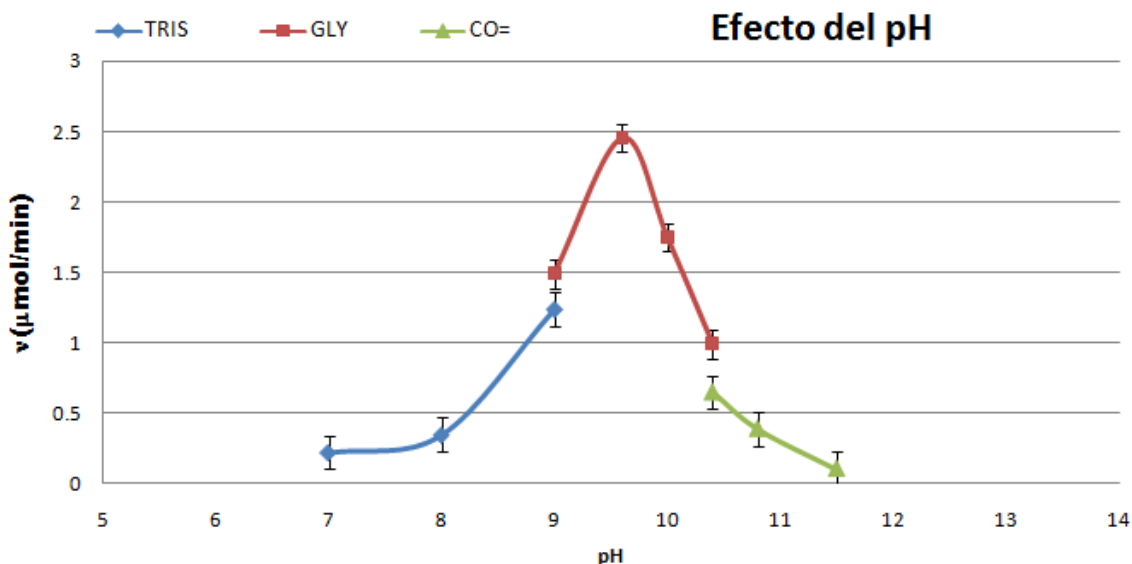
Figura α Gel SDS-PAGE 1. En la figura superior, se muestra un Gel SDS donde se incluye el suero de leche (EN) (carril izquierdo) y Marcadores de Peso Molecular (MP) (carril derecho). Así como el Peso Molecular de PA reportado por Millán (2006).

En el mismo, se incluyó un rectángulo sobre la banda que se estima corresponde a la subunidad de PA_m, conforme a Millán (2006). Asimismo, de acuerdo con Kelly (2006) se estima que la última banda del carril correspondería a la β lactoglobulina, cuyo peso molecular corresponde a 19 kDa, lo que resulta lógico puesto que ésta es la proteína más abundante en el suero de la leche de *Bos taurus*. Sin embargo, al considerar que su Peso



Molecular difiere tanto de PA, no interfiere con la metodología y aunque podrían realizarse otras técnicas de purificación posteriormente, se consideró que para de los protocolos para la enseñanza de Bioquímica Experimental no resulta perjudicial.

Por otra parte, con la finalidad de caracterizar mediante sus pH óptimo a las PA_m que se encontraba en el suero de leche, se realizó la metodología correspondiente a las páginas 29 y 30 y se construyeron las gráficas 3 y 4.

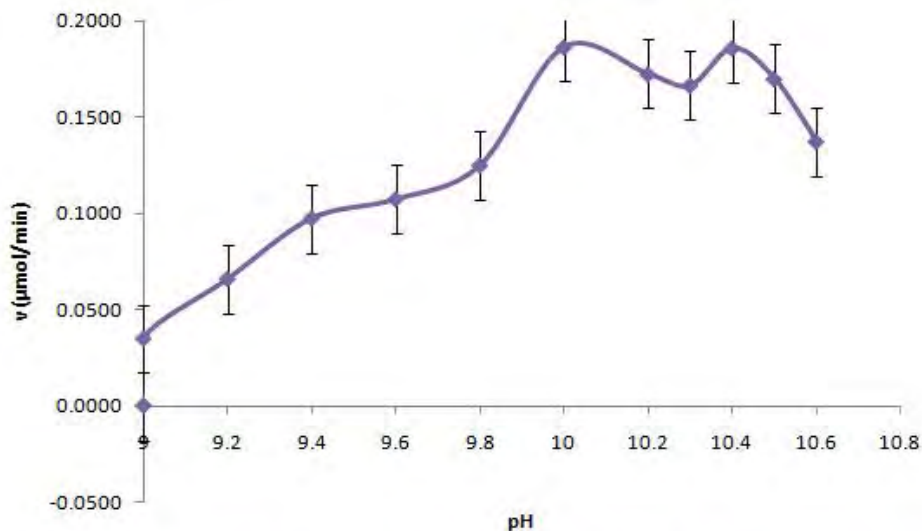


Gráfica 3 Comparación entre la velocidad enzimática de las muestras de PA utilizando diferentes soluciones amortiguadoras. En la gráfica superior se muestran resultados promedio de 4 experimentos independientes \pm E.S n=4

En la gráfica 3 se aprecia el efecto del pH en la actividad enzimática de la PA_m obtenida a partir de suero, y cabe destacar que la mayor velocidad enzimática se alcanza mediante el uso de la Solución Amortiguadora de Glicina, lo cual resulta diferente a la solución de la literatura, ya que el método de referencia de cuantificado reportado por (Bowers y McComb, 1966) propone utilizar TRIS o bien los trabajos de purificación de PA_m, realizados por Cathala *et al*(1975) quienes proponen utilizar Solución Amortiguadora de Carbonatos como amortiguador.



Una vez determinado la Solución Amortiguadora adecuado y con la finalidad de caracterizar con mayor precisión el pH óptimo para la PA_m, de acuerdo con la metodología de la página 30, se realizaron ensayos utilizando un gradiente de pH considerando el efecto de la fuerza iónica, reportado por Zhao (2005) en los ensayos enzimáticos, mismos que se reportan en la Gráfica 4. Se utilizó una solución amortiguadora con la misma concentración de Glicina, con un aumento gradual de pH=0.2, utilizando como marco de referencia los resultados que se muestran en la gráfica 3.



Gráfica 4 Comparación entre velocidades de PA_m en un gradiente de pH, utilizando la misma solución amortiguadora En la gráfica superior se muestran los resultados promedios de 2 experimentos independientes \pm E.S. n=2 donde se busca determinar el pH óptimo para la PA

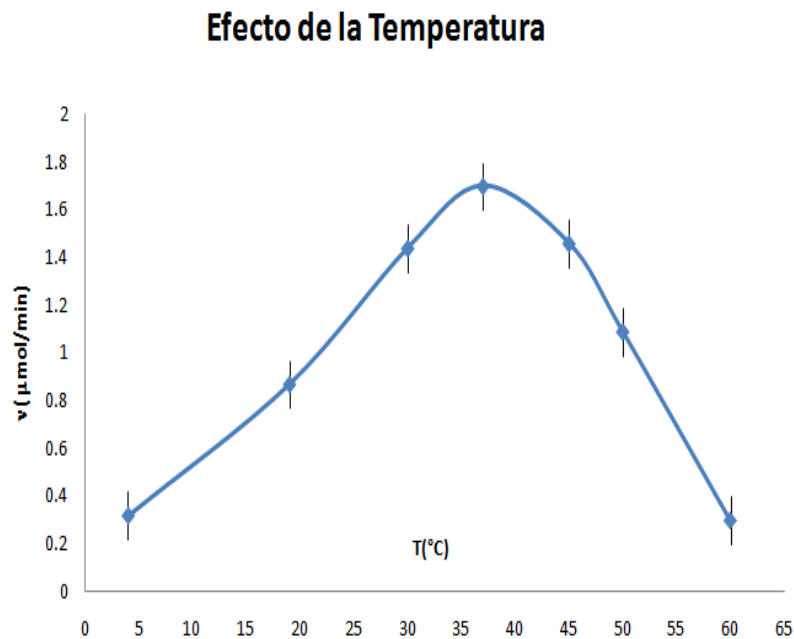
Al analizar la gráfica 4, destaca que existen dos velocidades máximas alcanzadas en dos puntos diferentes de pH: tanto en pH=10.0 como en el pH=10.4, lo cual podría indicar que pueden existir varias isoenzimas presentes en el suero de leche, corroborando lo reportado por Millán (2006).

5.3 Cinética Enzimática de PA_m obtenida a partir de suero de leche bronca de *B. taurus*

Con base a los datos obtenidos en el Laboratorio de Bioquímica Experimental, así como lo que ha sido reportado por BRENDA, se eligió



trabajar con una temperatura óptima de 37°C (es decir 310.15 K). (Castellanos-Román, 2010) considerando la gráfica 7, obtenida previamente en el Laboratorio de Bioquímica Experimental. Asimismo, se calculó la Energía de Activación $E_a = 46799.5318$ Joules.



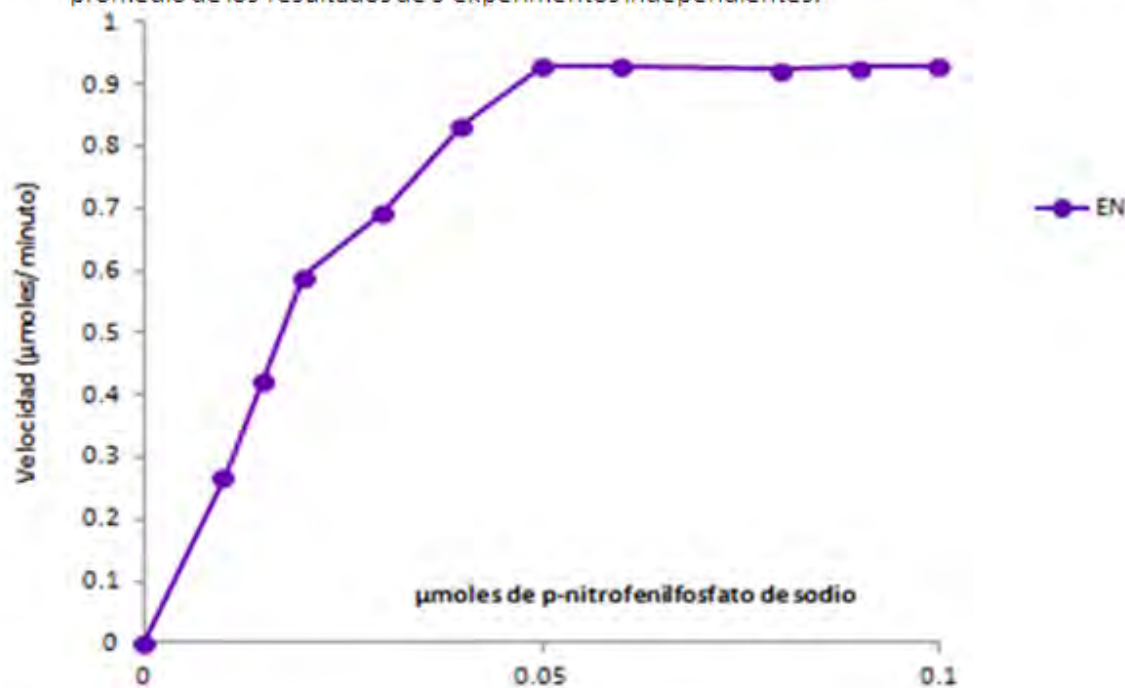
Gráfica 5 Efecto de la Temperatura de incubación en PAm En la gráfica superior se muestra el promedio de 3 experimentos independientes \pm E.S n=3

Con la finalidad de analizar el comportamiento de la enzima PA_m aislada de suero de leche, se procedió a evaluar el efecto de la concentración de sustrato, mismo que se muestra en la gráfica 6, y comparar su comportamiento con el modelo de Michaelis-Menten, así como la evaluación del comportamiento de la curva comparándolo con el algoritmo de Regresión no lineal por mínimos cuadrados aplicada a la cinética de Michaelis y Menten, propuesto por la Universidad de Alabama en Hunstville, quien establece como parámetro que el comportamiento de la cinética puede considerarse Michaeliano si el valor obtenido resulta similar a 1. Y al momento de introducir los datos al programa del algoritmo, puede confirmarse que la PA_m



de suero de leche sí se comporta conforme al modelo michaeliano, puesto que se obtiene el resultado de 0.9815.

Gráfica 6. Efecto de la Concentración de Sustrato en PA_m En la gráfica inferior se muestran el promedio de los resultados de 3 experimentos independientes.



Al observar la gráfica 6, puede confirmarse que la enzima PA_m posee un comportamiento que puede ajustarse al modelo de Michaelis-Menten. Al calcular los parámetros obtenidos con la curva de PA_m , se construyó la Tabla 5.3.1

Tabla 5.3.1 Parámetros experimentales obtenidos para PA_m

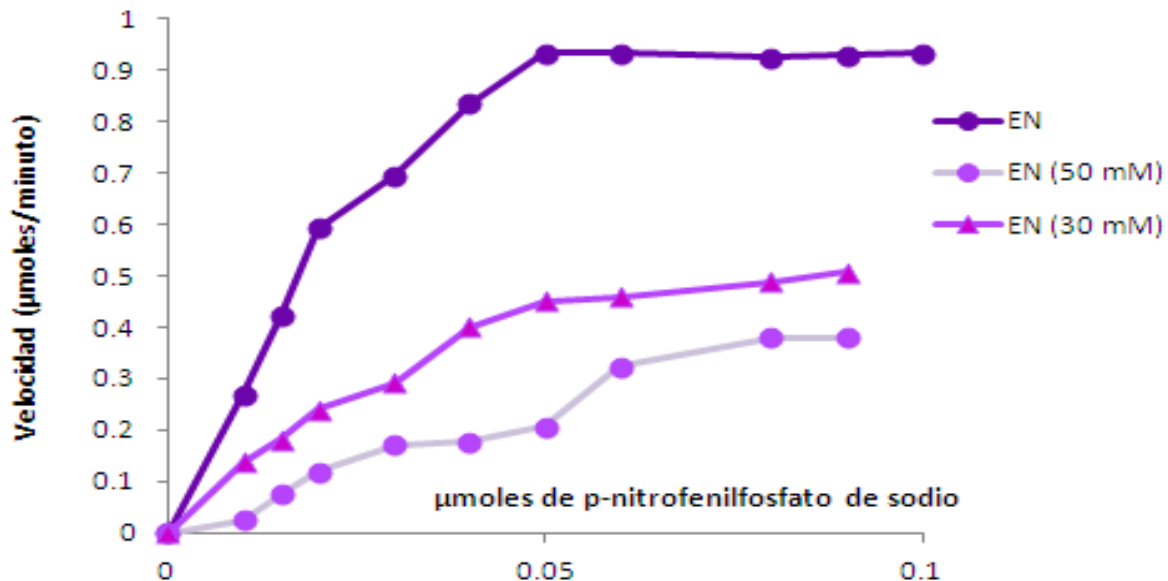
ENZIMA : EN (PA_m)	
Parámetro	Valor obtenido
pH óptimo	10.4
Temperatura óptima	37° C / 310.15 K
V_{max}	0.9259 µmol/min
K_m	0.05833 mM



Al comparar el valor de K_m obtenido, con respecto a los reportados por BRENDA para PA de *Bos taurus* (isoenzima intestinal) ($K_m = 0.07 \mu\text{mol}/\text{min}$ en $\text{pH}=9.8$, 20°C), puede observarse que son similares y se encuentran en el mismo rango de valores, por lo cual puede inferirse que la actividad enzimática del suero de leche corresponde a PA de *B.taurus*.

De igual forma, se realizaron experimentos de geles nativo con p-nitrofenil fosfato de sodio donde puede apreciarse que sí existen bandas de proteínas capaces de producir el compuesto cromógeno p-nitrofenol, lo cual puede interpretarse como presencia de PA_m en el suero de leche.

Para completar los parámetros enzimáticos de la PAM, se utilizaron 2 concentraciones distintas de inhibidor (Molibdato de sodio [50mM] y [30 mM]). Lo anterior, con base a lo que se había reportado en la metodología permitió establecer un protocolo modificado al protocolo propuesto por (Castellanos-Román, 2010) y con aquel se construyó la Gráfica 9 y se calcularon los parámetros de la Tabla 5.3.2



Gráfica 7. Efecto de la Concentración de sustrato y adición de un inhibidor en la PAM La gráfica superior representa los resultados promedio de 3 experimentos independientes, donde se utilizó la PAM aislada de suero de leche,



En la Gráfica 7, puede observarse que el efecto del inhibidor corresponde a lo reportado previamente, puesto que la velocidad enzimática al agregar una concentración intermedia de inhibidor [30 mM] es menor que la obtenida por la Enzima, aunque resulta mayor que la velocidad enzimática del inhibidor [50mM].

ENZIMA :	
EN (PAm) + Inhibidor Molibdato de Sodio (30mM)	
Parámetro	Valor obtenido
V_{\max} aparente	0.91743 $\mu\text{mol}/\text{min}$
K_M aparente	0.3331 mM
ENZIMA :	
EN (PAm) + Inhibidor Molibdato de Sodio (50mM)	
Parámetro	Valor obtenido
V_{\max} aparente	0.8558 $\mu\text{mol}/\text{min}$
K_M aparente	0.5132 mM

Tabla 5.3.2 Parámetros experimentales obtenidos para PAm utilizando inhibidores

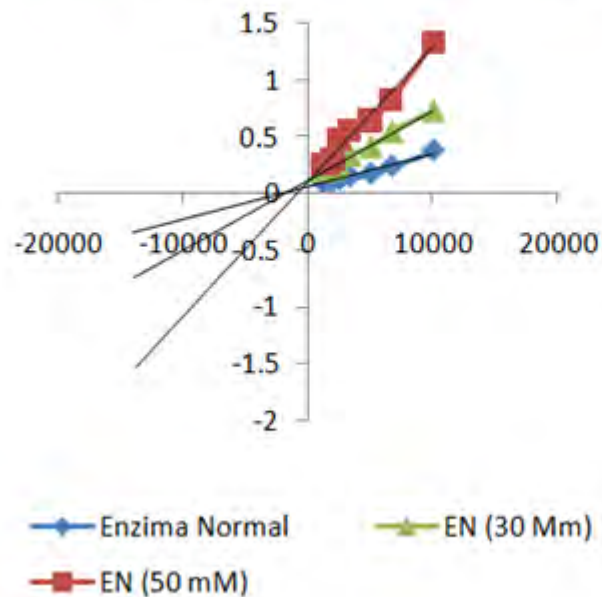
Al analizar la Tabla 5.3.2 con respecto a la Tabla 5.3.1, podemos observar que los valores de V_{\max} aparente permanecen muy similares entre sí mientras que los valores de K_M aparente aumentan y cambian de orden de magnitud. Por ello, podría implementarse en la enseñanza de Bioquímica Experimental, el uso de una segunda concentración de inhibidor, con la finalidad de demostrar con una enzima el comportamiento real de una inhibición competitiva.



Con la finalidad de analizar el efecto de la adición del inhibidor en la presente tesis se aplicó el modelo de Lineweaver-Burke y se procedió a compararse con respecto a la PAm sin tratamiento (gráfica 8).

Para ello, se procedió a graficar el inverso de la velocidad ($1/V$) en función del inverso de la concentración, sin considerar el primer punto de la gráfica ($1/0, 1/0$). Además, se colocó la línea de tendencia, misma que se proyectó hacia adelante 1000 periodos y 2000 periodos hacia atrás, con la finalidad de observar la ordenada al origen y analizar el comportamiento.

Gráfica 8. Efecto del Inhibidor en PA_m . En la gráfica inferior, se aplica el criterio de Lineweaver-Burke en la PA. Para los efectos de la gráfica las distintas concentraciones del inhibidor se representan como EN(30mM) y EN(50mM)



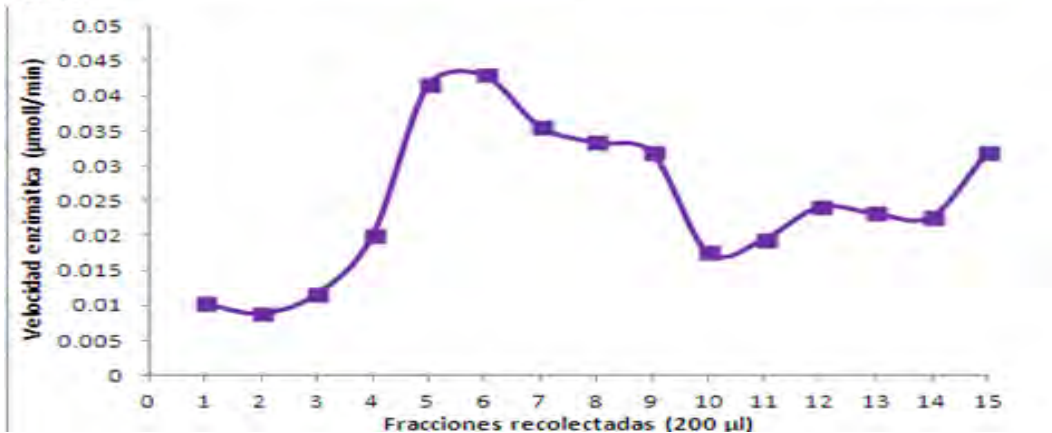
Al partir de los resultados obtenidos en la gráfica 8, puede observarse que al adicionar el Molibdato de Sodio a la PAm, presenta una ***inhibición competitiva***, misma que corrobora los parámetros obtenidos en la Tabla 5.3.2.



5.4 CROMATOGRAFÍAS DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Por otra parte, se analizó la posibilidad de trabajar con cromatografías de exclusión molecular, para lo cual se propuso utilizar la columna de Sephadex 100 y Sephadex 25. Posteriormente se cuantificó la actividad de cada una de las fracciones colectadas, mismas que se muestran en la gráfica 9.

Gráfica 9 Velocidades enzimáticas de las fracciones obtenidas por cromatografía. En la gráfica inferior se muestran los resultados de las determinaciones de p-nitrofenol formado por cada una de las fracciones obtenidas en la Cromatografía de Sephadex G100



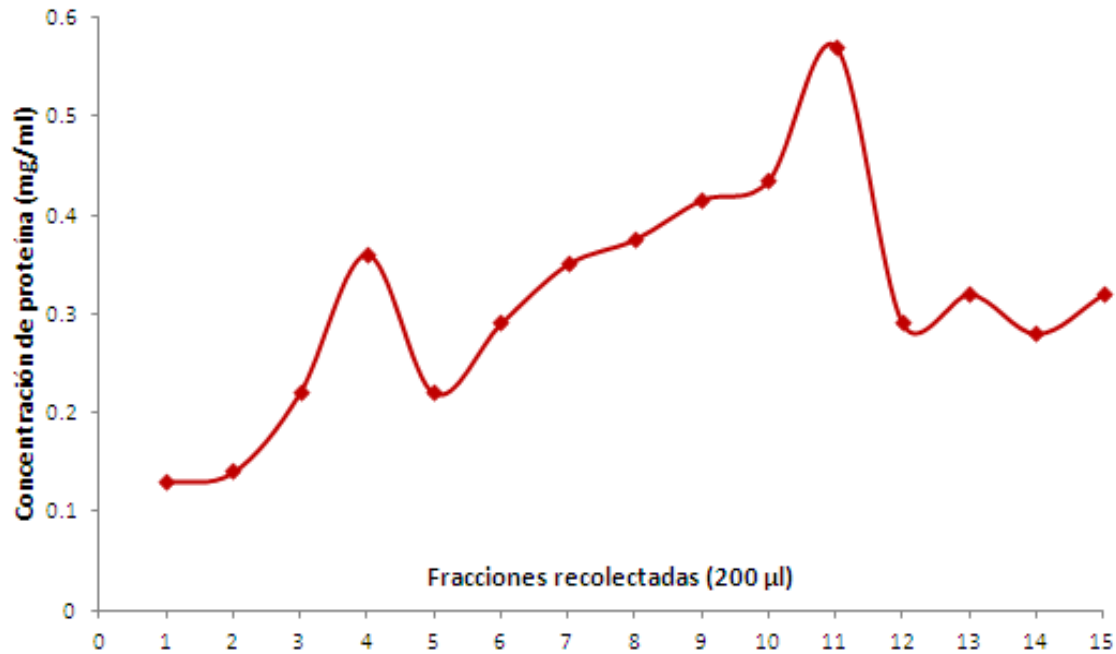
Conforme a los resultados obtenidos en la Gráfica 9, se procedió a estudiar las fracciones 5 y 6. Mismas que se analizaron posteriormente en un gel nativo con p-nitrofenil fosfato de sodio, donde se reveló la formación de p-nitrofenol en varias bandas, lo cual permite estudiar la posibilidad de la existencia de distintas isoenzimas en el suero de leche, lo que refiere lo reportado por Millán (2006).

Por otra parte se procedió a cuantificar la cantidad de proteína presente en cada una de las fracciones con la finalidad de descartar una relación entre la cantidad de proteínas y la actividad. La cantidad de proteína de cada fracción se representa en la gráfica 10.



Gráfica 10 Concentración de proteína de las fracciones obtenidas por la Cromatografía

En la gráfica inferior se observan los resultados promedio de 2 experimentos independientes; n=2



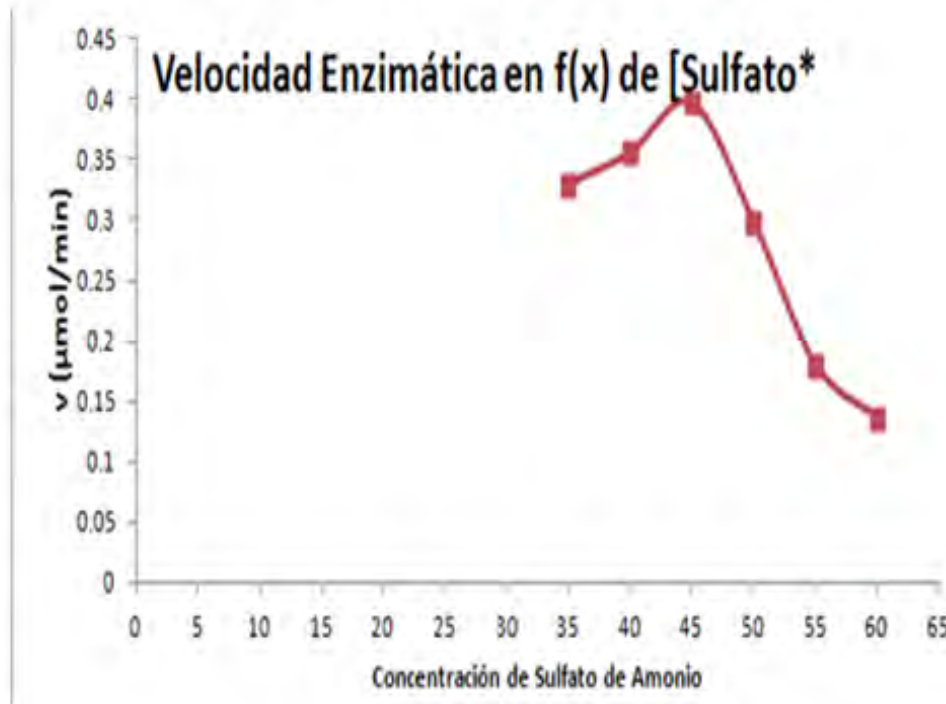
Al correlacionar la Gráfica 9 y 10, puede observarse que la velocidad enzimática de las fracciones no se ve afectada por concentración de proteína que se encuentran en las mismas, puesto que en las fracciones en las cuales se presenta mayor actividad no necesariamente corresponden a aquellas donde la concentración de proteína también es elevada. Lo anterior descarta la posibilidad de que existe mayor actividad enzimática debido a que las cantidad de enzima sea mayor.

5.5 PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO

Con base a lo reportado por nuestro laboratorio en el servicio social (Luna Laviada, 2014)(González-Garzón,2016), se procedió a precipitar con distintas concentraciones de sulfato de amonio a la PA_m obtenida del suero de leche bronca y se midió la actividad enzimática correspondiente a cada uno de las distintas concentraciones (m/m de SA), con lo cual se construyó la gráfica 11.



Gráfica 11 Comparación entre la velocidad enzimática de las muestras de PA de suero de leche precipitadas con distintas concentraciones de sulfato de amonio . En la grafica inferior se presentan los resultados de 4 experimentos independientes



Al analizar la gráfica 11 se comparan las velocidades enzimáticas de los distintos sobrenadantes precipitados con sulfato de amonio; y se infiere, al comparar la velocidad enzimática de la muestra precipitada con 45% de Sulfato de amonio, que existe un pico de actividad, mientras que las menores velocidades enzimáticas se registran en los sobrenadantes obtenidos en las muestras precipitadas con 55% y 60% de sulfato de amonio. Con base en lo anterior, se decidió utilizar un sistema de purificación de precipitación de sulfato de amonio y se eligieron utilizar las concentraciones de 35%, 40% y 45% de sulfato de amonio para posteriores experimentos.



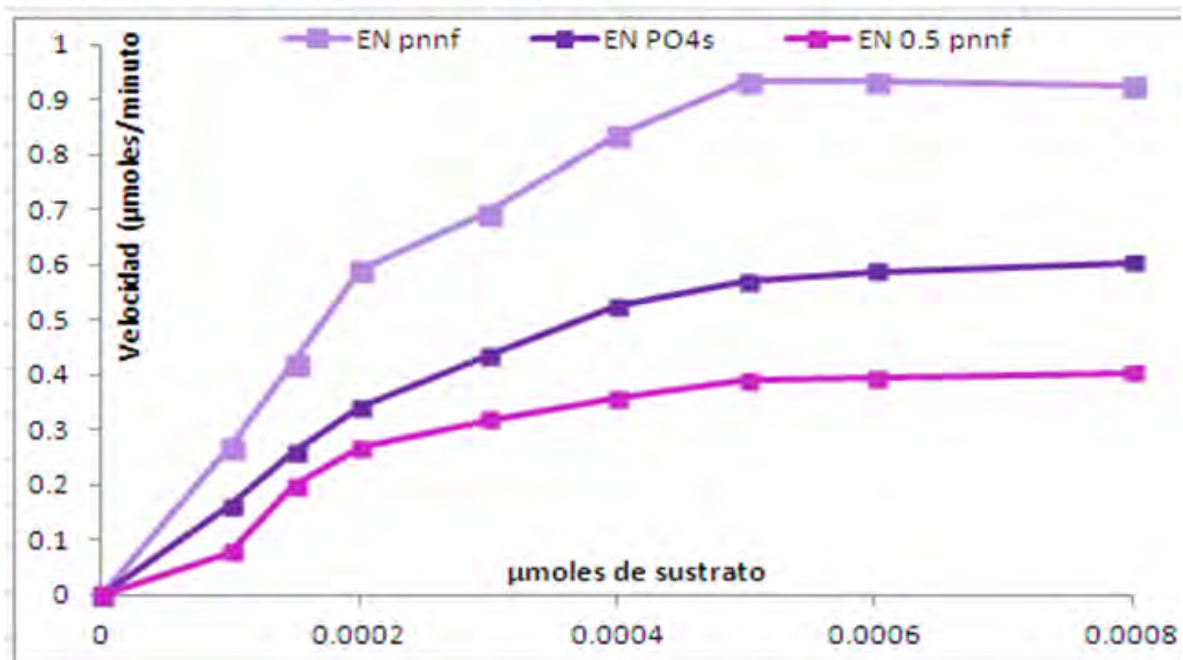
5.6 Efecto de la adición de otros grupos Fosfato.

A partir de lo reportado por (Xie et al. 2010) quien trabaja con PA_b, se formuló la hipótesis de que quizá la PA_m podría utilizar también grupos fosfatos inorgánicos alternativos. Debe aclararse que para la detección espectrofotométrica que se trabaja en el Laboratorio de Bioquímica Experimental, misma que parte de la formación del cromógeno se trabajó con p-nitrofenil fosfato y se intentó utilizar una fuente alternativa de grupos fosfato más económica.

Por ello, sin modificar la concentración total de fosfatos ($2 \times 10^{-3} \text{M}$) se utilizó Hexametáfosfato de Sodio (HMNA) como reactivo donador de grupos fosfatos en adición con el p-nitrofenol.

Por otra parte, se utilizó un control de p-nitrofenil fosfato de sodio con la concentración de ($1 \times 10^{-3} \text{M}$) para distinguir el efecto propio del HMNA; con los datos anteriores se construyó la gráfica 12.

Gráfica 12 Efecto de la adición de otras fuentes de Fosfatos La gráfica inferior muestra los resultados promedio de 3 experimentos distintos donde se denomina (EN pnnf) a la curva generada por PAM utilizando paranitrofenil fosfato [$2 \times 10^{-3} \text{M}$]; (EN PO₄) a la mezcla de HMNA y paranitrofenil fosfato y (EN 0.5 pnnf) a la curva de PAM utilizando [$1 \times 10^{-3} \text{M}$]





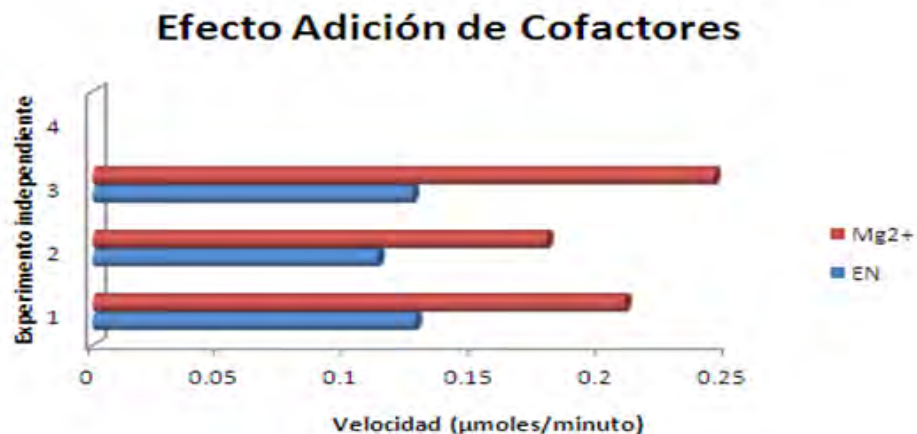
En la gráfica 12, puede observarse que existe actividad enzimática de la PA_m (denominada EN) con los grupos alternativos de fosfato (HMNa) aunque al compararla con la actividad que presenta la PA_m al utilizar como único sustrato al p-nitrofenol, la primera resulta considerablemente menor.

Por otra parte, puede observarse que al utilizar exclusivamente la concentración [1x10⁻³ M] de p-nitrofenil fosfato de sodio (denominada (EN 0.5 pnnf)) la V_{max}* alcanzada es mucho menor comparada con la V_{max}** que presenta la curva de PA_m al utilizar dos grupos de fuentes de fosfatos inorgánicos (EN PO₄s). Al aplicar la prueba estadística *t-student*, se encontró que sí existía diferencia significativa entre las velocidades enzimáticas de ambas, por lo cual puede inferirse que resulta posible para la PA_m utilizar otros PO₄s inorgánicos más económicos, de manera similar a lo que se ha reportado para la PA_b.

5.7 Efecto de la adición de cofactores

Con base a los datos reportados por la literatura (Zhao,2005); se propone que en la caracterización parcial cinética de las PA_b, puede observarse el efecto de la adición de distintos cofactores, particularmente el Mg²⁺. Por ende, para la presente tesis se propuso utilizar PA aislada de suero de leche y observar el efecto de dicho cofactor. Con los datos obtenidos, se construyó la Gráfica 13

Gráfica 13 Efecto de la Adición de Cofactores. En la gráfica inferior, se representan los resultados obtenidos después de añadir el ión Mg²⁺ comparada con la enzima PA_m





En la gráfica 13, puede observarse que sí existe una diferencia significativa entre las velocidades alcanzadas añadiendo como cofactor Mg^{2+} . Lo anterior permite corroborar que la PA_m , aumenta de velocidad al añadir cofactores, dando pauta a posteriores trabajos en el laboratorio con la finalidad de la construcción de nuevas prácticas en Bioquímica Experimental.

6. CONCLUSIONES

- Con base a los resultados obtenidos en el presente desarrollo experimental, puede concluirse que sí resulta factible aislar la PA en la leche bronca de *Bos taurus*.
- Además, se demostró que la PA aislada era de origen mamífero (propia de la vaca) y no se debía a una posible contaminación bacteriana.
- Puede afirmarse que la metodología para el aislamiento de la PA_m a partir del suero de leche bronca resulta una alternativa a la reportada en la literatura para aislarla en productos derivados de la crema; lo cual resulta interesante puesto que sólo se ha reportado la técnica donde se utiliza la crema de la leche bronca como punto de partida para la obtención de PA_m .
- Entre las ventajas de utilizar suero de leche, en lugar de crema, destacan que se obtienen mayores concentraciones de la enzima PA y existe menor riesgo de contaminación bacteriana debido a la riqueza nutricional que representa la crema.
- Al realizar geles SDS-PAGE de suero de leche de *Bos taurus*, se observa la banda correspondiente a PA_m misma que puede corroborarse al realizar geles nativos revelados con p-nitrofenil fosfato de sodio.
- Existen otras soluciones amortiguadoras distintas a las reportadas por la literatura para obtener curvas cinéticas de PA_m , destacando la Glicina.



- Existen dos velocidades máximas en un gradiente de pH, en los puntos 10 y 10.4, lo cual puede estudiarse a profundidad posteriormente.
- Una segunda concentración de inhibidor (Molibdato de Sodio 30mM) en cinéticas de PAm permite observar mejor el comportamiento de un inhibidor competitivo.
- La PAm puede utilizar fuentes alternativas de Fosfatos (HMNa) aunque sigue siendo indispensable la adición de un compuesto que forme el cromógeno que se lee posteriormente
- Al adicionar Mg^{2+} , puede observarse un aumento en la velocidad enzimática característica de PA, por lo cual podría utilizarse la metodología de la adición de cofactores en la práctica de PAm

7.PERSPECTIVAS

Con base en los experimentos realizados por los alumnos de Servicio Social, podría estudiarse posteriormente la posibilidad de utilizar distintos tratamientos térmicos para purificar cada una de las isoenzimas que se sospechan se encuentran dentro del suero de leche de *Bos taurus* (TNSP de las isoformas hepáticas y óseas) así como tratamientos de inhibición química.



8. REFERENCIAS

1. Aguilar-Martinez C. (2014). *Cinética Enzimática de la tripsina de Bos taurus utilizando calorimetría de Titulación Isotérmica* Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 8-12
2. Alais C (1985) Ciencia de la leche: Principios de técnicas lechera. Barcelona Capítulo 8 Editorial Reverte pp 230-239
3. Atkins P, De Paula J (2008) Química Física Buenos Aires, Argentina 8°ed Capítulo 23 *Cinética de las Reacciones Complejas.Enzimas* pp 840-843
4. Atroshi F, Parantein J *et al* (1996) Changes in inflammation related blood constituents of mastitic cows *Vet Res* 27,125-132
5. Ayala- Esquivel, H. (2011). *Purificación e identificación de enzimas de Bacillus pumilus GMA1 con potencial en biocatálisis* Tesis de licenciatura, Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 18-34
6. Babbie A, Toriki N, Hollfelder F. (2010) What makes an enzyme promiscuous? *Current Opinion in Chemical Biology*, 14: 200-207
7. Battaner-Arias E.(2013) Compendio de Enzimología. España, Universidad de Salamanca Ediciones pp 17-23
8. Bhattacharjee, S., Das A.K., Mandal, S.K.(2004) Isolation and characterization of alkaline phosphatase of *Saccharopolyspora erythraea* from fermentation broth of erythromycin production ;3: 558-562
9. Bohinsky (1987) Bioquímica México Fondo Educativo Interamericano 2° Ed. Capítulo 11 pp. 315-339
10. Bourne G (1942) The Distribution of Alkaline Phosphatase in Various Tissues *Journal of Experimental Physiology* Consultado en <http://ep.physoc.org> por última vez 24 Septiembre 2015



11. Bowers, G, McComb RB(1966) A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum Alkaline Phosphatase *Clinical Chemical* 12(2): 70-90
12. Castellanos Román L.C. (2010) *Cinética Enzimática de la Fosfatasa Alcalina* UNAM FQ Departamento de Bioquímica Experimental (0141) México D.F. pp 2-8
13. Cathala G, Brunel (1974) Bovine Kidney Alkaline Phosphatase *J. Biol. Chem* 250 Vol 250 (15): 6040-6045
14. Coleman JE (1992) Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase *Annual Review Biophysics Biomolecular Structure* ; 21:441-483
15. Debus, A. (1990) Man and Nature in the Renaissance. Inglaterra, Cambridge History of Science Series 2° Ed 15° Reimpresión pp 11-15
16. Devlin, TM (2006) Bioquímica. Aplicaciones Clínicas. Ed Reverte España, Barcelona pp.143-144
17. Douglas, K. (1992). Alteration for enzyme specificity and catalysis *Current Opinion in Biotechnology* Vol 3:1992 370-377
18. Eguchi, M (1995) Alkaline phosphate isozymes in insects and
19. comparison with mammalian enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochem. Molecular Biol.* 111(2): 151-62.
20. Engel P (1981) Enzyme Kinetics The Steady State Approach Chapman-Hall 2°ed
21. Engel T, Reid PJ, Hehre W. (2007). Physical Chemistry, E.E.U.U. Pearson 4 Ed Chapter 18 Kinetics pp 442-450
22. Feduchi ME, Blasco I, (2011) Bioquímica. Conceptos Esenciales España Barcelona, Editorial Médica Panamericana Capítulo 8 Enzimas y Catálisis pp 128-139 .
23. Fox PF McSweeney (2003) Advanced Dairy Chemistry, Kluwer Academic/Plenum Publishers Chapter 11 pp 523-525
24. Guglielmi A (2006) Caracterización electroforética y cinética de las isoenzimas oseas, hepática e intestinal de Fosfatasa Alcalina Argentina



Revista de la Universidad de Rosario Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral pp 12-25

25. Ghélis C; Perahia D, Yon (1998) Conformational dynamics and enzyme activity. *Biochimie*, Vol 80 pp 33-42

26. Harris H (1989) The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know *Clinica Chemica Acta* 186: 133-150

27. Herschlag, D., O'Brien (2001). Functional interrelationships in the alkaline phosphatase superfamily *Biochem.* 40(19): 5691-5699.

28. Kelly, A.L., Fox, P.F. (2006) Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements *International Dairy Journal* 16: 707-715

29. Kley Dh, Rapid determination of alkaline phosphatase reactivation (1977) *Assoc Off Anal Chem* 60(6): 1389-1391

30. Lehninger AL., Nelson L , Cox IM (2005) Principios de Bioquímica. 4° ed, Editorial Omega España, Barcelona pp 12-15

31. Logan, S.R (2000) Fundamentals of chemical kinetics Ed Addison-Wesley Iberoamericana, España Barcelona Capítulo Primero

32. Luna-Laviada J (2014) ***Informe de Liberación de Servicio Social: Contribución al mejoramiento de la práctica: Efecto de T y pH en Fosfatasa Alcalina*** UNAM FO Departamento de Bioquímica Experimental (0141) México D.F pp 2-5

33. Maynard LA. (1958) James Batcheller Sumner 1887-1955: A biographical Memoir National Academy of Sciences Washington EUA pp 381-383

34. McKenna MJ, Hamilton TA, Sussman HH (1979) Comparison of Human Alkaline Phosphatase Isoenzymes *Biochemical Journal* 181:67-73

35. Ibid Capítulo 16 Methodologies pp 79-81

36. Mercado-Mercado G, Duarte-Muñoz N *et al* (2012) Fosfatasa alcalina *Tecnociencia* 6(2)112-123

37. Millán JL (2006) Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology Wiley-VCH 2°Ed Capítulo 4 Protein Structure and Functional Domains pp 25-49



38. Morrison & Boyd (1990) Química Orgánica. 5^oed, Addison-Wesley, Iberoamericana, E.E.U.U, pp 1323,1327
39. Moss, DW (1982) Alkaline Phosphatase Isoenzymes *Clin Chemical* 28 (10) 2007-2016
40. Murthy GK, Peeler HT(1979) Rapid methods for differentiating reactivates from residual phosphatase in milk and cream: collaborative study *J Assoc Off Anal Chem* 62(4):822-827
41. Parmjit, PS, Marwaha SS, Chopra HK (2010) Enzymes in food processing: fundamentals and potential applications. International Publishing House. New Delhi, India Capítulo 1 pp 2-43
42. Panadero-García (1986) Formas múltiples de Fosfatasa Alcalina Hospital de Bellvitge *Príncipeps d'Espanya Química Clínica* 5(3)257-268
43. Pometto A, Ghettu K, Paliyah G. (2005) Food Biotechnology CRC Press 2^oED Capítulo 20 Enzyme Technology for the Dairy Industry 20.2 Indigenous Enzymes of Milk pp 1043-1044
44. Rezende, E (2006) Chronology of Science. Infobase Publishing House. New York EUA Capítulo 6 pp 222-223
45. Rodríguez AM, Oliver J, Roca P (2003) Bioquímica. Técnicas y Métodos Capítulo 11 Métodos de determinación de proteínas pp 148-159
46. Rosalki SB Ying-Foo (1984) A Two New Methods for Separating and Quantifying Bone and Liver Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Plasma *Clinical Chemistry* 30(7): 1182-1186
47. Sloan A (1996) English Medicine in the Seventeenth Century Inglaterra Durham Academic Press pp 81-83
48. Voet D, Voet J (2006) Bioquímica Médica Panamericana 3^oEd Capítulo XIII pp 473-556
49. Xie,C, Lu R, Huang Y(2010) The phosphorus fractions and alkaline phosphatase activities in sludge *Bioresource Technology* 101: 3394-3399



50. Whitby L.G., Moss DW(1975) Analysis of Heat Inactivation Curves of Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Serum *Clinica Chimica Acta* 59:361-367
51. Zhao H (2005) Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity and its implications *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 37: 16-25
52. Zalatan JG, Fenn TD, Herschlag (2008) Comparative Enzymology in the Alkaline Phosphatase Superfamily to Determine the Catalytic Role of an Active-Site Metal Ion *J.Mol Biol* 384: 1174-1189
53. Zittle C.A., DellaMonica ES (1952) Use of butanol in the purification of the alkaline phosphatase of bovine milk and intestinal mucosa *Arch Biochem. Biophys* 35:321