

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

*Evaluación de la Eficiencia Catalítica de Tripsina de
Sardina Monterey (Sardinops sagax caerulea) a Bajas
Temperaturas*

Tesis de Maestría para Obtener el Grado de:

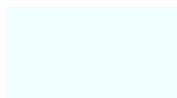
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

Q. B. Idania Emedith Quintero Reyes

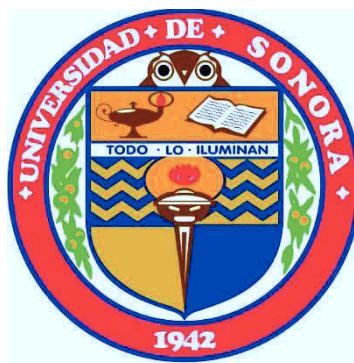
Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2008



Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Academia de Tecnología de Alimentos del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, dentro del proyecto de investigación “Expresión, Purificación y Caracterización de Tripsina Recombinante de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*)”. Financiado por CONACYT. Referencia: 60477. Convocatoria: Ciencias Básicas-2006. Cuyo Director es el Dr. Francisco Javier Castillo Yáñez.

CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador designado para revisar el trabajo de Tesis Profesional de la Q.B. **Idania Emedith Quintero Reyes**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Dr. Francisco Javier Castillo Yáñez
Director de Tesis

Dra. Maria del Carmen Candia Plata
Secretario

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Vocal

Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora , en especial al Programa de Maestría en Ciencias de la Salud por brindarme la oportunidad de continuar preparandome como profesionista además de las facilidades y apoyos otorgados para que éste trabajo se haya podido lograr, así como a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud..

También quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado durante éste periodo.

Agradezco infinitamente al Dr. Víctor Ocaño y al Dr. Ramón Robles sus observaciones y sugerencias, que sin duda acrecentaron este trabajo.

A la Dra. Maria del Carmen Candia Plata por la asesoría y confianza que depositó en mi para cumplir con ésta etapa de preparación.

Al Dr. Francisco Javier Castillo Yáñez por su confianza, guía, consejos y paciencia que me há regalado durante todo éste tiempo, lo cual atesoraré para siempre.

Finalmente quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Enrique Fernando Velázquez Contreras, por su gran disponibilidad en participar como asesor en la parte termodinámica de éste trabajo, ya que sus aportaciones sin duda lo enriquecieron infinitamente, además de que cada uno de sus comentarios y consejos son una parte muy importante en mi formación.

DEDICATORIAS

A DIOS, por darme la gracia de alcanzar una meta más como profesionista.

A MIS PAPAS, por su apoyo incondicional, además de que son mi fuente de inspiración para seguir superandome como persona y profesionista.

A MIS HERMANOS, Oliver y Joan, por su amor y comprensión.

A LOS GUY´S, Cayita, Karla M., Carla L., Carlos, Karla Z., Mstra. Lucía e Irma, por todos los momentos tan amenos y lindos que compartimos durante éste período.

A MIS MAESTROS, Dr. Victor Manuel Ocaño, Dra. Maria Candia, Dr. Ramón Robles, a mi director de Tesis Dr. Francisco Javier Castillo y al Dr. Enrique Velázquez Contreras.

CONTENIDO

	Páginas
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	xi
HIPÓTESIS	xiv
OBJETIVOS	xiv
ANTECEDENTES	15
Enzimas Proteasas	15
Clasificación de Enzimas Proteasas Digestivas	16
Serina-Proteasas	17
Proteasas Digestivas en Peces	19
Enzimas Adaptadas al Frío	20
Bases Moleculares de Enzimas Adaptadas al Frío	21
Parámetros Cinéticos	23
Teoría del estado de transición	34
Parámetros termodinámicos del proceso de activación de una reacción enzimática	36
Purificación de Proteínas	38
Extracción	38
Precipitación	39
Métodos Cromatográficos	39
Cromatografía de exclusión molecular	40
Enzimas a Nivel Industrial	40
MATERIALES Y MÉTODOS	42

Obtención de la Muestra	42
Extracción y Purificación de Tripsina	42
Preparación del Extracto Crudo de Ciegos Pilóricos	42
Fraccionamiento con Sulfato de Amonio	43
Cromatografía de Filtración en Gel	43
Determinación de Constantes Cinéticas	44
Características Cinéticas	44
Parámetros Termodinámicos del Proceso de	45
Activación de la Reacción Enzimática de Tripsina	
Bovina y de Sardina Monterey	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
Purificación de Tripsina	46
Determinación de Constantes Cinéticas	50
Determinación de Parámetros Termodinámicos del	
Proceso de Activación de la Reacción Enzimática de	59
Tripsina Bovina y de Sardina Monterey.	
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valores de proteína y actividad enzimática obtenidos en el proceso de purificación y aislamiento de tripsina de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>).	48
2	Constantes cinéticas de tripsina de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) a diferentes temperaturas.	52
3	Constantes cinéticas de tripsina bovina a diferentes temperaturas.	53
4	Comparación de valores obtenidos de la constante de catálisis k_{cat} entre tripsina bovina y de sardina Monterey.	56
5	Comparación de los valores obtenidos de la eficiencia catalítica k_{cat}/K_m entre tripsina bovina y de sardina Monterey.	58
6	Datos correspondientes al logaritmo natural de las constantes de catálisis de tripsina de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) e inversos de las temperaturas evaluadas.	60
7	Datos correspondientes al logaritmo natural de las constantes de catálisis de tripsina bovina e inversos de las temperaturas evaluadas.	61
8	Parámetros termodinámicos del proceso de activación de tripsina bovina y de sardina Monterey a 5°C y 15°C.	66
9	Parámetros termodinámicos del proceso de activación de tripsina bovina y de sardina Monterey a temperatura estándar (25°C).	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema representativo del efecto de la temperatura sobre enzimas psicrófilas y mesófilas	22
2	Gráfica de la cinética de una reacción de acuerdo al mecanismo de Michaelis-Menten	31
3	Gráfica doble recíproca de Lineweaver-Burk	33
4	Esquemmatización de la teoría del estado de transición	35
5	SDS-PAGE al 12% de acrilamida de fracciones proteicas obtenidas a partir de cromatografía de exclusión molecular Sephacryl -100	49
6	Gráfica de Michaelis-Menten para determinación de las constantes cinéticas de tripsina de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) a diferentes temperaturas.	54
7	Gráfica de Michaelis-Menten para determinación de las constantes cinéticas de tripsina bovina a diferentes temperaturas.	55
8	Representación esquemática de las diferencias en ΔG de una reacción de acuerdo a los valores de K_m .	57
9	Gráfica de Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de tripsina de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>).	64
10	Gráfica de Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de tripsina bovina	65

RESUMEN

Las enzimas juegan un papel muy importante en el proceso de evolución, ya que los organismos que habitan ambientes fríos, llamados organismos psicrófilos, han desarrollado una gran habilidad para adaptarse a este tipo de ambientes, la cual es determinada en gran medida por su capacidad de sintetizar enzimas psicrófilas. Las propiedades de éstas enzimas, no solo son importantes desde el punto de vista biológico, sino que también representan un modelo importante para investigación básica en cuanto a su comportamiento como catalizadores, y es por eso que el objetivo de éste trabajo es evaluar la eficiencia catalítica de la enzima tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) a bajas temperaturas comparándola con una enzima homóloga de un organismo mesofilo, en este caso con tripsina bovina. Se cree que la tripsina de sardina es una enzima psicrófila debido a las temperaturas de su hábitat, y para comprobar lo anterior, se llevaron a cabo una serie de experimentos a la par con la tripsina bovina. Se determinaron las constantes cinéticas K_m y k_{cat} de la hidrólisis de BAPNA con ambas enzimas, a distintas temperaturas (4-50°C) y concentraciones de sustrato (10-1000 μM). A partir de k_{cat} se obtuvo el valor de la energía de activación y los parámetros termodinámicos del proceso de activación, con el fin de aceptar o rechazar nuestra hipótesis. Los valores de energía de activación fueron de 32.5 kJ/mol para tripsina de sardina y 40.18 kJ/mol para tripsina bovina. Los valores de los parámetros termodinámicos del proceso de activación de tripsina de sardina Monterey fueron los siguientes: $\Delta G^* = 67.2$ kJ/mol, $\Delta H^* = 30.64$ kJ/mol, $T\Delta S^* = -36.98$ kJ/mol; para tripsina bovina: $\Delta G^* = 71.36$ kJ/mol, $\Delta H^* = 37.87$ kJ/mol y $T\Delta S^* = -33.49$ kJ/mol. Las diferencias de estos valores, que fueron los siguientes: $\Delta(\Delta G^*)^{p-m} = -3.69$ kJ/mol, $\Delta(\Delta H^*)^{p-m} = -7.23$ kJ/mol y $T\Delta(\Delta S^*)^{p-m} = -3.49$ kJ/mol, nos indican que la tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es una enzima adaptada al frío.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas se encuentran en todos los seres vivos, son sustancias biológicas que desde el punto de vista bioquímico son proteínas que tienen una capacidad asombrosa de acelerar reacciones químicas de síntesis y degradación de compuestos. Éstas se distinguen por poseer tres características únicas: poder catalítico, especificidad y regulación, lo cual facilita los diferentes procesos biológicos en todo tipo de vida, al igual que en diferentes procesos industriales (Garret y Grisham, 1999; Copeland, 2000).

Estos catalizadores biológicos tienen numerosas aplicaciones en diversas áreas, entre las que destacan el área médica. En esta área, las enzimas llevan a cabo funciones definitivas relacionadas con los estados de salud y enfermedad. Por lo tanto, en ciertos estados patológicos, las enzimas pueden contribuir de manera importante a superarlos. Hoy en día, la industria farmacéutica emplea enormes cantidades de enzimas, por lo que desde hace unas décadas se hizo necesaria la obtención de enzimas relativamente puras extraídas de bacterias, hongos, plantas y animales terrestres y marinos, para utilizarse en la fabricación de fármacos. El uso de las enzimas en las diferentes industrias es cada vez más redituable, siendo el grupo de enzimas proteasas el de mayor importancia industrial, las cuales, actualmente se cotizan muy alto en el mercado internacional (An y Visessanguan, 2000; Novoenzymes, 2004), en base a esto se continúa con la búsqueda de distintos tipos de enzimas que permitan mejorar la eficiencia, reducir los costos y aumentar la disponibilidad de algunas enzimas de interés industrial con altas capacidades de producción. Hasta ahora sabemos que la porción más grande de la biosfera terrestre comprende organismos que habitan ambientes fríos, llamados organismos psicrófilos, en donde su habilidad de proliferar en este tipo de ambiente es determinada por su capacidad de sintetizar enzimas adaptadas al mismo, es decir, producir enzimas adaptadas al frío. Estas enzimas han evolucionado a

nivel estructural lo cual les confiere un alto nivel de flexibilidad en comparación con sus homólogas mesófilas. Debido a las propiedades únicas de las enzimas adaptadas al frío no son solo importantes desde el punto de vista biológico, sino que también representan un modelo importante para investigación básica en cuanto a su comportamiento como catalizadores.

Durante la última década ha habido un aumento en el interés por estudiar a las enzimas adaptadas al frío debido a su potencial aplicación en la industria; su alta eficiencia hace posible que en distintos procesos catalíticos se utilicen bajas concentraciones de enzima. La temperatura y estabilidad óptima de actividad a bajas temperaturas las hace idóneas para la síntesis de productos químicos y farmacéuticos que necesiten un alto grado de pureza, además este tipo de enzimas se utilizan para crear nuevos químicos presentes en las fragancias, otra aplicación de las mismas es de gran utilidad para dar la apariencia deslavada en pantalones, en la industria de los detergentes, específicamente proteasas son de gran importancia ya que se puede utilizar en presencia de agua fría disminuyendo costos energéticos; y es por esto que las enzimas psicrófilas ofrecen un alto potencial no solo en investigación sino que también en aplicaciones biotecnológicas, y esto nos puede dar una idea del beneficio económico que podría representar la obtención de enzimas proteasas adaptadas al frío.

De las vísceras de sardina Monterey se han aislado y caracterizado distintas proteasas entre ellas tripsina, la cual mostró excelentes cualidades catalíticas que podrían tener aplicaciones importantes en el área médica ya que se ha visto que este tipo de enzima se puede utilizar como fármaco antiinflamatorio para el tratamiento de esguinces, desgarres y dolor lumbar; además, enzimas tipo tripsina han dado muy buenos resultados en desbridamiento de úlceras y otras heridas crónicas (Haard et al., 2000; Copeland, 2000; Klomklao et al., 2005; Saeki et al., 2007). Además, de acuerdo a las temperaturas a las que habita la sardina Monterey, se cree que

sus enzimas puedan presentar adaptación a bajas temperaturas, es decir se cree que tripsina pudiera ser una enzima adaptada al frío (Castillo et al, 2005).

Con base en lo anterior, se propone determinar las constantes cinéticas así como parámetros termodinámicos del proceso de activación de la tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) que permitan establecer si es una enzima adaptada al frío o no.

HIPÓTESIS

La enzima tripsina proveniente de ciegos pilóricos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es una enzima adaptada al frío.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es una enzima adaptada al frío.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar tripsina a partir de ciegos pilóricos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).
- Determinar las constantes cinéticas de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

K_m = constante de Michaelis-Menten

k_{cat} = constante de catálisis

$V_{m\acute{a}x}$ = velocidad máxima

- Determinar los parámetros termodinámicos del proceso de activación de la reacción enzimática de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

ΔG^* = cambio en energía libre del proceso de activación

ΔH^* = cambio en la entalpía del proceso de activación

ΔS^* = cambio en la entropía del proceso de activación

ANTECEDENTES

Enzimas Proteasas

Las enzimas son polímeros de aminoácidos que dirigen la actividad catalítica en distintos sistemas biológicos gracias a su capacidad de acelerar reacciones químicas. Durante los últimos años, su utilidad en gran cantidad de industrias ha adquirido gran relevancia; siendo las proteasas el grupo de enzimas de mayor importancia industrial y comercial a escala internacional (Haard et al., 2000; Montes y Magaña, 2002). Casi la mitad de las enzimas industriales son proteasas y se utilizan en los detergentes, en procesos de ablandamiento de pieles, en la manufactura de quesos, industria vinícola y fabricación de sedas; a la vez tienen aplicaciones muy importantes en el área médica como la producción de fármacos anti-inflamatorios, disolución de coágulos sanguíneos, inhibición de la transcripción (como el Zidovudine que actúa como inhibidor de la transcriptasa reversa en el HIV) y activación de hormonas entre otras (Haard et al., 2000; Copeland, 2000; Klomklao et al., 2005; Saeki et al., 2007).

Las enzimas poseen una capacidad de catálisis asombrosa. Estos compuestos están sujetos a las mismas leyes que rigen el comportamiento de otras sustancias en la naturaleza, a la vez, estos compuestos presentan algunas diferencias, como el llevar a cabo reacciones biológicas a altas velocidades, actuar bajo condiciones suaves de reacción, es decir, temperaturas por debajo de los 100°C, actúan a pH's neutros, poseen un alto grado de especificidad por su sustrato y el tipo de catálisis que llevan a cabo varía en respuesta a la concentración de otras sustancias diferentes al sustrato, es decir tienen capacidad de regulación catalítica (Alberts, 2004).

En resumen las enzimas sobresalen por poseer tres características distintivas: poder catalítico, especificidad y regulación, lo cual facilita los diferentes procesos biológicos en todo tipo de vida, al igual que en diferentes procesos industriales. Muchas enzimas mantienen su potencial catalítico aun después de su extracción de diferentes organismos, lo cual no tomó mucho tiempo para que la humanidad pudiera reconocer y explotar este poder catalítico para propósitos comerciales, por lo que desde hace algunos años se han realizado estudios para obtener información sobre las mismas y desde entonces, casi la mitad de todas las industrias utilizan diferentes tipos de enzimas en distintos procesos (Copeland, 2000; Garret & Grisham, 1999).

Hoy en día, el estudio de las enzimas es de gran importancia para la comunidad científica y para la sociedad en general, por lo que se continúa con la aplicación de enzimas en diversas industrias.

Como se mencionó anteriormente las proteasas son el grupo de enzimas de mayor importancia industrial las cuales se cotizan muy alto en el mercado internacional y de acuerdo a la amplia gama de aplicación de estas enzimas, se siguen purificando y caracterizando más enzimas de diversas fuentes, para poder sustentar las necesidades médicas e industriales del hombre que con el paso del tiempo, son mayores (Copeland, 2000).

Clasificación de Enzimas Proteasas Digestivas

Hartley (1960), sugirió que era conveniente dividir a las enzimas proteasas o proteolíticas en 4 grupos en base a su mecanismo de acción: a) Serina-proteasas; b) Aspártico-proteasas c) Sulfhidril-proteasas también llamadas tiol proteasas o cisteína proteasas y d) Metallo-proteasas. Para este estudio nos enfocaremos solamente en las serina-proteasas (Whitaker, 2000).

Serina-proteasas

Este grupo de enzimas proteasas se caracteriza por tener un residuo serina muy reactivo en su sitio activo. Todas ellas son endoproteasas y además del residuo serina, también intervienen los residuos histidina y ácido aspártico en el proceso catalítico, formando la llamada triada catalítica, característica de esta familia de enzimas. Del sistema digestivo de animales marinos se han aislado y caracterizado tres enzimas serina-proteasas: tripsina, quimotripsina y elastasa. Estas enzimas tienen estructuras similares y comparten esencialmente la misma secuencia de aminoácidos alrededor de la triada catalítica formada por histidina 57, serina 195 y aspártico 102. Todas las proteasas pertenecientes a esta subclase tienen en común los primeros 3 dígitos del código asignada por la CE: 3.4.21, e individualmente les corresponden los siguientes códigos: tripsina 3.4.21.4, quimotripsina 3.4.21.1 y elastasa 3.4.21.11 (Whitaker, 2000).

Aunque todas las serina-proteasas presentan el mismo mecanismo de acción catalítico, su especificidad por el sustrato es muy diferente. Quimotripsina tiene especificidad para hidrolizar el enlace peptídico por el lado carboxilo donde se encuentran los aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano. Tripsina muestra su especificidad para romper el enlace peptídico por el lado del grupo carboxilo de los aminoácidos con cadenas laterales voluminosas y con carga positiva como lisina y arginina. Elastasa rompe específicamente el enlace peptídico por el lado carboxilo de aminoácidos pequeños e hidrofóbicos como alanina y valina (Whitaker, 2000). La razón para estas diferencias tan marcadas en especificidad, radica en diferencias estructurales en las cavidades donde se aloja el sustrato junto al sitio activo de la enzima. En quimotripsina y tripsina, la cavidad junto al sitio activo es muy abierta debido a que está entre dos residuos de glicina (glicina 216 y 226), de tal forma que se pueden alojar cadenas laterales de aminoácidos grandes. La

diferencia entre estas dos enzimas es que en quimotripsina en el fondo de la cavidad se encuentra el residuo serina 198 mientras que en tripsina se encuentra el residuo aspártico 189; entonces la cavidad de quimotripsina no tiene cargas y permite el alojamiento de cadenas laterales de aminoácidos grandes pero sin carga como fenilalanina, tirosina, triptófano y leucina; mientras que la cavidad de tripsina está la carga negativa del ácido aspártico 189, lo que permite el acoplamiento con cadenas laterales grandes de aminoácidos con carga positiva como lisina y arginina. La cavidad junto al sitio activo de elastasa es muy diferente; en este caso la mayoría del espacio está ocupado por residuos de aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas como valina 216 y treonina 226, de tal manera que solo se pueden acoplar aminoácidos de cadena lateral pequeña y sin carga como alanina y valina (Whitaker, 2000).

El mecanismo de acción de este grupo de enzimas se basa en un residuo serina muy reactivo que tienen en el sitio activo. El proceso de catálisis inicia cuando la cadena polipeptídica del sustrato se une a la enzima específicamente en el sitio donde se encuentra la triada catalítica; la cadena lateral específica embona en su cavidad lo cual promueve que el aspártico 102 posicione e inmovilice a través de un puente de hidrógeno al residuo histidina 57. En la primera fase de reacción, histidina 57 actúa como una base para retirar un protón de serina 195, lo cual facilita el ataque nucleofílico de serina 195 sobre el carbono carbonilo del enlace peptídico a ser hidrolizado. Esto debe ser una fase concertada ya que la transferencia del protón previa al ataque de serina 195 sobre el carbono acilo podría dejar una carga negativa en el oxígeno de serina que sería relativamente inestable (Whitaker, 2000).

En la siguiente etapa, la donación de un protón de histidina 57 al nitrógeno amida del péptido crea una amina protonada en el intermediario tetraédrico covalente, facilitando el rompimiento subsecuente del enlace y la disociación del producto amina. La carga negativa en el oxígeno peptídico es inestable; el intermediario tetraédrico tiene una vida muy corta y rápidamente se

rompe para expulsar el producto amina. Con el sustrato peptídico normal, un ataque nucleofílico subsecuente sobre el carbono carbonilo por una molécula de agua, genera otro intermediario tetraédrico transiente, donde histidina 57 actúa como base aceptando un protón de la molécula de agua atacante (Whitaker, 2000).

El colapso subsecuente del intermediario tetraédrico es asistido por una donación del protón de histidina 57 al oxígeno de serina 195 de una manera concertada; la desprotonación del grupo carboxilo y su partida del sitio activo completan la reacción (Garret y Grisham, 1999; Mathews, 2002; Whitaker, 2000).

Proteasas Digestivas en Peces

En las vísceras de los peces se encuentran enzimas proteasas que son producidas por las glándulas digestivas (Klomklao et al, 2006_a). Éstas generalmente se clasifican de acuerdo a su sensibilidad al pH como ácidas o alcalinas. Dentro de las proteasas ácidas que han sido aisladas y caracterizadas de las vísceras de animales marinos se encuentran pepsina, quimosina y gástricina y entre las proteasas alcalinas, se encuentran tripsina, quimotripsina y elastasa. Estas últimas, en particular tripsina, es la que más se ha estudiado en muchas especies de mamíferos al igual que en distintas especies de peces en todo el mundo (Klomklao et al, 2007). Los resultados de dichos estudios, muestran que estas enzimas presentan características de actividad parecidas, aún tratándose de organismos con hábitats muy diferentes (Klomklao, 2007).

Las proteasas digestivas de los peces tienen gran potencial para utilizarse en el área médica. Estas enzimas pueden ser una buena alternativa para la industria por sus cualidades catalíticas, entre las que destacan: baja

temperatura óptima de actividad, baja termoestabilidad y alto pH óptimo de actividad con respecto a enzimas homólogas de mamíferos terrestres (Simpson, 2000).

Enzimas Adaptadas al Frío

Los organismos psicrófilos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, en donde una gran parte de la superficie que ocupan posee temperaturas alrededor de 0°C. Para mantener activo su metabolismo y poder prosperar en ambientes fríos, estos organismos extremófilos han desarrollado inmensas formas de adaptación. La principal estrategia adaptativa que desarrollaron es la síntesis de enzimas adaptadas al frío o enzimas psicrófilas.

Estas enzimas se caracterizan por poseer una alta eficiencia catalítica a suaves y bajas temperaturas. Debido a su alta actividad específica, que está asociado a la vez con una gran estabilidad catalítica en las mismas condiciones, ofrecen un gran potencial biotecnológico. Las bases moleculares de la adaptación al frío de algunas enzimas como tripsina proveniente de peces que habitan las aguas marinas del Noratlántico y Antártico han sido estudiadas.

La comparación de la estructura tridimensional de estas enzimas con sus homólogas mesófilas indican cambios moleculares que tienden a incrementar la flexibilidad de su estructura por un debilitamiento en las interacciones intramoleculares y por el aumento de interacciones con el solvente. Algunos peces, por su naturaleza poseen procesos metabólicos adaptados a bajas temperaturas y realizan sus actividades en altas concentraciones de sales, elevadas presiones hidrostáticas, pH's alcalinos e incluso condiciones anóxicas.

Bajo estas condiciones moderadamente «extremas» pueden producir una serie de metabolitos, entre ellas las enzimas extracelulares (Georlette et al., 2004; Hoyoux et al., 2004).

Bases Moleculares de Enzimas Adaptadas al Frío

Como regla, las enzimas adaptadas al frío muestran una alta eficiencia catalítica, sin embargo, asociada con baja termoestabilidad. En la mayoría de los casos la adaptación al frío se debe a una reducción en la energía de activación la cual se origina posiblemente a un aumento en la flexibilidad tanto en un área determinada de la proteína o en toda su estructura. Los psicrófilos tanto eucariotes como procariotes, han colonizado exitosamente los ambientes fríos, y esta adaptación requiere poseer un amplio ajuste tanto a nivel estructural como fisiológico, ésto, en orden de contrarrestar la reducción en porcentajes de reacción debido a las bajas temperaturas del hábitat (Lonhienne et al., 2002).

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes para la vida ya que influyen la mayoría de las reacciones bioquímicas. Las bajas temperaturas disminuyen e inhiben fuertemente la velocidad de reacción catalizada por enzimas, los “caballos de fuerza” del metabolismo celular. El efecto de la temperatura en reacciones químicas está descrita básicamente por la ecuación de Arrhenius: $k=Ae^{-Ea/RT}$, en donde k es la constante de velocidad, A es el factor de frecuencia el cual depende de la reacción, Ea es la energía de activación, R es la constante de los gases (8.31 kJmol^{-1}) y T es la temperatura en grados Kelvin. Por consiguiente, cualquier disminución en la temperatura inducirá una disminución exponencial en la velocidad de reacción, el grado del cual depende hasta cierto punto la energía de activación. El efecto relativo de la temperatura en la actividad de enzimas psicrófilas se ilustra en la Figura 1, en donde se compara la α -amilasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (círculos cerrados) contra su homóloga termoestable de *Bacillus amyloliquefaciens* (círculos abiertos) la cual revela que los psicrófilos sintetizan enzimas con mayor eficiencia catalítica (k_{cat}) (D'Amico et al., 2002).

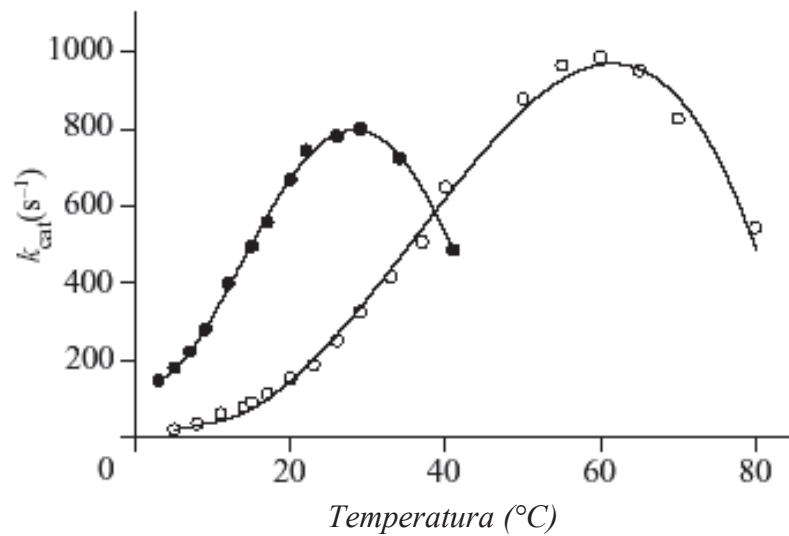


Figura 1.- Comparación del efecto de la temperatura en la actividad de dos enzimas homólogas. Las curvas representan la dependencia térmica de la actividad específica de la α -amilasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (círculos cerrados) vs su homóloga termoestables de *Bacillus amyloliquefaciens* (círculos abiertos) (D'Amico et al., 2002).

Una posible estrategia para contrarrestar el efecto negativo de la temperatura en la actividad enzimática podría ser el hecho de sintetizar mayor cantidad de enzima, pero esto implicaría un gasto energético muy grande.

Debido a esto, la estrategia comúnmente utilizada para mantener la actividad a bajas temperaturas es producir enzimas adaptadas al frío con un incremento en la eficiencia catalítica k_{cat}/K_m (Feller y Gerday, 1997).

Parámetros Cinéticos

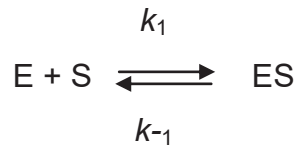
La cinética se encarga del estudio de la velocidad a la cual ocurren las reacciones. El estudio de la cinética enzimática abarca la catálisis enzimática en los sistemas biológicos y como es que la llevan a cabo. En general se busca conocer la velocidad máxima que una enzima pueda tener y su afinidad de unión con el sustrato e inhibidores. Aunado con estudios estructurales y químicos de las enzimas, se tiene un panorama más amplio sobre el mecanismo de catálisis de una enzima.

Considerando una reacción $A \rightarrow P$, en una gráfica de velocidad en función de la concentración de A, se obtiene una línea recta, que es denominada k y entre mayor sea la concentración de A mayor será la velocidad de reacción, v . Un análisis similar, en una reacción catalizada por una enzima en donde interviene un solo sustrato, se obtienen resultados diferentes.

En el caso de una reacción en donde se tienen bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato, siendo ésta una reacción de *primer orden*. Pero en esta reacción, la velocidad no aumenta proporcionalmente al aumento de la concentración de sustrato, sino que comienza a disminuir. En reacciones en donde se tienen altas concentraciones de sustrato, la velocidad se hace independiente de la concentración de sustrato y alcanza un límite máximo. El valor de la velocidad a este límite, es llamado *velocidad máxima* (V_{max}). En este

límite, la velocidad ya no es dependiente de la concentración de sustrato, por lo que la reacción catalizada por la enzima es de *orden cero*, es decir, la velocidad es independiente de la concentración del reactante (sustrato). En este tipo de comportamiento, en el que la velocidad no muestra un incremento aún si se aumenta la concentración del sustrato, es un sistema en el cual la enzima se encuentra en un estado de saturación (Garret y Grisham, 1999; Mathews, 2002).

En 1913, Lenore Michaelis y Maud Menten propusieron una teoría general de la acción de las enzimas, de acuerdo a la cinética enzimática. La teoría de Michaelis-Menten asume que la enzima E y su sustrato S se asocian de manera reversible para formar el complejo enzima-sustrato, ES:



Se asume que esta asociación-disociación alcanza un rápido equilibrio, y k_s es la constante de disociación de ES

$$k_{-1} [ES] = k_1 [E][S]$$

y

$$k_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

El producto P es formado en un segundo paso cuando ES se disocia para producir E + P.



E, se encuentra libre para interactuar con otra molécula de S.

Las interpretaciones de Michaelis y Menten fueron clarificadas por Briggs y Haldane, asumiendo que la [ES] alcanza rápidamente un valor constante en este sistema. ES se forma rápidamente a partir de E + S, así como desaparece en 2 caminos posibles: a partir de la disociación para regenerar E + S y reaccionando para formar E + P. A esto se le denomina *estado estacionario*, y se expresa como sigue:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Este es el cambio en concentración del complejo ES con respecto al tiempo, t , y es 0. Ahora, analizando el sistema descrito en la ecuación



Para describir la velocidad inicial, v en función de [S] y en cantidad de enzima, la cantidad total de enzima,

$$[E_T] = [E] + [ES]$$

En donde [E] = a la concentración de enzima liberada y [ES] es la concentración de enzima presente en el complejo enzima-sustrato. Por lo que en



La velocidad de formación de [ES] es

$$v_f = k_1 ([E_T] - [ES])[S]$$

en donde

$$[E_T] - [ES] = [E]$$

de la ecuación



La velocidad en la que desaparece [ES] es

$$v_d = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

El estado estacionario, $d[ES]/dt=0$, por lo tanto, $v_f=v_d$, entonces,

$$k_1([E_T] - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Reordenando se tiene,

$$\frac{([E_T] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

La relación de las constantes $(k_{-1} + k_2) / k_1$ se definen como la constante de Michaelis; K_m

$$K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

Notando, que de la ecuación

$$\frac{([E_T] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

K_m resulta de la relación de 2 concentraciones ($([E_T]-[ES])$ y $[S]$) a una ($[ES]$), por lo que K_m tiene unidades de molaridad. Transcribiendo la ecuación tenemos que

$$K_m = \frac{[E_T] - [ES] [S]}{[ES]}$$

Reordenando a

$$[ES] = \frac{[E_T] [S]}{K_m + [S]}$$

Ahora, el parámetro más importante en la cinética de una reacción es la velocidad de formación del producto. Esta velocidad está dada por,

$$v = \frac{d [P]}{dt}$$

y para esta reacción

$$v = k_2[ES]$$

Sustituyendo la expresión para [ES] de la ecuación $[ES] = [E_T] [S] / K_m + [S]$ en la ecuación anterior tenemos

$$v = \frac{k_2[E_T] [S]}{K_m + [S]}$$

El producto $k_2[E_T]$, tiene un significado especial. Cuando la [S] es suficientemente alta para saturar a la enzima, la velocidad de reacción v es máxima. Al estado de saturación, la cantidad de [ES] es igual a la concentración de enzima total; E_T . Ahora de la ecuación $v=k_2[ES]$, la velocidad inicial v , es igual a $k_2[E_T]=V_{max}$. Simbólicamente, cuando $[S] \gg [E_T]$ (y K_m), $[E_T] = [ES]$ y $v=V_{max}$. Por lo tanto,

$$V_{max} = k_2[E_T]$$

Sustituyendo esta relación en la expresión de v , obtenemos la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta ecuación nos dice que la velocidad de reacción catalizada por una enzima, v , en cualquier instante es determinada por dos constantes, K_m y V_{max} y la concentración de sustrato en ese instante.

Cuando $[S] = K_m$, $v = V_{max}/2$, reordenando la ecuación anterior, con estos datos, obtenemos:

$$K_m = [S] (V_{max} / v - 1)$$

Entonces, a $v = V_{max}/2$, $K_m = [S]$. Es decir, K_m se define como la concentración de sustrato que produce una velocidad igual a la mitad de la velocidad máxima.

En general, la ecuación de Michaelis-Menten muestra una hipérbola rectangular (Figura 2), y al obtener los valores de K_m y V_{max} , se puede estimar la afinidad de la enzima por un determinado sustrato, pero es importante tener en cuenta lo siguiente:

1.-La reacción debe involucrar solo a un sustrato, en el caso de que sea una reacción con múltiples sustratos, solo la concentración de uno de los sustratos varía mientras los demás se mantienen constantes.

2.-La reacción $ES \rightarrow E + P$ es irreversible, o se obtendrán solo velocidades donde $[P] = 0$.

3.- $[S]_0 > [E_T]$ y $[ET]$ se mantiene constante.

4.-Por último, todas las variables que puedan influir en la velocidad de la reacción se mantienen constantes, como la temperatura, pH, fuerza iónica, entre otros.

A partir de la ecuación de Michaelis-Menten podemos conocer el número de recambio de una enzima, k_{cat} , que es la medida de la máxima actividad catalítica que posee una enzima. k_{cat} se define como el número de moléculas de sustrato convertidas, por molécula de enzima a producto por unidad de tiempo, cuando la enzima se encuentra saturada. Para una reacción simple que presenta el comportamiento de la cinética de Michaelis, midiendo su velocidad

inicial, $k_2 = k_{cat}$, y conociendo la $[E_T]$ en la mezcla de reacción, k_{cat} se puede determinar a partir de V_{max} , en condiciones de saturación de sustrato, $[S]$, $v = V_{max} = k_2[E_T]$. Entonces,

$$k_2 = \frac{V_{max}}{[E_T]} = k_{cat}$$

Se puede tener cierta perspectiva respecto a la relación de k_{cat} / K_m . Esta relación es importante, ya que proporciona una medida directa de la eficiencia y la especificidad de la enzima. Muestra lo que la enzima y el sustrato pueden realizar cuando se disponen de lugares enzimáticos abundantes. Y permite una comparación directa de la eficacia de una enzima respecto a distintos sustratos (Mathews, 2002; Garret y Grisham, 1999).

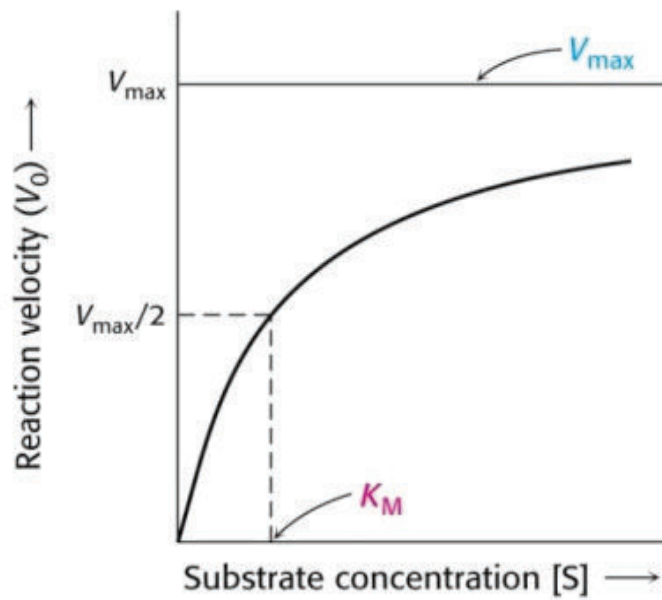


Figura 2.- Gráfica de Michaelis-Menten donde se observa el despliegue de una hipérbola, como resultado de la velocidad de reacción enzimática a diferentes concentraciones de sustrato.

(<http://en.wikibooks.org/wiki/Biochemistry-Catalysis>)

Debido a la dificultad de obtener las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) de la hipérbola rectangular, se han ideado algunos arreglos matemáticos para la ecuación de Michaelis-Menten que producen una línea recta, calculando fácilmente K_m y V_{max} . El más conocido de todos los arreglos, es la gráfica doble recíproca de Lineweaver-Burk. Tomando los inversos de ambos lados de la ecuación de Michaelis, se obtiene

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Este arreglo nos da la ecuación de una línea recta $y = mx + b$, donde: $y = 1/v$, $m = K_m/V_{max}$, $x = 1/[S]$ y $b = 1/V_{max}$. Graficando $1/v$ vs $1/[S]$ da una línea recta donde el intercepto y corresponde a $1/V_{max}$ y su pendiente es K_m/V_{max} (Figura 3).

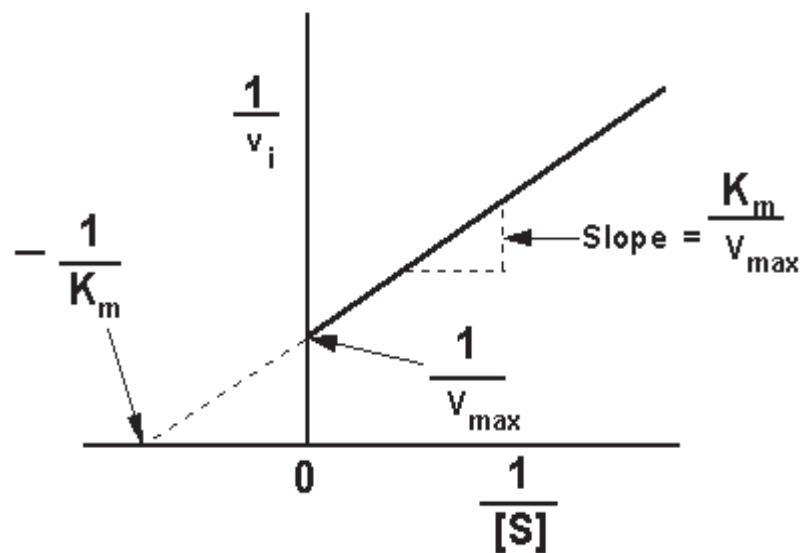


Figura 3.- Gráfica doble recíproca de Lineweaver-Burk, con los inversos de velocidad y concentración de sustrato correspondientes a la gráfica de Michaelis-Menten (www.indstate.edu/.../mwking/enzyme-kinetics.html).

En el caso de enzimas extracelulares que trabajan con concentraciones saturadas de sustrato, la adaptación consiste principalmente en aumentar la k_{cat} (Feller et al., 1994; Narinx et al., 1997; Petrescu et al., 2000).

Alternativamente en el caso de las enzimas intracelulares las cuales se enfrentan a bajas concentraciones de sustrato, hay una disminución en la K_m proporcionando una mayor afinidad por el sustrato (Kim et al., 1999; Bentahir et al., 2000; Georlette et al., 2000; Hoyoux et al., 2001). De acuerdo a Samalas et al., (2000) las enzimas adaptadas al frío optimizan su eficiencia catalítica aumentando la k_{cat} y disminuyendo K_m .

El número de recambio o k_{cat} corresponde al máximo número de moléculas de sustrato convertidas a producto por unidad de tiempo. De acuerdo al mecanismo de Michaelis-Menten el parámetro de k_{cat} es la constante de velocidad de primer orden de la conversión química del complejo enzima-sustrato a enzima y producto.

Teoría del estado de transición.- ésta teoría asume, que durante la conversión del complejo enzima-sustrato a enzima mas producto, el complejo activado enzima-sustrato ($ES^\#$) se encuentra en equilibrio con el estado basal del mismo complejo (ES), lo cual se representa en la Figura 4.

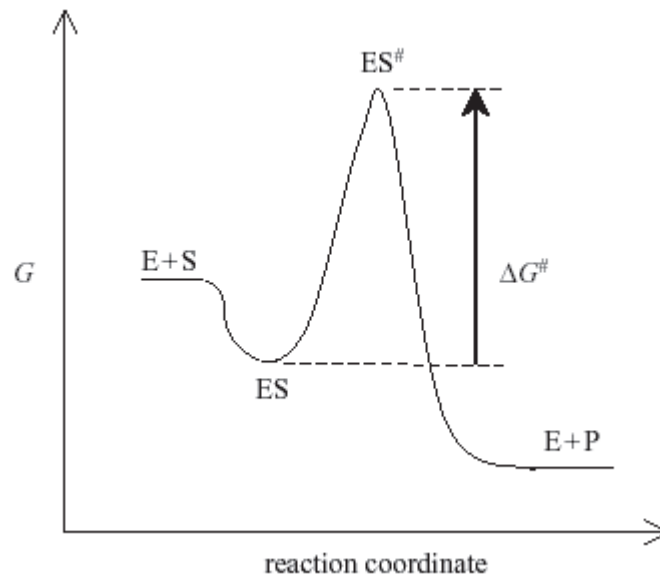


Figura 4.- Teoría del estado de transición. La energía libre de activación o de Gibbs cambia durante la reacción. E= enzima, S= sustrato, P= producto, ΔG^\ddagger = energía libre de activación, ES= estado basal del complejo enzima-sustrato, ES^\ddagger = estado activado del complejo enzima-sustrato.

Parámetros termodinámicos del proceso de activación de una reacción enzimática.- Los parámetros termodinámicos de activación son ΔG^* (energía libre de activación), ΔH^* (entalpía de activación) y ΔS^* (entropía de activación), los cuales se calculan a partir de la ecuación de Arrhenius.

$$E_a = \Delta H^* + RT$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$$

$$\Delta G^* = RT \times \left(\ln \frac{k_B T}{h} - \ln k_{cat} \right)$$

en donde R es la constante de los gases ($8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), k_B es la constante de Boltzmann ($1.3805 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h es la constante de Planck ($6.6256 \times 10^{-34} \text{ J s}$) y T, la temperatura en Kelvins y k_{cat} la constante de catálisis de la disociación del complejo enzima-sustrato para formar producto. El análisis de las diferencias entre los parámetros de activación de enzimas psicrófilas y su homólogas mesófilas, llamadas $\Delta(\Delta G^*)^{p-m}$, $\Delta(\Delta H^*)^{p-m}$ y $T\Delta(\Delta S^*)^{p-m}$ es muy importante ya que reflejan las diferencias que existen entre enzimas psicrófilas y mesófilas.

Las enzimas psicrófilas reducen la barrera de energía libre de activación, es decir $\Delta(\Delta G^*)^{p-m}$ tiene un valor negativo, lo que permite que mayor cantidad de moléculas crucen el camino de reacción. Dos factores contribuyen a este efecto, el factor entálpico (ΔH^*) y el factor entrópico (ΔS^*).

La diferencia de los parámetros entálpicos, $\Delta(\Delta H^*)^{p-m}$ reflejan la diferencia en energía de activación (E_a). Valores negativos de $\Delta(\Delta H^*)^{p-m}$ son característicos de las enzimas adaptadas al frío y es el parámetro más útil para identificar esta adaptación, ya que refleja el hecho de que una enzima psicrófila tenga una menor energía de activación que su análoga mesófila y de manera consecuente mantenga mayor actividad catalítica a bajas temperaturas.

El parámetro entrópico, refleja la flexibilidad conformacional del sitio activo el cual es menos restringido en enzimas psicrófilas y por lo tanto el parámetro $\Delta(\Delta S^*)^{p-m}$ siempre es un valor negativo.

El término de entalpía es más significativo a bajas temperaturas ya que refleja la disminución de la energía de activación. Parece ser que los cambios estructurales han evolucionado para disminuir el ΔH^* o E_a , con el fin de reducir la dependencia de k_{cat} sobre la temperatura (Lonhienne et al, 2000).

La disminución correspondiente a la energía de activación es estructuralmente debida a una disminución en el número o en la fuerza de las interacciones entálpicas las cuales se deben de romper durante los pasos de activación. Estas interacciones inicialmente contribuyen a la estabilidad estructural de la proteína, y la alteración de éstas resulta en un incremento en la flexibilidad de ciertos dominios estructurales que son involucrados en la catálisis. Como consecuencia de esta flexibilidad del sitio activo, el estado basal del complejo enzima-sustrato ocupa una distribución más amplia del estado conformacional lo que se traduce en un aumento en la entropía de este estado cuando se compara con enzimas mesófilas, obteniendo un valor negativo en $\Delta(\Delta S^*)^{p-m}$, como ya se mencionó (Lonhienne et al., 2002).

El Dr. Bercovich (Biosidus) explica que las enzimas psicrófilas que catalizan y cumplen su trabajo bioquímico en “frío” pueden ser aplicadas para reemplazar muchos procesos industriales hoy en uso. Una de las alternativas viables para mejorar la eficiencia, reducir los costos y aumentar la disponibilidad de algunas enzimas de interés industrial, es el de buscar y seleccionar organismos con altas capacidades de producción, asimismo, es de suma importancia evaluar sus condiciones óptimas de producción, actividades enzimáticas, con el fin de aislar y purificar proteasas que pudieran ser psicrófilas, con aplicación biotecnológica (<http://antarticos.blogspot.com/2006/06/estudios-sobre-aplicaciones.html>).

Purificación de Proteínas

En general, las proteínas son purificadas por medio de procedimientos subsecuentes de fraccionación en una serie de etapas independientes. Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de interés se utilizan para separarlas progresivamente de otras sustancias. Las características de las proteínas que se utilizan en los distintos procedimientos de separación son: solubilidad, carga iónica, tamaño molecular, propiedades de adsorción y propiedades de uniones específicas con otras macromoléculas (Voet y Voet, 2003). La mayoría de los protocolos de purificación de enzimas contemplan al menos las siguientes etapas: extracción, técnicas de precipitación de proteínas, métodos cromatográficos de separación, electroforesis y técnicas para la cuantificación de actividad y concentración de proteína en las diferentes etapas de la purificación que dan una idea del grado de pureza que se va logrando. Es muy importante en los procesos de purificación de enzimas mantener la temperatura baja (0-4 °C) en todo momento, con el fin de estabilizar a la enzima y conservar al máximo su actividad, además de que también se inhibe el desarrollo microbiano que podría afectarlas (Scopes, 1994; Janson y Rydén, 1999).

Extracción

Normalmente en los procedimientos de extracción de enzimas se utilizan solventes adecuados a la enzima por extraer, de acuerdo a su solubilidad y al sitio o tejido donde se encuentre la enzima. Comúnmente se utilizan volúmenes de líquido de extracción en relación de 1 a 5 veces el peso del tejido.

Generalmente el líquido de extracción es un amortiguador para mantener el pH y la fuerza iónica de acuerdo a las características de la enzima a extraer (Janson y Rydén, 1999). En los procedimientos de extracción normalmente la

enzima de interés va acompañada de otras moléculas por lo que las condiciones de extracción deben favorecer la liberación al máximo de la enzima deseada independientemente de que se liberen conjuntamente una gran cantidad de contaminantes, los cuales podrán ser removidos en las etapas consecutivas de purificación (Scopes, 1994; Janson y Rydén, 1999).

Precipitación

Una de las técnicas más utilizadas para la precipitación de enzimas es la llamada “salting out”. Se realiza agregando altas concentraciones de sales a la solución en la que se encuentra la proteína para su precipitación. La precipitación por disminución de la solubilidad de la proteína de interés se efectúa por medio de un agente precipitante y esta solubilidad está determinada por el grado de hidratación de las moléculas. El hecho de que las proteínas sean anfotéricas se debe a que en sus superficies presentan regiones hidrofóbicas y regiones hidrofílicas cargadas ya sea positiva o negativamente.

Cuando se agrega un agente precipitante a la solución, las proteínas que presentan mayor hidrofobicidad, por contar con mayor número de aminoácidos hidrofóbicos en su superficie, precipitan más fácilmente que las de menor hidrofobicidad (Whitaker, 1994; Alberts, 2004).

Métodos Cromatográficos

La cromatografía es un grupo de técnicas de separación de moléculas ampliamente utilizada en los procesos de purificación de proteínas. Estas técnicas de separación se basan en la distribución de las moléculas a ser separadas entre dos fases, una móvil y otra estacionaria. El fundamento de la separación está en la mayor o menor tendencia que presentan las moléculas a permanecer en la fase estacionaria o en la fase móvil. La forma más común de

implementar las técnicas cromatográficas es a través de una columna, donde se empaca la fase estacionaria y se hace pasar por ella la fase móvil. En las separaciones de proteínas la fase móvil siempre es un líquido y por lo tanto se conoce como cromatografía líquida. Las características de las proteínas definen en gran medida el tipo de cromatografía líquida a ser utilizada en su separación y difieren principalmente en el tipo de fase estacionaria utilizada (Voet y Voet, 2003; Alberts, 2004).

Cromatografía de exclusión molecular.- Llamada también cromatografía de filtración en gel, de tamiz molecular o exclusión de tamaño, es una técnica basada en la separación de partículas en base a su tamaño. La fase estacionaria consiste de pequeñas esferas de material poroso compuesto de polímeros de dextrán (Sephadex), agarosa (Sephacrosa) o poliacrilamida (Sephacril o Bio-gel). El fundamento de este tipo de separación se basa en que las moléculas de mayor tamaño molecular no se introducen en los poros del material de la fase estacionaria y son arrastrados por la fase móvil por fuera de las esferas de la fase estacionaria y avanzan más rápido que las pequeñas que penetran en las esferas por difusión a través de los pequeños poros de la fase estacionaria, reteniéndose más tiempo en atravesar la columna (Whitaker, 1994; Alberts, 2004).

Enzimas a nivel Industrial

Debido a su origen biológico, las enzimas actúan en medios acuosos, en condiciones suaves de temperatura y pH, por lo que no requieren el uso de disolventes orgánicos potencialmente peligrosos o contaminantes, ni grandes aportes de energía necesarios para alcanzar temperaturas elevadas. En algunos casos, la producción de ciertos compuestos por medio de tecnologías enzimáticas puede llegar a minimizar el requerimiento energético hasta un 60%

y disminuir el gasto de agua hasta el 80%. Por ejemplo, la fabricación de poliésteres y polímeros acrílicos utilizando procesos biocatalíticos basados en la utilización de lipasas reducen la temperatura de reacción de polimerización de 200 °C a 60 °C y se elimina el uso de disolventes orgánicos. En cuanto a los residuos que se producen, suelen ser en cantidades relativamente pequeñas y además se trata de compuestos biodegradables que pueden ser reciclados o vertidos sin tratamientos excesivos. Las ventas de enzimas industriales en la actualidad alcanzan los 2, 000 millones de dólares americanos anuales, con más de 500 productos para más de 50 aplicaciones principales.

Aproximadamente el 75% de estas enzimas son lo que se denominan enzimas técnicas, utilizadas en detergentes, industria textil, del procesado de almidón y en la producción de alimentos. Se trata principalmente de enzimas hidrolíticas como proteasas. Existen otras enzimas que constituyen un 10% del mercado cuyo uso se enmarca en el desarrollo de nuevos fármacos, diagnóstico médico y otros usos analíticos (ej. peroxidasas, esterases, liasas y oxidoreductasas). De todas las enzimas comercializadas el 60% son producto de la biotecnología moderna. Otras aplicaciones que se están desarrollando son el uso de enzimas en producción, degradación y biotransformación de productos químicos entre otros. En otros casos, como las enzimas que se usan para detergentes por ejemplo, se necesitan en grandes cantidades, siendo necesario que su obtención sea económica (Galán et al., 2006).

Muchos de esos procesos son en su forma actual contaminantes o caros en términos energéticos. Y reemplazarlos con enzimas psicrófilas sería una excelente oportunidad de negocios y para el medio ambiente. De hecho, el mercado de enzimas en el mundo ya factura alrededor de \$2.000 millones de dólares anuales. Y el de enzimas extremófilas adaptadas al frío ronda los \$ 250 millones de dólares, pero está en pleno crecimiento y está siendo liderado por países como EE.UU., Japón y Corea (Galán et al., 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la Muestra

Los ejemplares de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) (50 kg) fueron proporcionados por la empresa Productos Pesqueros de Guaymas S.A., la sardina, con aproximadamente 7 horas de haber sido capturada, se colectó directamente de la bodega del barco sardinero, donde se mantuvo a 8 °C desde su captura. La muestra se colocó en abundante hielo y se transportó al Laboratorio de Investigación de la Academia de Tecnología de Alimentos del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora.

Una vez en el laboratorio, la mitad del lote se evisceró en frío con cuidado de no afectar el tracto digestivo, ni otros órganos para evitar contaminaciones o pérdida de enzimas. De las vísceras obtenidas se separaron los ciegos pilóricos y se colocaron en bolsas de polietileno con cierre hermético conteniendo aproximadamente 100 g cada una y se congelaron inmediatamente a -30°C hasta el momento de su utilización.

Extracción y Purificación de Tripsina

Preparación del Extracto Crudo de Ciegos Pilóricos

El extracto crudo de enzimas se preparó homogenizando 80 g de ciegos pilóricos con 200 mL de buffer de extracción (Tris/HCl 50 mM pH 7.5 + CaCl₂ 10 mM + NaCl 0.15 M) durante 1 minuto, en intervalos de 15 segundos, para posteriormente centrifugar a 17,300 x g por 60 minutos. Después se recuperó el sobrenadante que es donde se encuentran las enzimas digestivas (Martínez y Serra, 1989).

Fraccionación con Sulfato de Amonio

El extracto crudo de enzimas de los ciegos pilóricos se sometió a precipitación con sulfato de amonio, añadiendo éste de manera lenta y en frío hasta alcanzar el 70% de saturación en la solución; posteriormente se centrifugó a 17,300 x g por 60 minutos; se colectó el precipitado y se disolvió en 25 mL de buffer Tris·HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M (Janson y Rydén, 1998; Castillo-Yáñez et al., 2005).

Cromatografía de Filtración en Gel

La solución obtenida a partir del fraccionamiento con sulfato de amonio se dializó y se sometió a cromatografía de filtración en gel, utilizando como fase estacionaria Sephadex G-75, empacado en una columna de 1.6 x 70 cm.

En esta cromatografía se separaron proteínas de peso molecular mayor a 60 kDa, de las proteínas de menor peso molecular (entre 10 y ~ 60 kDa), donde se encuentra la enzima de interés. Como fase móvil se utilizó el amortiguador Tris·HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 0.15 M, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, colectándose fracciones de 5 mL (Castillo-Yañez et al., 2005). A las fracciones obtenidas se les determinó proteína, midiendo directamente la absorbancia a 280 nm así como por el método de Bradford (1976); también se evaluó actividad específica tipo tripsina, utilizando benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) como sustrato específico, siguiendo el método de Erlanger et al., 1961. Los patrones electroforéticos de las fracciones se analizaron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 12% (Laemmli, 1970).

Las fracciones con actividad específica tipo tripsina, obtenidas de la cromatografía de filtración en gel, se dializaron y liofilizaron; posteriormente se sometieron a otro proceso cromatográfico utilizando como matriz Sephacryl-100. La resina se empacó en una columna de 1.6 x 20 cm y la corrida se llevó

a cabo utilizando como fase móvil el amortiguador Tris·HCl 50 mM pH 7.5, utilizando una velocidad de flujo de 0.25 mL/min y colectando fracciones de 5 mL. La concentración de proteína, la actividad específica y la electroforesis de las fracciones obtenidas, se realizaron utilizando las mismas técnicas y condiciones que en las fracciones obtenidas en la cromatografía de filtración en gel (Castillo-Yáñez et al., 2005).

Las fracciones con mayor concentración de tripsina se congelaron por 24 horas a -30 °C para posteriormente liofilizarlas. Ya liofilizada la muestra se dializó y se rehidrató con agua ultrapura para llevar a cabo la determinación de las constantes cinéticas.

Determinación de Constantes Cinéticas de Tripsina

Características Cinéticas

La evaluación de la cinética de la enzima tripsina aislada de las vísceras de sardina Monterey y tripsina bovina consistió en la determinación de la constante de Michaelis y Menten (K_m), velocidad máxima (V_{max}) y constante de catálisis (k_{cat}). Estas constantes se obtuvieron midiendo la velocidad inicial de reacción de cada enzima con diferentes concentraciones del sustrato específico y diferentes temperaturas bajo condiciones controladas de pH y fuerza iónica.

Las concentraciones de sustrato para este ensayo fueron de 10 a 1000 μ M de BAPNA para tripsina y las temperaturas fueron de 4-50°C. La K_m y V_{max} , se calculó posteriormente mediante un análisis de regresión no lineal de las gráficas de velocidad contra concentración de sustrato (Gráfica de Michaelis-Menten), utilizando el programa "Graph Pad Prism 2" (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). El número de recambio o constante de catálisis k_{cat} se obtuvo mediante la división de la V_{max} entre la concentración molar de la enzima respectiva en el medio de reacción. Las concentración molar de tripsina de

sardina se estimó usando su peso molecular determinado por SDS-PAGE (Castillo-Yáñez et al, 2005) y en el caso de tripsina bovina se utilizó el determinado por la casa comercial SIGMA-ALDRICH..

Parámetros Termodinámicos del Proceso de Activación de la Reacción Enzimática de Tripsina Bovina y de Sardina Monterey.

Ya obtenidas las constantes cinéticas se continuó con la determinación de la energía de activación (E_a) y el factor de frecuencia (A) mediante la ecuación de Arrhenius en base a los valores de k_{cat} a las distintas temperaturas graficando el $\ln k = \ln k_{cat}$ contra el inverso de cada una de las temperaturas.

$$\ln k = - E_a/RT + \ln A$$

Obtenidos los datos anteriores se sustituyeron los valores de E_a en las siguientes ecuaciones para determinar ΔH^* , ΔS^* y ΔG^* , valores que corresponden al cambio en la entalpía del proceso de activación, cambio en la entropía del proceso de activación y el cambio en energía libre del proceso de activación, respectivamente (Lohienne et al., 2002).

$$E_a = \Delta H^* + RT$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$$

$$\Delta G^* = RT \times \left(\ln \frac{k_B T}{h} - \ln k_{cat} \right)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de Tripsina

Se purificó tripsina a partir de 86 gr de ciegos pilóricos, la enzima fue separada del resto de las moléculas del extracto crudo mediante cromatografía de exclusión molecular; las fracciones con mayor actividad tipo tripsina fueron colectadas y se sometieron a una columna de Sephacryl-100. El volumen del extracto crudo (ciegos pilóricos homogenizados con el buffer de extracción) obtenido en ésta purificación fue de 195 mL, volumen semejante al obtenido en otras purificaciones utilizando la misma metodología, solo que en esta ocasión se tuvo una mayor cantidad de grasa la cual se eliminó utilizando cloroformo.

Los valores de proteína total para este extracto fue de 293 mg y una concentración de 1.5 mg/mL, con actividad específica tipo tripsina de 0.7 U/mg, la cual es 1.4 veces mayor a la actividad de los extractos obtenidos por Castillo-Yáñez et al., en el 2004 (de 0.5 U/mg). En la etapa final de purificación de la enzima se obtuvo una actividad tipo tripsina de 1 U/mg, 1.4 veces mayor que la actividad inicial, con el 0.3% de recuperación de proteína en 2 mL totales, con una concentración de 0.6 mg/mL. Estos valores son semejantes a los reportados en el 2004 por Castillo-Yáñez et al., sin embargo mostrando una ligera diferencia en el porcentaje de recuperación en donde en este caso fue mucho menor, lo cual se puede deber a una pérdida proteica durante las cuatro etapas del aislamiento y purificación de la enzima. En la Tabla I se muestra el resumen del proceso de purificación de tripsina, y en la Figura 5 se puede apreciar el perfil electroforético característico de la enzima, bajo condiciones desnaturalizantes; una banda de aproximadamente 25 KDa y 62 KDa que corresponden al monómero de tripsina y al dímero de la misma respectivamente. Este perfil es similar al reportado por Castillo-Yáñez en el 2004 así como a trabajos previos reportados en el 2007 y 2008 por Quintero. A

pesar de que el porcentaje de recuperación de la enzima obtenido de las fracciones con sulfato de amonio comparado con el proceso final de purificación (cromatografía de exclusión molecular Sephacryl-100) es menor, se tiene actividad tipo tripsina con un valor de 1 U/mg, valor 1.4 veces mayor al de las fracciones obtenidas por sulfato de amonio, aunque 9 veces menor a lo reportado por Heu et al. (1995) para el caso de tripsina de anchoveta (*Engraulis japonica*). En cuanto al porcentaje de recuperación de tripsina (0.3%) fue 2 veces menor que el reportado para tripsina de bacalao (0.7%) (Outzen, 1996) y para el caso de la concentración de tripsina obtenido en éste trabajo fue 1.5 veces mayor que el obtenido por Castillo et al.; en el 2004 (0.3 y 0.2 mg/mL respectivamente) y una diferencia de 1.6 veces en cuanto a la proteína total obtenida (1.0 y 0.6 mg de proteína total respectivamente). De acuerdo a los valores obtenidos en proteína total y por mililitro, así como en la recuperación y rendimiento de tripsina de sardina monterey se puede decir que son valores semejantes a los reportados por otros autores, además de ser cantidades suficientes para llevar a cabo los ensayos cinéticos para esta proteína.

Tabla I.- Valores de proteína y actividad enzimática obtenidos en el proceso de purificación de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

Etapa de purificación	Volumen total (mL)	Proteína total (mg)	Proteína (mg/mL)	A.T. (U)	A.E. (U/mg)	% Recuperación	Aumento en A.E.
Extracto crudo	195	293	1.5	205	0.7	100	1
Fracción a partir de S.A.	48	58	1.2	41	0.7	20	1
F.G. Sephadex G-75	2	2.4	1.2	2	0.7	1	1
S-100	2	0.6	0.3	0.6	1	0.3	1.5

U = μ mol de nitroanilina por minuto

S.A. = sulfato de amonio

A.T. = actividad total

A.E. = actividad específica

F.G. = filtración en gel

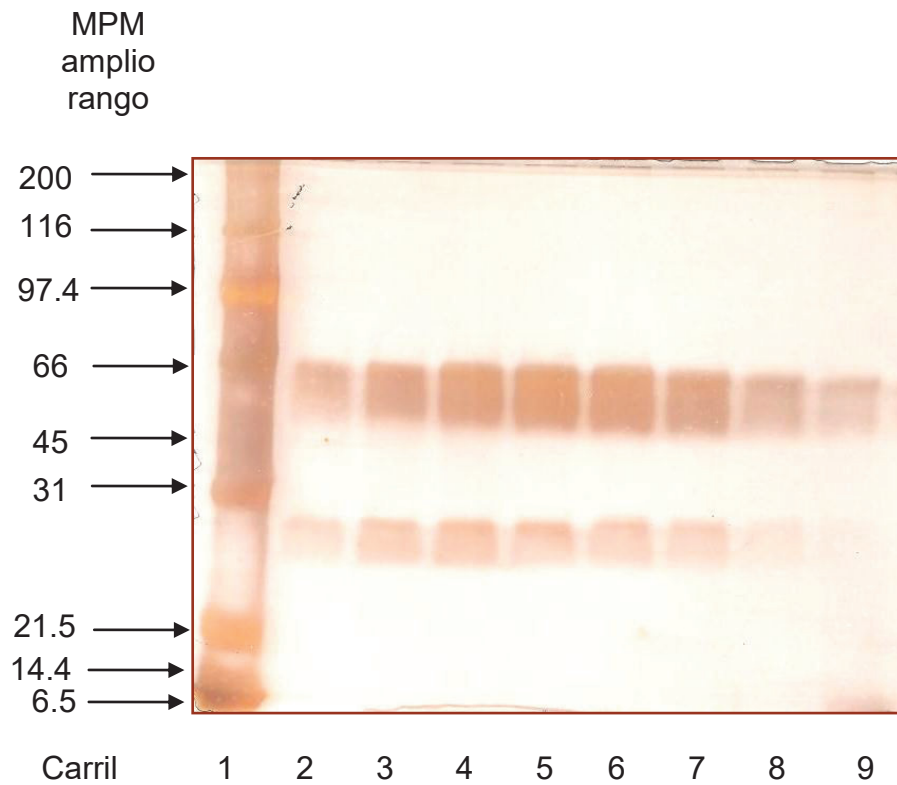


Figura 5.- Electroforesis en condiciones desnaturizantes, al 12% de acrilamida. En el carril 1 se tiene marcador de peso molecular de amplio rango, en los carriles 2 a 9 se tienen las fracciones provenientes de la cromatografía de exclusión molecular Sephacryl-100 donde se observa una banda de aproximadamente 25 kDa correspondiente al monómero de tripsina y una banda de aproximadamente 62 kDa correspondiente al dímero de la misma.

Determinación de Constantes Cinéticas

Los valores obtenidos de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ y k_{cat} para tripsina de sardina Monterey se presentan en la Tabla II y para tripsina bovina se presentan en la Tabla III; las gráficas obtenidas para cada temperatura tanto de tripsina de sardina Monterey como de tripsina bovina se muestran en la Figura 6 y 7, respectivamente. La velocidad de reacción para ambas enzimas mostraron un comportamiento típico del mecanismo descrito por Michaelis-Menten.

Los valores de K_m a 30°C fueron de 0.14 mM y 0.87 mM para tripsina de sardina y bovina respectivamente; valores similares a los reportados por Castillo et al., en el 2004 (0.05mM tripsina sardina y 0.93 mM tripsina bovina), a la vez son similares a los datos reportados para *Ciprinus carpio* (0.04mM), *Engraulis japonica* (0.05mM). (Cohen et al.; 1981; Heu et al., 1995).

Comparando los datos de K_m de tripsina de sardina y tripsina bovina, nos revelan que la tripsina de sardina Monterey presenta valores mucho menores a los de tripsina bovina, lo cual nos indica, que posee mayor afinidad por el sustrato, ya que un valor de K_m elevado significa que k_1 es mucho mayor que k_{-1} y el sustrato se une de forma fuerte. En principio esto resulta desfavorable para la velocidad de reacción, ya que un valor bajo en K_m , implica una disminución en la eficiencia catalítica de una enzima, debido a que aumenta ΔG^* tal y como se puede observar en la Figura 8. Sin embargo otro parámetro cinético importante es la constante de catálisis o k_{cat} , valor que corresponde al número máximo de moléculas convertidos a producto por unidad de tiempo.

Éste parámetro es favorable para la eficiencia catalítica de enzimas psicrófilas, ya que a mayor k_{cat} , mayor velocidad de reacción, en éste caso, k_{cat} es significativamente más alta por parte de tripsina de sardina que por tripsina bovina (Tabla IV), sobre todo a las temperaturas bajas, por lo que k_{cat} es favorable y K_m desfavorable para tripsina de sardina Monterey, lo que nos

indica que tripsina de sardina Monterey hidroliza con mayor rapidez al sustrato BAPNA que la tripsina bovina.

En resumen, no se puede evaluar la eficiencia catalítica de una enzima tomando por separados los valores de K_m y k_{cat} , sino que el mejor parámetro para medir la eficiencia catalítica es la razón k_{cat}/K_m , en donde a mayor valor mayor formación de producto, y en éste caso se puede observar en la Tabla V, que la eficiencia catalítica de tripsina de sardina Monterey es mayor que tripsina bovina en más de un orden de magnitud. Éste resultado soporta la hipótesis de que la enzima tripsina de sardina Monterey es una enzima adaptada al frío.

Tabla II.- Constantes cinéticas de tripsina de sardina Monterey a diferentes temperaturas.

Tripsina de sardina Monterey	Temperatura					
	4 °C	10°C	20°C	30°C	40°C	50°C
K_m (mM)	0.09	0.13	0.10	0.14	0.25	0.35
k_{cat} (seg ⁻¹)	1.2	1.4	2.4	3.4	6.1	8.6
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/seg)	0.12	0.14	0.24	0.34	0.61	0.86

Tabla III.- Constantes cinéticas de tripsina bovina a diferentes temperaturas.

Tripsina bovina	Temperatura					
	4 °C	10°C	20°C	30°C	40°C	50°C
K_m (mM)	1.10	0.73	0.70	0.87	1.26	0.96
k_{cat} (seg ⁻¹)	0.31	0.33	0.45	0.98	1.6	1.6
$V_{máx}$ (mM/seg)	0.13	0.14	0.19	0.41	0.67	0.7

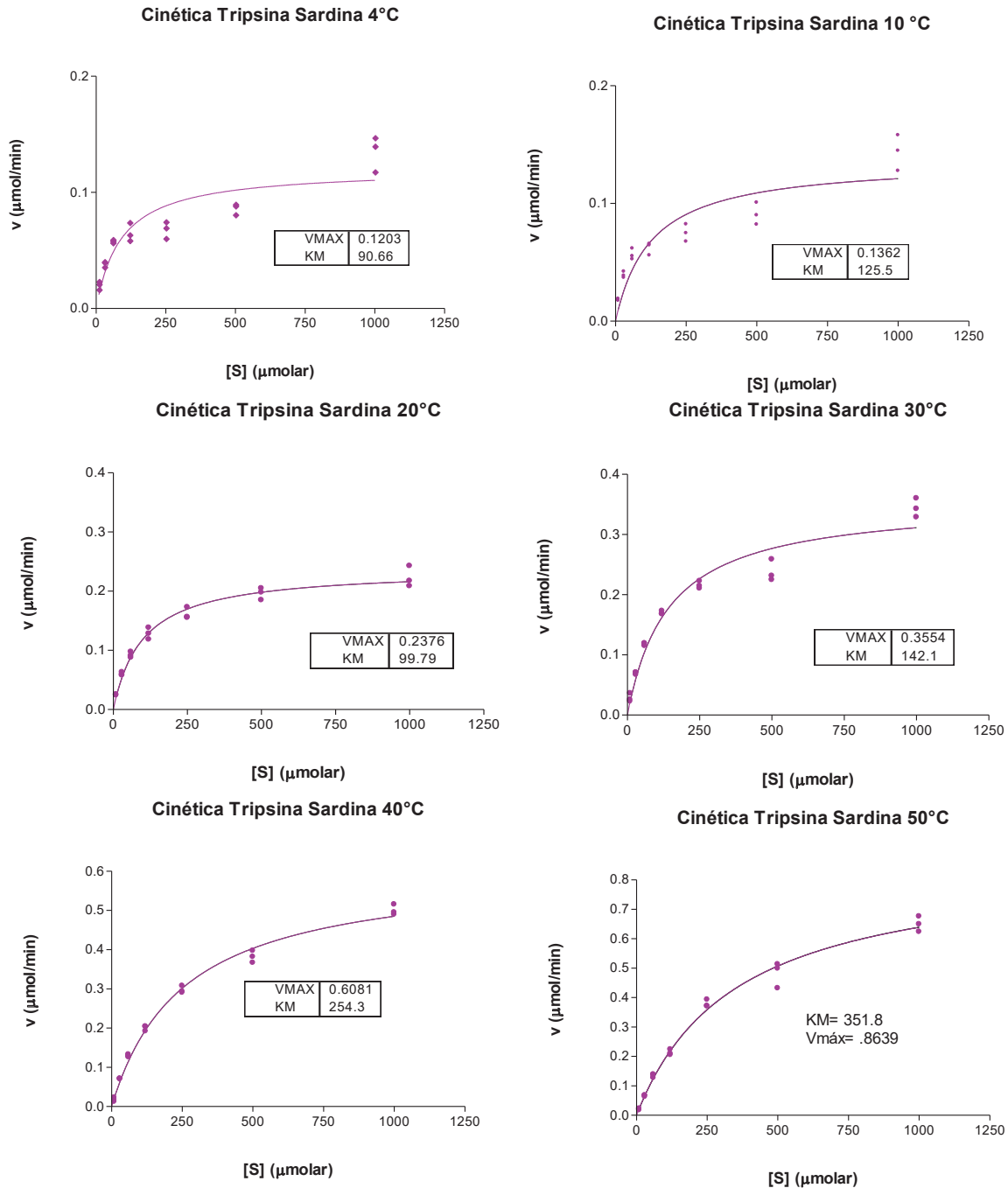


Figura 6.- Grafica de Michaelis-Menten para determinar las constantes cinéticas de tripsina de sardina. Concentración de sustrato (BAPNA): 10 μM a 1000 μM , concentración de enzima: 0.1 μM , buffer: Tris/HCl 1 mM, pH 8.0 CaCl_2 20 mM, T°C: 4 - 50°C, tiempo de reacción: 5 minutos.

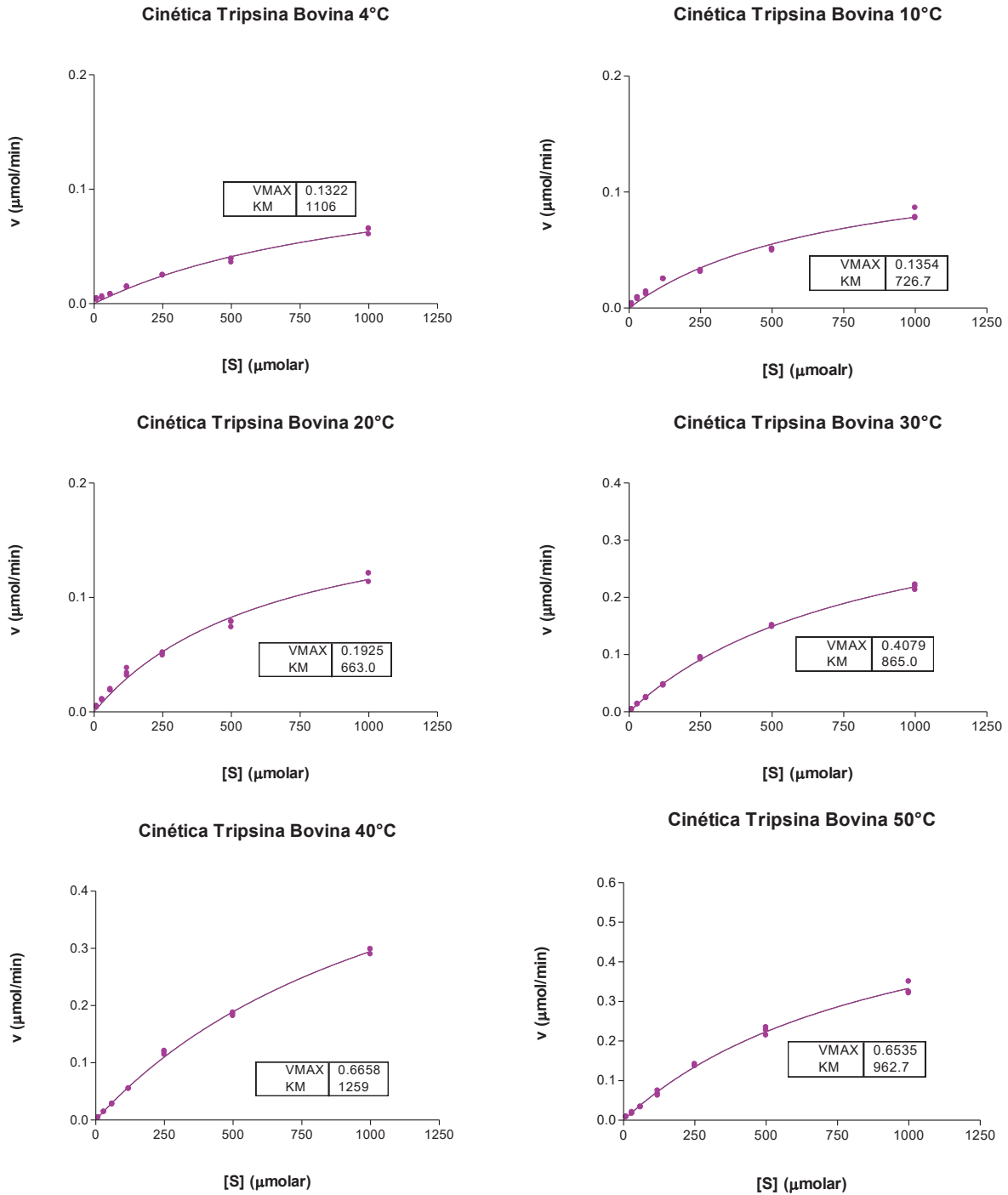


Figura 7.- Grafica de Michaelis-Menten para determinar las constantes cinéticas de tripsina bovina. Concentración de sustrato (BAPNA): 10 μM a 1000 μM , concentración de enzima: 0.4 μM , buffer Tris/HCl 1 mM, pH 8.0 CaCl_2 20 mM, T°C: 4- 50°C, tiempo de reacción: 5 minutos.

Tabla IV.- Comparación de valores obtenidos de la constante de catálisis (k_{cat}) entre tripsina de sardina Monterey y tripsina bovina a distintas temperaturas.

T°C	k_{cat} (seg ⁻¹) Tripsina Sardina Monterey	k_{cat} (seg ⁻¹) Tripsina Bovina
4	1.2	
10	1.4	0.33
20	2.4	0.45
30	3.4	0.98
40	6.1	1.6
50	8.6	

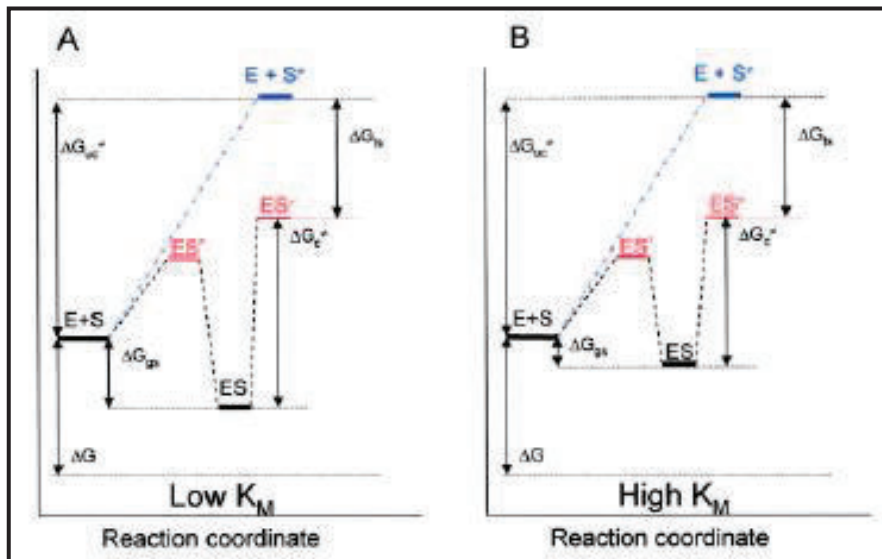


Figura 8.- Representación esquemática de uniones débiles entre una enzima y su sustrato, en donde la energía de unión intrínseca del complejo enzima-sustrato, es compensada de alguna manera por la pérdida de entropía debido a la unión de la enzima y el sustrato. Si la unión de la enzima al sustrato es muy fuerte, la barrera de activación sería comparable al de una reacción no enzimática (A). Cuando una enzima cumple las condiciones de Michaelis-Menten para llegar al equilibrio de una manera rápida ($k_1 \gg k_2$), entonces el ΔG^* tiende a 0, lo cual desde el punto de vista cinético, es óptimo (B) (Aledo et al., 2003).

Tabla V.- Comparación de valores obtenidos de la eficiencia catalítica k_{cat}/K_m entre tripsina de sardina Monterey y tripsina bovina a distintas temperaturas.

T°C	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ seg ⁻¹) Tripsina Sardina Monterey	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ seg ⁻¹) Tripsina Bovina
4	13.33	
10	10.77	0.45
20	24.0	0.64
30	24.3	1.22
40	24.4	1.27
50	24.6	

Parámetros Termodinámicos del Proceso de Activación de la Reacción Enzimática de Tripsina Bovina y de Sardina Monterey

Obtenidas las constantes cinéticas, específicamente k_{cat} , y con el fin de conocer el efecto de la temperatura en la velocidad de reacción de la hidrólisis de BAPNA por parte de tripsina de sardina Monterey y bovina se utilizó a la ecuación de Arrhenius para obtener los valores de Ea y A :

$$k = A e^{-Ea/RT}$$

en donde Ea corresponde a la energía de activación, R es la constante de los gases ($8.3145 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$), A es el factor de frecuencia y k la constante de velocidad de la reacción. Para obtener la Ea para ambas enzimas se graficó el logaritmo natural de k_{cat} de cada temperatura, contra el inverso de las mismas; los datos correspondientes a tripsina de sardina Monterey y tripsina bovina se pueden observar en la Tabla VI y VII respectivamente. Los valores de Ea para tripsina de sardina Monterey y tripsina bovina fueron de 32.5 kJ/mol y 40.18 kJ/mol respectivamente, en la Figura 9 (tripsina sardina) y 10 (tripsina bovina) se presentan las gráficas de Arrhenius de ambas enzimas. A partir de estas gráficas y de acuerdo a Lonhienne et al. (2000), se obtuvieron los parámetros termodinámicos del proceso de activación: el ΔG^* (cambio en energía libre del proceso de activación), ΔH^* (cambio en la entalpía del proceso de activación) y ΔS^* (cambio en la entropía del proceso de activación) a 5°C y 15°C , los valores se presentan en la Tabla VIII. El análisis de estos parámetros como valores absolutos no son tan relevantes como la comparación de éstos contra enzimas homólogas y es por esto que se llevó a cabo la comparación de los parámetros de tripsina bovina y tripsina de sardina.

Tabla VI.- Logaritmo natural de las constantes de catálisis obtenidas a temperaturas de 4 a 50°C de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

T°C	<i>k</i>_{cat} (seg-1)	ln <i>k</i>_{cat}	T (K)	1/T(K)
4	1.2	0.1823	277.15	0.003608
10	1.4	0.3365	283.15	0.003532
20	2.4	0.8755	293.15	0.003411
30	3.4	1.2238	303.15	0.003299
40	6.1	1.8083	313.15	0.003193
50	8.6	2.1518	323.15	0.003095

Tabla VII.- Logaritmo natural de las constantes de catálisis obtenidas a temperaturas de 10 a 40°C de tripsina bovina.

T°C	<i>k</i>_{cat} (seg-1)	ln <i>k</i>_{cat}	T (K)	1/T(K)
10	0.3333	-1.0987	283.15	0.003532
20	0.4524	-0.7932	293.15	0.003411
30	0.9762	-0.0241	303.15	0.003299
40	1.5952	0.4670	313.15	0.003193

Los valores de los parámetros termodinámicos ΔG^* , ΔH^* y ΔS^* de tripsina de sardina resultaron menores que los valores de tripsina bovina, lo cual es característico de las enzimas adaptadas al frío.

La diferencia en entalpía, $\Delta(\Delta H^*)^{p-m}$, de tripsina sardina (psicrófila) y tripsina bovina (mesófila) fue de -7.23 kJ/mol a 5°C, lo cual indica que la enzima tripsina de sardina Monterey es adaptada al frío. Éste comportamiento es semejante al reportado para otras tripsinas a 5°C y 15 °C, como la tripsina de bacalao Greenland ($\Delta(\Delta H^*)^{p-m} = -20.9$ kJ/mol) y la tripsina de bacalao del Atlántico ($\Delta(\Delta H^*)^{p-m} = -42.0$ kJ/mol) respectivamente (Lonhienne et al., 2000).

Por otro lado, se demostró que la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de tripsina de sardina Monterey es 65 veces más grande que la tripsina bovina a 4°C, lo cual confirma la superioridad de esta enzima psicrófila al actuar mas eficientemente a bajas temperaturas.

La disminución en la energía de activación en las enzimas psicrófilas, se debe estructuralmente a una disminución en el número de interacciones que se rompen durante los pasos de la activación. Estas interacciones inicialmente contribuyen a la estabilidad de las proteínas y se presume que la alteración de las mismas da lugar a un incremento en la flexibilidad estructural en los dominios que envuelven el sitio de catálisis y como consecuencia el estado basal del complejo enzima-sustrato ocupa una distribución conformacional más amplia que la de los mesófilos, lo cual se explica a partir del parámetro de $T\Delta S^*$, el cual se ve favorecido en el valor obtenido para tripsina de sardina ($T\Delta S^* = -36.98$ kJ/mol) comparado con el de tripsina bovina ($T\Delta S^* = -33.6$ kJ/mol) a 5°C (Tabla VIII), en donde la diferencia, $\Delta(T\Delta S^*)^{p-m}$, es de -3.38 kJ/mol; comportamiento semejante que sigue al de otras tripsinas previamente caracterizadas como adaptadas al frío como tripsina de bacalao Greenland y el bacalao del atlántico al ser comparadas con tripsina bovina.

La diferencia en energía libre del proceso de activación $\Delta(\Delta G^*)^{p-m}$, nos refleja la variación de k_{cat} entre la tripsina bovina y la tripsina de sardina la cual

fue de -3.85 kJ/mol. Los valores pequeños y negativos de éste parámetro de acuerdo a D'Amico (2002), nos indica que las enzimas adaptadas al frío son más activas que sus homólogas; en este caso la tripsina de sardina es más activa que la tripsina bovina a bajas temperaturas (Gerday et al., 2000; Lohienne et al., 2000; D'Amico et al., 2002). En la Tabla IX, se presentan los parámetros termodinámicos del proceso de activación de tripsina a temperatura estándar (25°C).

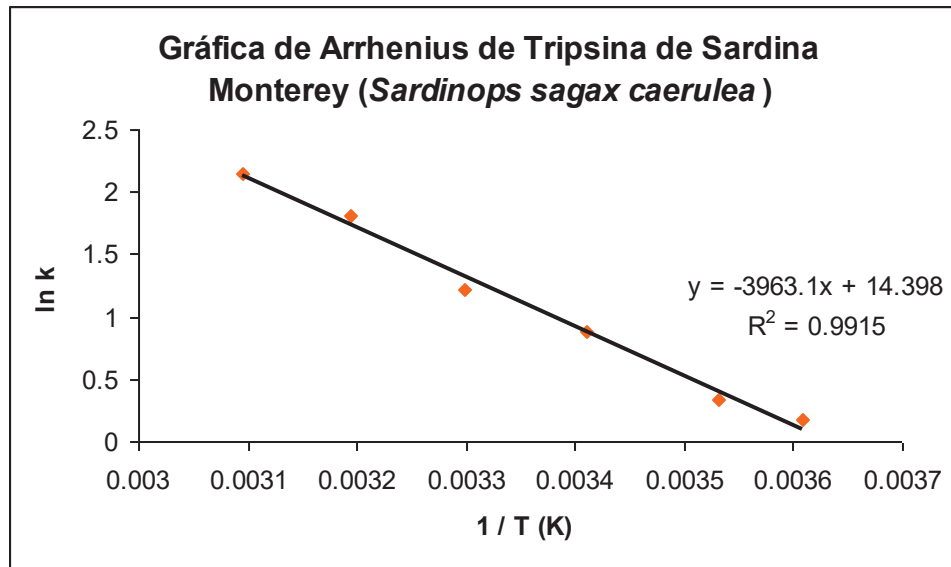


Figura 9.- Gráfica de Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

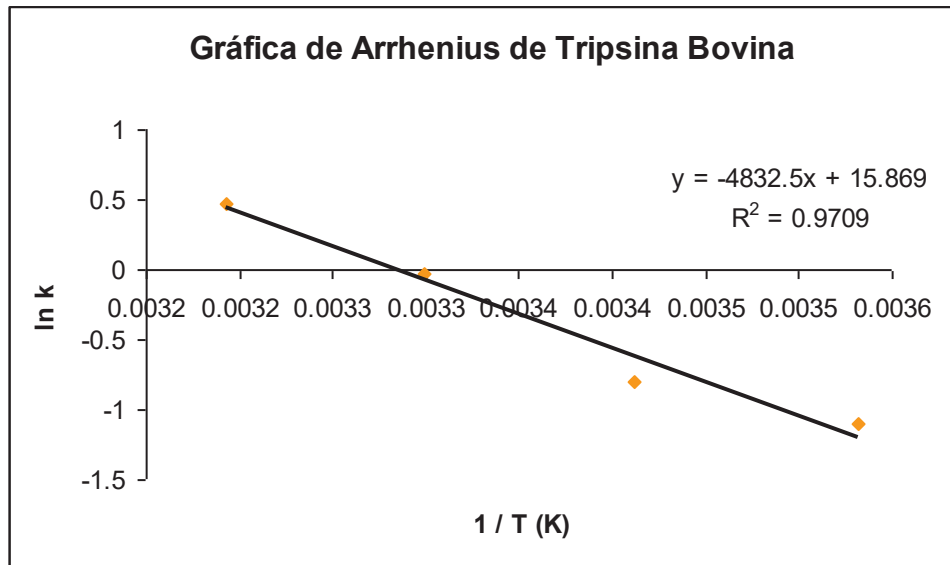


Figura 10.- Gráfica de Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de tripsina bovina.

Tabla VIII.- Parámetros termodinámicos del proceso de activación de tripsina de sardina Monterey y tripsina bovina a 5°C y 15°C.

Enzima (5°C)	ΔG^* kJ/mol	ΔH^* kJ/mol	$T\Delta S^*$ kJ/mol	$\Delta(\Delta G^*)^{p-m}$ kJ/mol	$\Delta(\Delta H^*)^{p-m}$ kJ/mol	$T\Delta(\Delta S^*)^{p-m}$ kJ/mol
Tripsina Sardina <i>Sardinops sagax caerulea</i>	67.62	30.64	-36.98	-3.85	-7.23	-3.38
Tripsina Bovina	71.47	37.87	-33.6	-----	-----	-----
Enzima (15°C)						
Tripsina Sardina <i>Sardinops sagax caerulea</i>	68.96	30.56	-38.4	-3.67	-7.22	-3.55
Tripsina Bovina	72.63	37.78	-34.85	-----	-----	-----

Tabla IX.- Parámetros termodinámicos del proceso de activación de tripsina de sardina Monterey y tripsina bovina a temperatura estándar (25°C).

Enzima	ΔG^* kJ/mol	ΔH^* kJ/mol	$T\Delta S^*$ kJ/mol	$\Delta(\Delta G^*)^{p-m}$ kJ/mol	$\Delta(\Delta H^*)^{p-m}$ kJ/mol	$T\Delta(\Delta S^*)^{p-m}$ kJ/mol
Tripsina Sardina <i>Sardinops sagax caerulea</i>	70.28	30.47	-39.81	-3.53	-7.23	-3.64
Tripsina Bovina	73.81	37.7	-36.17	-----	-----	-----

CONCLUSIONES

- De acuerdo con el análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes y con base en la actividad específica para el sustrato de BAPNA la enzima purificada mediante métodos cromatográficos es identificada como tripsina.
- De acuerdo a los valores de K_m éstos nos indican que la tripsina de sardina Monterey presenta valores mucho menores en comparación con la tripsina bovina, lo cual indica una mayor afinidad por el sustrato que la tripsina bovina.
- Los valores obtenidos de k_{cat} , para ambas tripsinas, nos indican que la tripsina de sardina Monterey posee mucha mayor actividad enzimática que la tripsina bovina.
- Tripsina de sardina Monterey presenta valores mucho más altos en la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) que tripsina bovina.
- En base a las diferencias de los parámetros termodinámicos del proceso de activación, tanto en entalpía como en entropía de activación entre tripsina bovina y tripsina de sardina Monterey se puede clasificar a ésta última como una enzima adaptada al frío.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2004. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. New York & London. 1463p.
- Anónimo. 1999. Protein Purification Handbook. Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden. 97 p.
- An H. y Visessanguan W. 2000. Recovery of enzymes from seafood-processing wastes. En. Haard NF y Simpson BK, editors. Seafood Enzymes. New York: Marcel Dekker, Inc. p 641-663.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Bentahir M., Feller G., Aittaleb M., Brasseur L., Himri T., Chessa J.P., Gerday C. 2000. Structural, kinetic and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from Antarctic *Pseudomona sp.* J. Biol. Chem. 11147-11153.
- Castillo-Yáñez, F.J. Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L., Navarrete-Del Toro, M.A. and Felix-López, M. 2005. Purification and biochemical characterization of proteases from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). Food Chemistry 99(2):252-259.
- Castillo-Yáñez, F.J. Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L., Navarrete-Del Toro. 2004. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). Food Chem. 76-94.
- Cohen T., Gertler A. and Birk Y. 1981a. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)-I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxipeptidase B. Comp. Biochem. Physiol. 69B:639-646.

- Copeland R. A. 1994. *Methods for Protein Analysis*. New York: Chapman & Hall. p 39-58.
- Copeland R. A. 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. 2nd ed. New York: Wiley and Sons, Inc. 397 p.
- D'Amico S., Claverie P., Collins T., Georlette D., Gratia E., Hoyoux A., Meuis M., Feller G., Gerday C. 2002. Molecular basis of cold adaptation. *R. Soc. Lond.* 357, 917-925.
- Erlanger B.F., Kokowski N. y Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archs. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.
- Feller G. y Gerday C. 1997. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell Mol. Life Sci.* 830-841.
- Feller, G, Payan F., Theys F., Quian M., Haser R., Gerday C. 1994. Stability and structural analysis of α -amilase from the Antarctic psychrophile *Alteromonas haloplancis*. *Eur. J. Biochem.* 222, 441-447.
- Galán Ruiz O. y Vega García M. 2006. Impacto de la biotecnología en los sectores industrial y energético. Informe de prospectiva, España, 4-68.
- Garret R. H. y Grisham Ch. M. 1999. *Biochemistry*. 2nd ed. Orlando: Saunders College Publishing. 1127 p.
- Georlette D., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Hoyoux A., Marx J.-C., Sonan G., Feller G., Gerday C. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol. Rev.* p 25-42.
- Haard, N. F. Simpson, B. K. 2000. *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood Quality*. Ed. Marcel Dekker. USA. 681 pp.
- Haard N. F. 1998. Specialty enzymes from marine organisms. *Food Technol.* 52: 64-67.
- Heu M.S., Kim H.R. y Pyeun J.H. 1995. Comparison of Trypsin and Chymotrypsin from the viscera of anchovy (*Engraulis japonica*). *Comp. Biochem., Physiol.* 112B: 557-568.

Hoyoux A., Jennes I., Dubois P., Genicot S., Dubail F., Françoise J.M., Baise E., Feller G. and Gerday C. 2001. Cold adapted beta-galactosidase from the Antarcticophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1529-1535.

<http://en.wikibooks.org/wiki/Biochemistry-Catalysis>

<http://antarticos.blogspot.com/2006/06/estudios-sobre-aplicaciones.html>

Janson J. y Rydén L. 1998. Protein Purification. Principles, High Resolution Methods and Applications. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 695 p.

Kim S.Y., Hwang K.Y., Kim S. H., Sung H.C., Han Y.S. and Cho Y.J. 1999. Structural basis for cold adaptation. Sequence, biochemical properties and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*. J. Biol. Chem. 274, 11761-11767.

Klomklao S., Benjakul S., Vissesanguan W., Simpson B.K. and Kishimura H., 2007. Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). Comp. Biochem, Physiol. Vol 10, 1-8.

Klomklao S., Benjakul S., Vissesanguan W., Simpson B.K. and Kishimura H., 2006a. Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus thongol*), J. Agric. Food Chem. Vol 54, 5617-5622.

Klomklao S., Benjakul S., Vissesanguan W., Simpson B.K. and Kishimura H., 2005. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. Process Biochem, Vol. 40, 3061-3067.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lonhienne T., Gerday C., Feller G. 2000. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. Biochim. Biophys. Acta. 1-10.

- Martínez A. y Serra, J.L. 1989. Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 61-66.
- Mathews, Christopher/Holde V. 2002. *Bioquímica*, 3a edición, Oregon, Oregon.
- Montes H. M.C., Magaña P. I., *Enzimas con aplicación industrial, avance y perspectiva*, Vol.21 279-282.
- Narinx E., Baise E., Gerday C. 1997. Subtilisin from psychrophilic antarctic bacteria: characterization and site directed mutagenesis of residues possible involved in the adaptation to cold. *Protein Eng.* 1271-1279.
- Novozymes, 2000. Novo Nordisk. <http://www.novozymes.com>
- Pretescu, I., Lamotte-Brasseur, J., Chessa, J.P., Ntarima, P., Claeysens, M., Devreese, B., Marino, G. and Gerday, C. 2000. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. *Extremophiles* 4, 137-144.
- Saeki K., Ozaki K., Kobayashi T. and Ito S., 2007. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes and cristal structures, *Biosc. and Bioeng.*, Vol 103, No 6, 501-508.
- Samalas A., Leiros H., Willassen N. 2000. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold adaptation. *Eur. J. Biochem.* 1039-1049.
- Scopes R. K. 1994. *Protein Purification: Principles and Practice*. 3rd ed. New York: Springer-Verlag. 380 p.
- Simpson B. K., 2000. Digestive proteinases from marine animals. En. Haard NF y Simpson BK, editors. *Seafood Enzymes*. New York: Marcel Dekker, Inc. p 191-213.
- Sotelo R., López A., García K., Flores A., Velázquez E., Valenzuela A., Kanost M. 2007. The lysozyme from insect (*Manduca sexta*) is a cold-adapted enzyme. *Protein Pept. Lett.* 1-5.
- Voet D. and Voet J.G., 2003, *Biochemistry*, .New York: John Wiley and Sons, Inc. 1361p.

Whitaker J.R. 2000. Principles of Enzymology for the Food Sciences. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. 625 p.
www.indstate.edu/.../mwking/enzyme-kinetics.html