

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Determinación de Parámetros Cinéticos (K_M y k_{cat}) de
Tripsina I de *Sardina Monterey* (*Sardinops sagax caerulea*)
Mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Ivet Cervantes Domínguez

Hermosillo, Sonora

Marzo, 2015

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

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de **Ivet Cervantes Domínguez** hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado “Determinación de Parámetros Cinéticos (K_M y k_{cat}) de Tripsina I de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) Mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica” y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

Dra. Idania Quintero Emedith Quintero Reyes
Director de Tesis

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Secretario

Dra. Rocío Sugich Miranda
Vocal

Dr. Victor Manuel Ocaño Higuera
Suplente

CONTENIDO

	Página.
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	7
INDICE DE TABLAS	8
INDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
ANTECEDENTES	15
• Sardina Monterey	15
○ Características Generales	15
○ Sistema Digestivo	17
• Enzimas Serina-Proteasas	17
○ Activación de Zimógenos	20
○ Inhibidores de las Serino-Proteasas	21
• Tripsina	23
○ Mecanismo de Proteólisis	24
○ Tripsina como Enzima Adaptada al Frío	26
○ Catálisis en la Adaptación al Frío	27
• Parámetros Cinéticos	29

○ Ecuación de Michaelis-Menten	30
○ Constante Catalítica (k_{cat})	33
• Calorimetría de Titulación Isotérmica	35
MATERIALES Y MÉTODOS	40
• Reactivos	40
• Obtención de la Muestra	40
• Extracción de Tripsina	41
• Purificación de Tripsina Mediante Cromatografía de Exclusión Molecular	41
• Ensayo de Actividad Específica	42
• Purificación de Tripsina Mediante Cromatografía de Afinidad a Benzamidina	42
• Determinación de Parámetros Cinéticos Mediante Espectrofotometría	42
• Determinación de Parámetros Cinéticos Mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica	44
○ Estandarización del Método	44
○ Ensayos Cinéticos con Tripsina de Sardina Monterey	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
• Purificación de Tripsina de Sardina Monterey	46
• Determinación de Parámetros Cinéticos Mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica	47
• Determinación de Parámetros Cinéticos Mediante Espectrofotometría	51
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora, al Departamento de Ciencias Químico-Biológicas por 5 años de formación y por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación.

Agradezco al Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores, por la confianza depositada en mí para realizar este proyecto.

Agradezco al Dr. Victor Ocaño Higuera, por su apoyo brindado en este proyecto.

Agradezco a la Dra. Rocío Sugich Miranda, por su buena disposición a colaborar en este proyecto y por formar parte de mi comité evaluador de tesis.

Agradezco a la Dra. Idania Emedith Quintero Reyes, por su infinita paciencia conmigo, por su dirección y enseñanza que fueron parte vital de mi aprendizaje en este proyecto. Por su amistad y las horas de trabajo en el laboratorio compartidas. Por el desvelo, el esfuerzo y el cansancio que puso en este proyecto junto conmigo.

Agradezco al Dr. David Octavio Corona Martínez, por su contribución en este proyecto al ayudarme con la parte cinética, por su paciencia, ánimo y compañerismo.

Agradezco a Manuel Ignacio Carretas, por ser un gran amigo y compañero de laboratorio, por su apoyo, consejos, asesoría y ánimo constante. Por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo, por aguantar mis momentos de frustración y por ayudarme desinteresadamente. Gracias Manuel.

Agradezco a todos aquellos compañeros y amigos que han estado ahí para enseñarme y ayudarme a lo largo de esta etapa, Wenceslao, María Jesús, la maestra Martha Judith Valdez, la maestra Lucila Rascón, Refugio Pérez, Luis Miguel López, por mencionar solo algunos.

Agradezco al CONACYT por la beca brindada a través del proyecto CB2012/180498 “Determinantes moleculares de la adaptación al frío en tripsina de sardina (*Sardinops sagax caerulea*): función de residuos específicos mediante mutagénesis dirigida”.

Agradezco al proyecto CONACYT INFRA2013/205617 “Adquisición de infraestructura para el fortalecimiento de la investigación y caracterización de macromoléculas de origen marino” por el apoyo para el equipamiento del Departamento de Ciencias Químico Biológicas, utilizado durante esta tesis.

DEDICATORIA

A Dios, quien jamás me deja ni me desampara aún en mis momentos de más grande angustia o tristeza. Quien comparte mis alegrías y mis triunfos así como también mis caídas y fracasos. A ese Padre que me cuida todos los días.

A mis padres, Rebeca Domínguez y Maximiliano Cervantes, quienes han sido mi apoyo, mi consuelo, mi guía, mi fuente incondicional de amor y refugio. El mejor ejemplo y el mayor regalo que tengo en la vida. Los amo infinitamente.

A mis hermanos, Max, Aby, Ivan, Adán y Aarón, quienes han sido para mí, fuente de alegría y apoyo incondicional toda mi carrera y toda mi vida. Aún en la distancia siempre están para mí.

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Selección de enzimas serina proteasas.....	19
2.	Resumen de ensayo cinético de hidrólisis de benzoil arginina etil éster (BAEE) por tripsina I.....	43
3.	Resumen de purificación de tripsina I.....	46
4.	Resumen de comparación de constantes cinéticas obtenidas a mediante calorimetría de titulación isotérmica y espectrofotometría.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>).....	16
2.	Representación en listones de un modelo teórico de tripsina I de sardina Monterey (<i>Sardinops sagax caerulea</i>) donde se muestra su sitio activo.....	23
3.	Representación del mecanismo de acción de tripsina.....	24
4.	Gráfica de Michaelis-Menten.	32
5.	Gráfica de Lineweaver-Burk.	34
6.	Resumen de purificación de tripsina I de sardina Monterey (<i>Sardinops Sagax caerulea</i>).....	47
7.	Ajuste cinético de tripsina I de sardina Monterey titulada con benzoil arginina etil éster (BAEE) a 20° obtenido mediante CTI	48
8.	Ajuste cinético de tripsina I de sardina Monterey titulada con BAEE a 15°C obtenido mediante CTI	49
9.	Ajuste cinético de tripsina I de sardina Monterey titulada con BAEE a 4°C obtenido mediante CTI	50
10.	Cinética de la hidrólisis de BAEE por tripsina I de sardina Monterey a 25°C obtenida por espectrofotometría	51
11.	Cinética de la hidrólisis de BAEE por tripsina I de sardina Monterey a 20°C obtenida por espectrofotometría	52
12.	Cinética de la hidrólisis de BAEE por tripsina I de sardina Monterey a 15°C obtenida por espectrofotometría	53

RESUMEN

La sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es uno de los principales productos pesqueros en el estado de Sonora. Sin embargo, año con año se generan grandes cantidades de desechos como las vísceras debido al procesamiento de la sardina. Las vísceras poseen un alto valor agregado ya que son una fuente de enzimas proteasas las cuales pudieran tener numerosas aplicaciones biotecnológicas debido a que presentan una alta eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M). Dichos parámetros cinéticos se obtienen en base a mediciones de la actividad enzimática determinando la conversión de sustrato a producto a partir, de métodos de detección química o métodos espectrofotométricos.

Los métodos mencionados se definen como métodos tradicionales y no son factibles para todas las enzimas debido a la formación de soluciones opacas, los múltiples pasos necesarios en los ensayos discontinuos, entre otras características. Sin embargo, se han desarrollado métodos universales que permiten la obtención de los parámetros cinéticos utilizando herramientas como la calorimetría de titulación isotérmica (CTI). Mediante la técnica CTI se calcula la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la constante catalítica o de recambio (k_{cat}) a partir del poder térmico generado por la conversión enzimática de sustrato a producto, siendo la velocidad de reacción directamente proporcional al poder térmico generado. Por lo que el objetivo del presente estudio es establecer las condiciones óptimas para la obtención de constantes cinéticas K_M y k_{cat} de tripsina I de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) mediante calorimetría de titulación isotérmica así como su comparación con el método espectrofotométrico.

Para alcanzar dicho objetivo se realizó la purificación de tripsina de sardina Monterey mediante cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad a benzamidina obteniendo un rendimiento de 1.1 mg/mL de tripsina 1. El sustrato utilizado para llevar a cabo los ensayos cinéticos fue benzoil-arginina-etil-éster (BAEE). Los valores de los parámetros cinéticos de tripsina I de sardina Monterey mediante CTI a 20°C fueron k_{cat} 14.6 s⁻¹, K_M 0.0014 mM, mientras que a 15°C fueron k_{cat} 13.6 s⁻¹, K_M 0.004 mM y a 4°C resultaron k_{cat} 0.454 s⁻¹ y K_M 0.00052 mM. Por otra parte se encontró que los valores de los parámetros cinéticos de tripsina I de sardina Monterey por espectrofotometría fueron los siguientes: a 25°C k_{cat} 436.5 s⁻¹, K_M 0.0018 mM, a 20°C k_{cat} 409.7 s⁻¹, K_M 0.0018 mM, y a 15°C k_{cat} 288 s⁻¹, K_M 0.003 mM.

Los resultados mostraron que el valor de k_{cat} obtenido a partir del método de calorimetría de titulación isotérmica difiere considerablemente del valor de k_{cat} obtenido por espectrofotometría. Por el contrario, se obtuvo que los valores de K_M generados mediante calorimetría de titulación isotérmica de inyección simple son similares a los obtenidos mediante espectrofotometría. Sin embargo, a pesar de las diferencias podemos contemplar que se mantiene el comportamiento de tripsina I como enzima psicrófila, ya que la eficiencia catalítica por ambos métodos es mayor que la de sus homólogos como la tripsina bovina de acuerdo a lo previamente publicado por Arvizu y cols. en el 2012; por lo que podemos definir a la calorimetría de titulación isotérmica como un método alternativo para la determinación de parámetros cinéticos no solo de la hidrólisis enzimática llevada a cabo por tripsina, si no para otros procesos enzimáticos.

INTRODUCCIÓN

La sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es el principal producto pesquero del noroeste del país (Castillo y col., 2009). Se estima que anualmente se obtienen 300, 000 ton. de sardina, lo que representa aproximadamente el 80% del total de la pesca realizada en el golfo de California (Uriarte y col., 2010). Los productos de la pesca de dicha sardina se destinan principalmente al consumo humano, siendo comercializados como productos enlatados (30%), productos congelados (7.5%) y carne de consumo directo (62.5%) (Castillo, 2004).

Actualmente se conoce que esta sardina es una gran fuente de bajo costo de proteínas de alta calidad y ácidos grasos omega 3, lo que ha provocado que su procesamiento industrial se haya enfocado únicamente en la obtención de productos que sirvan como alimento para consumo humano. Esto ha convertido a los productos derivados de la sardina en candidatos como fuente principal alimenticia de la región. Sin embargo, se ha observado que su consumo es bajo y se calcula que se ingiere alrededor de una lata por persona al año, de dicho producto (Uriarte y col., 2010).

Durante el procesamiento y enlatado de la sardina, se remueve la cabeza, la cola y las vísceras las cuales, representan aproximadamente el 40% del cuerpo de la sardina, generando una gran cantidad de desechos (Castro, 2012). Anualmente se generan alrededor de 20 millones de ton. de residuos que son vertidos en el mar sin ningún procesamiento previo provocando problemas ecológicos y de contaminación ambiental. Las vísceras, se utilizan como una fuente de enzimas la cuales pudieran ser aprovechadas por distintas industrias como la médica, farmacéutica, de cosméticos, tecnología de alimentos, entre otros (Castro, 2012).

Recientemente se han utilizado las vísceras como fuente de enzimas digestivas, siendo las principales obtenidas aquellas que pertenecen a la familia de las serina-proteasas como tripsina, quimotripsina y elastasa, reconocidas por su papel en la regulación fisiológica de la nutrición y de diversas funciones celulares (Noriega y col., 2009; Castillo, 2005). De las enzimas serina-proteasas, la más estudiada es tripsina. Dicha enzima participa en la degradación de las proteínas presentes en la dieta y activa los precursores de otras proteasas

digestivas (Castillo, 2004). Este tipo de proteasa, ha despertado altas expectativas para su uso en aplicaciones biotecnológicas en la industria debido a la alta eficiencia catalítica que presenta (Castillo, 2006).

Hasta hoy, se han reconocido 3 isoformas de tripsina que tienen la misma especificidad, ya que todas rompen el lado carboxilo de aminoácidos básicos y pueden hidrolizar sustratos sintéticos como la α -benzoil-L-arginina-p-nitroanilida y tosil-arginina metil ester; sin embargo, poseen diferente capacidad de adaptación a distintas temperaturas (Arvizu y col., 2012; Castillo, 2009). En el caso de la tripsina extraída de la sardina *Sardinops sagax caerulea*, se conoce que las isoformas I y III poseen actividad psicrófila, es decir, de adaptación a bajas temperaturas; mientras que la isoforma II es mesófila, observándose una mejor función catalítica a temperaturas más altas (Arvizu y col., 2012).

Esta propiedad de las tripsinas de adaptación al frío, se ha comprobado al comparar la dependencia de parámetros cinéticos con respecto a la temperatura, mediante un análisis de Arrhenius. Se ha observado también, de manera general, que esta propiedad contribuye a una mayor eficiencia catalítica de estas enzimas en comparación con tripsinas mesófilas (Arvizu y col., 2012). Este incremento en la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) puede ser determinado por la medición de parámetros cinéticos como un aumento en la constante de recambio (k_{cat}), una disminución en la constante de Michaelis-Menten (K_M) o por cambios en ambos (Castillo, 2009). Dichos parámetros se obtienen mediante ensayos tradicionales los cuales incluyen métodos de detección química y ensayos espectrofotométricos, sin embargo, esta metodología no es factible para todas las enzimas debido a que pueden presentar soluciones opacas, además de los múltiples pasos necesarios en los ensayos discontinuos, entre otras características.

Hoy en día se cuenta con una herramienta alternativa por la cual se pueden obtener los datos cinéticos de forma directa y utilizando pequeñas cantidades de enzimas, esa herramienta es la CTI. Dicha herramienta permite la obtención de los parámetros cinéticos a partir del poder térmico generado por la conversión enzimática del sustrato a producto; donde la velocidad de reacción es directamente proporcional al poder térmico. Por lo que el objetivo del presente proyecto es determinar los parámetros cinéticos (K_M y k_{cat}) de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) mediante calorimetría de titulación isotérmica,

utilizando tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) así como su comparación con el método espectrofotométrico.

HIPÓTESIS

El método de CTI permite la obtención de parámetros cinéticos (K_M y k_{cat}) de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) similares a los parámetros cinéticos que se obtienen mediante espectrofotometría.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinación los parámetros cinéticos (K_M y k_{cat}) de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Objetivos Particulares.

1. Purificar tripsina I a partir de las vísceras de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) mediante métodos cromatográficos.
2. Determinar los parámetros cinéticos (K_M , k_{cat}) de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) mediante calorimetría de titulación isotérmica.
3. Determinar los parámetros cinéticos, (K_M , k_{cat}) de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) mediante el método espectrofotométrico.
4. Comparar los parámetros cinéticos obtenidos a partir de ambos métodos.

ANTECEDENTES

Sardina Monterey

El estado de Sonora posee una ubicación geográfica que colinda con el Golfo de California. En esta zona, de gran actividad pesquera, Sonora se ha posicionado como el estado con mayor producción pesquera nacional en volumen contribuyendo con el 36.68% de la producción total, mientras que se ha colocado en el segundo lugar nacional en valor de pesca, aportando el 2.72% al producto interno bruto (PIB) del país. Los principales productos pesqueros en el estado de Sonora son la sardina, la anchoveta y el camarón, con la sardina como el principal producto pesquero representando un 65.35% de la captura total de la entidad (SAGARPA, 2013).

Sonora cuenta con el primer lugar en captura de sardina puesto que contribuye con el 60.6% de la producción nacional (441,371 ton) según el anuario de CONAPESCA del año 2013. La sardina por su volumen se encuentra posicionada en el lugar 1 de la producción pesquera en México; sin embargo, por su valor, se le encuentra en el lugar 5, mientras la tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 4.06%. (SAGARPA, 2013). Se puede inferir entonces, que la sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es un recurso de gran importancia en la industria pesquera de México.

Características generales

La sardina Monterey pertenece a la familia de los pelágicos menores. Estos son peces que alcanzan longitudes entre los 10 y 30 centímetros y tienen un ciclo de vida corto. Su época reproductiva es variable. Habitualmente viven en zonas costeras de alta productividad biológica y se alimentan de fitoplancton y zooplancton, debido a esto, es posible que se presente una competencia alimenticia entre diferentes especies de una misma pesquería (Anaya, 2008; Manrique, 2000). Los pelágicos menores forman grandes cardúmenes, tienen una distribución cosmopolita y constituyen uno de los principales recursos pesqueros en todo el mundo.

La familia de los pelágicos menores se compone de la sardina Monterey (*Sardinops caeruleus*), tres especies de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*, *O. bulleri*, *O. medirastre*), sardina Macarela (*Scomber japonicus*) y anchoveta norteña (*Engraulis mordax*). Otras especies que se pescan en menor cantidad son la sardina “el charrito” (*Trachurus symmetricus*), la sardina “bocona” (*Centengraulis mysticetus*), y la sardina “piña” (*Oligoplites spp.*). En México, la pesca predominante es de la sardina Monterey y es también, la más cotizada en el mercado internacional (Anaya, 2008).

La sardina está constituida por un cuerpo delgado, con escamas delicadas, la parte superior de su cuerpo es de color verde azulado, el abdomen y los costados son plateados en un tono brillante, la aleta dorsal y la cola son de color gris oscuro. Pueden alcanzar longitudes entre los 10 y 30 centímetros, siendo la talla de 17 a 18 cm de longitud la más común entre las especies con mayor importancia pesquera, que alcanzan entre los 2 y 3 años de edad (Nevárez y col., 1991). La sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) habita en las aguas del Golfo de California en México y las costas de California en Estados Unidos, particularmente en la bahía de Monterey, de donde deriva su nombre común. Se considera en la categoría de las “sardinias verdaderas” y es reconocida a nivel mundial por su nivel nutricional. Esta sardina se distingue por presentar manchas esparcidas horizontalmente en los costados, además de unas estrías en la cobertura de sus branquias conocidas como opérculum (Figura 1). Es de alimentación omnívora, mostrando preferencia por el fitoplancton. Se reproduce en invierno y en menor grado en primavera. Por ejemplo, se ha reportado en que Ensenada Baja California, los periodos de desove anuales son de enero a marzo y de junio a julio (Anaya, 2008).



Figura 1. Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

Sistema Digestivo

El sistema digestivo de la sardina se compone de boca, esófago, estómago, intestinos, hígado y páncreas o ciego pilórico. Los peces no poseen glándulas salivales, sin embargo contienen glándulas que secretan una sustancia mucoide abundante que sirve para proteger la superficie interna y lubricarla para facilitar el desplazamiento del alimento. Esta mucosa cubre la cavidad bucal, el esófago, el estómago y el resto del tracto digestivo. Después del intestino proximal adyacente al esfínter pilórico, algunos peces poseen proyecciones similares a las bolsas en forma de dedos. Este tejido es conocido como ciego pilórico y puede tener función digestiva ya que presumen un alto contenido de enzimas digestivas, como las serina-proteasas (Anaya, 2008; Castillo, 2005).

Serina-Proteasas

Las enzimas proteolíticas tienen diversas funciones fisiológicas, que van desde la digestión generalizada de proteínas, hasta procesos más específicamente regulados como la activación de zimógenos, la coagulación sanguínea, lisis de los coágulos de fibrina, la liberación de hormonas, liberación de péptidos farmacológicamente activos y el transporte de proteínas secretoras a través de las membranas (Neurath, 1984).

Las enzimas proteolíticas o proteasas son enzimas que catalizan la escisión de un puente peptídico en otras proteínas. En este proceso han adquirido un alto grado de especialización al restringir su acción a un selecto número de enlaces peptídicos, localizados en sitios específicos de las proteínas que sirven como sustrato. Esta proteólisis limitada no destruye la proteína sustrato por completo pero modifica sus propiedades y su rol fisiológico. Muchos procesos biológicos son regulados por este tipo de proteasas, por ejemplo, la coagulación sanguínea y la fibrinólisis, el ensamble macromolecular de estructuras como las fibras de colágeno o ciertos virus, fertilización, y el control de la digestión proteolítica propia (Neurath, 1984).

Las enzimas serina-proteasas se denominan así porque tienen en común un mecanismo catalítico que se caracteriza por poseer un residuo de serina especialmente reactivo que es esencial para su actividad enzimática. Las serina proteasas constituyen la

familia de enzimas que incluyen a quimotripsina, tripsina y elastasa, siendo éstas las proteasas mejor caracterizadas. Dichas enzimas se sintetizan en formas inactivas y se activan de forma fisiológica. La quimotripsina, tripsina y elastasa son enzimas digestivas sintetizadas por las células de los acinos pancreáticos y segregadas por el conducto pancreático en el interior del duodeno. Todas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos (amida) pero con diferentes especificidades por las cadenas laterales que flanquean el enlace peptídico escísil; la quimotripsina es específica para un residuo hidrófobo voluminoso que precede el enlace peptídico escindible; la tripsina es específica para un residuo con carga positiva y la elastasa lo es para un residuo neutro pequeño. En conjunto, forman un equipo digestivo potente (Voet y Voet, 2006).

En la quimotripsina, la cadena lateral aromática voluminosa de los residuos fenilalanina, triptófano o tirosina contribuye con el grupo carbonilo del péptido escindible para encajar con comodidad en un bolsillo hidrófobo similar a una hendidura, el bolsillo de especificidad, que se localiza cerca de los grupos catalíticos.

En la tripsina, el residuo que corresponde a la serina 189 de la quimotripsina que yace en la parte posterior del bolsillo de especificidad es el aniónico ácido aspártico. Debido a esto, las cadenas laterales catiónicas de los residuos preferidos por la tripsina, arginina o lisina, pueden formar pares iónicos con este residuo de ácido aspártico. El resto del bolsillo de especificidad de la quimotripsina está conservado en la tripsina de modo que pueda acomodar la voluminosa cadena lateral de arginina y lisina (Voet y Voet, 2006).

La elastasa se denomina así porque hidroliza con rapidez la proteína elastina (proteína del tejido conectivo con propiedades elásticas similares a la goma) con un alto contenido de alanina, glicina y valina, que de otro modo sería muy resistente a la digestión. El bolsillo de especificidad de la elastasa está ocluido en gran parte por las cadenas laterales de un residuo de valina y treonina, que reemplazan dos de estos bolsillos recubiertos por glicina, tanto en la quimotripsina como en la tripsina. Por consiguiente, la elastasa, cuyo bolsillo de especificidad se describe mejor como una depresión, corta de manera específica los enlaces peptídicos después de los residuos neutros pequeños, en particular alanina. Por el contrario, la quimotripsina y la tripsina hidrolizan estos enlaces peptídicos con gran lentitud porque estos sustratos pequeños no pueden inmovilizarse lo suficiente sobre la superficie de la enzima como para que se produzca la catálisis eficaz (Voet y Voet, 2006).

Estas 3 enzimas digestivas, son las más estudiadas dentro de la familia de las serina proteasas, sin embargo, existe una diversidad de enzimas que desempeñan diferentes actividades catalíticas, como puede observarse en la tabla 1:

Tabla 1. Selección de enzimas serina proteasas (Voet y Voet, 2006).

Enzima	Fuente	Función
Tripsina	Páncreas	Digestión de proteínas
Quimotripsina	Páncreas	Digestión de proteínas
Elastasa	Páncreas	Digestión de proteínas
Trombina	Suero de vertebrados	Coagulación sanguínea
Plasmina	Suero de vertebrados	Disolución de coágulos sanguíneos
Calicreína	Sangre y tejidos	Control del flujo sanguíneo
Complemento C1	Suero	Lisis celular en la respuesta inmune
Proteasa acrosómica	Acrosoma de espermatozoides	Penetración en óvulo
Proteasa lisosómica	Células animales	Recambio de las proteínas celulares
Tripsina	Larvas de polillas	Disolución de la tripsina de insectos después de metamorfosis
Proteasa α -lítica	<i>Bacillus soranguan</i>	Posiblemente digestión
Proteasa A y B	<i>Streptomyces griscus</i>	Posiblemente digestión
Subtililina	<i>Bacillus subtilis</i>	Posiblemente digestión

Las enzimas proteolíticas no solo son de necesidad fisiológica sino también poseen un potencial peligroso, puesto que si actúan descontroladamente, pueden destruir las proteínas componentes de células y tejidos. Existen dos principales mecanismos regulatorios: 1. activación de los precursores de proteasas inactivos (zimógenos) mediante

proteólisis limitada, 2. inactivación de proteasas mediante la formación de complejos con inhibidores de proteínas (Neurath, 1984).

Activación de Zimógenos

En los mamíferos, la proteólisis es necesaria para una diversidad de procesos como la degradación controlada de proteínas citosólicas y nucleares, la regulación del balance de sodio y la presión sanguínea, la respuesta inmune y la apoptosis, por mencionar algunas. Todas las enzimas proteolíticas conocidas, celulares y bacterianas, son sintetizadas como precursores inactivos (o zimógenos) para prevenir la degradación proteica no deseada. La conversión de zimógenos en enzimas activas generalmente ocurre por una proteólisis de un “segmento” de activación que les impide ejercer su función biológica. La conversión de los zimógenos puede involucrar moléculas accesorias, o procesos que pueden ser autocatalíticos, y simplemente no requieren más factores adicionales que un descenso en el pH. Muchos zimógenos contienen extensiones N-terminales de la enzima madura (o prosegmentos) que previenen el acceso de los sustratos al sitio activo, eliminando el riesgo de que el sitio activo empiece a tener actividad antes de que la síntesis del polipéptido sea completa (Khan y James, 1998).

Los mecanismos inhibitorios utilizados por los “segmentos de activación” son diversos, pero una propiedad en común de los zimógenos es que la “maquinaria catalítica” se encuentra preformada. La “maquinaria catalítica” se refiere a todos los aspectos del sitio activo que se requieren para una escisión eficiente de los enlaces peptídicos. Por ejemplo, las posiciones y conformaciones de la triada catalítica de los zimógenos de las serino-proteasas y las cisteíno-proteasas, los dos residuos de aspartato catalíticos en los zimógenos de las aspartato-proteasas, y el Zn^{2+} catalítico en los zimógenos de las metaloproteasas son virtualmente idénticos en sus correspondientes formas activas. De igual forma, el proceso de conversión a menudo involucra cambios conformacionales significativos en regiones adyacentes al sitio activo, o dentro de los segmentos de activación que son subsecuentemente removidos (Khan y James, 1998).

La activación del quimotripsinógeno es iniciada por la escisión del enlace peptídico entre la arginina15 y la isoleucina 16 mediante trispinas. El proceso de conversión puede ser

desencadenado por la acción de enterocinasas y es influenciado por el pH y la presencia de iones Ca^{2+} . La proteólisis limitada resulta en un nuevo ión NH_3^+ terminal liberado de la isoleucina 16, que forma un par iónico con la cadena lateral carboxilato del aspartato 194, desencadenando la formación de la enzima activa. Las escisiones subsecuentes resultan en la liberación de los dipéptidos serina 14–arginina 15 y treonina 147–asparagina 148 mediante mecanismos autocatalíticos (Khan y James, 1998).

Comparaciones entre el quimotripsinógeno y el tripsinógeno bovinos indican diferencias menores en las regiones que son relevantes para el proceso de conversión. En ambos zimógenos es esencial un residuo de aspartato y la proteólisis limitada y formación de un puente salino incluyen la liberación de un nitrógeno terminal. Estudios estructurales y termodinámicos de complejos de tripsinógeno con otros varios péptidos han indicado que la transición conformacional es alcanzada por el movimiento de la isoleucina 16 hacia un bolsillo (la hendidura isoleucina 16), y la formación de un puente salino entre el residuo isoleucina 16 (N) y la cadena lateral del carboxilato del residuo aspartato 194. La hendidura de la isoleucina 16 se llena con solvente en el tripsinógeno y durante el proceso de conversión, tiene el tamaño y la forma correcta para acomodar la cadena lateral de la isoleucina 16. Al mismo tiempo, la unión de un inhibidor pancreático al tripsinógeno es suficiente para conducir la conversión del tripsinógeno a la conformación de la tripsina. Debido a estas observaciones, se ha propuesto un modelo en el que el zimógeno es capaz de alternar entre la conformación activa e inactiva de la proteína, a diferencia de la proteólisis limitada del segmento de activación fuerza al zimógeno al estado activo irreversiblemente (Khan y James, 1998; Stroud y col., 1977). Además, el tripsinógeno es capaz de activarse a sí mismo en la presencia de iones Ca^{2+} y el zimógeno es más capaz de activar al quimotripsinógeno en transición, lo que sugiere una actividad catalítica parcial inherente en estos zimógenos (Khan y James, 1998; Stroud y col., 1977).

Inhibidores de las Serina-Proteasas

Los inhibidores de proteasas son biomoléculas responsables de uno de los mecanismos de regulación para controlar la actividad proteolítica de las proteasas en los seres vivos. Su papel regulatorio es de suma importancia en procesos vitales, al impedir la proteólisis no deseada

o bien, garantizar la proteólisis parcial. La necesidad de estas moléculas, se ve reflejada al estar presentes en muchos tejidos diversos (González y col., 2013).

Los inhibidores de proteasas se clasifican de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y su estructura tridimensional. Su clasificación actual abarca 59 familias y 24 clases. La mayoría de los inhibidores proteicos conocidos son inhibidores de las serino-proteasas. Estos inhibidores de proteasas presentan tres principales mecanismos de interacción: canónicos, no canónicos y serpinas (González y col., 2013).

Las serpinas interactúan irreversiblemente con las serino-proteasas imitando el papel de un sustrato. Cuando interactúa con la proteasa, el enlace que se genera, provoca un cambio de conformación en la enzima, lo que a su vez produce una deformación en el sitio activo y esto desemboca en la inhibición enzimática. Estos inhibidores se caracterizan por poseer una alta masa molecular (350-500 aminoácidos) y constituyen la familia más abundante de los inhibidores de proteasas. Estas biomoléculas se han identificado en numerosos organismos, desde los virus hasta los mamíferos y son de especial interés en el plasma humano puesto que sus mutaciones pueden generar enfermedades genéticas como es el caso de la deficiencia de la α -1-antitripsina que puede desarrollar enfisema o enfermedad hepática en los individuos que la padecen (González y col., 2013; Khan y James 1998).

Los inhibidores de proteasas no canónicos interactúan, generalmente, a través de una región que se une al sitio activo de la proteasa, formando una estructura secundaria de la hoja β -paralela. Además, pueden tener interacciones en sitios diferentes al sitio activo, debilitando significativamente la velocidad, fuerza y especificidad en el reconocimiento enzima-sustrato. Este mecanismo se ha observado en insectos hematófagos como el triatomino *Rhodrius prolixus* (agente causal de la enfermedad de Chagas), que inhiben proteasas de la coagulación y fibrinólisis (trombina y/o factor Xa) (González y col., 2013).

Los inhibidores canónicos, se caracterizan por presentar una región denominada “lazo de unión” que es responsable de la inhibición de la proteasa. Este sitio se presenta convexo, extendido y expuesto al solvente; además de presentar una alta complementariedad con el sitio activo cóncavo de la enzima. Estos inhibidores se encuentran dentro del grupo de proteínas más utilizadas para estudiar los mecanismos de reconocimiento proteína-proteína. Actualmente se reconocen 18 familias que se diferencian entre sí por sus secuencias

aminoacídicas, sus estructuras tridimensionales y la localización del sitio de unión al sitio activo de la proteasa (González y col., 2013).

Tripsina

La tripsina es una de las serina-proteasas digestivas más importante en la mayoría de los vertebrados, la cual como ya se mencionó es producida en las células acinares del páncreas y es liberada por el ducto pancreático hacia el tracto gastrointestinal. Después de su activación por enterocinasas o por mecanismos autocatalíticos, ésta degrada en conjunto con quimotripsina y elastasa, las proteínas de la dieta en péptidos. Los péptidos resultantes son rápidamente digeridos por una variedad de exopeptidasas y los pequeños fragmentos restantes son absorbidos por el intestino (Vandermarliere y col., 2013). Aunque la función principal de la tripsina es la degradación de proteínas digestivas, también puede activar el receptor de insulina mediante una proteólisis limitada del dominio extracelular que resultará en una respuesta similar a la insulina, en ausencia de insulina. (Vandermarliere y col., 2013).

La búsqueda de proteasas provenientes de diferentes fuentes ha incrementado en los últimos años en 50% aproximadamente del total de las ventas industriales de enzimas. Nuevas fuentes de enzimas proteolíticas han sido recientemente estudiadas incluyendo proteasas de peces, especialmente de las vísceras (Vandermarliere y col., 2013; Villalba y col., 2013). La tripsina es una endoproteasa específica que hidroliza enlaces peptídicos después de residuos de arginina o lisina, con menor actividad cuando son seguidos por un residuo de prolina. En las proteínas humanas, este patrón de escisión resulta en un promedio de 62 péptidos por proteína. Enzimas como la tripsina, son fácilmente disponibles y comúnmente utilizadas en investigación biológica durante experimentos en proteómica donde su alta especificidad es de gran utilidad para controlar y predecir la proteólisis (Vandermarliere y col., 2013; Olivera y col., 2013). Uno de los usos más importantes es el resuspender las células adheridas en placas de cultivo celular, durante el proceso de cultivo de células animales. Son utilizadas con EDTA para escindir integrinas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} que unen las células cultivadas a las placas de cultivo, de manera que las células pueden ser suspendidas en una nueva solución y transferidas a nuevas placas (Olivera y col., 2013). En la Figura 2 se ilustra un modelo teórico de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

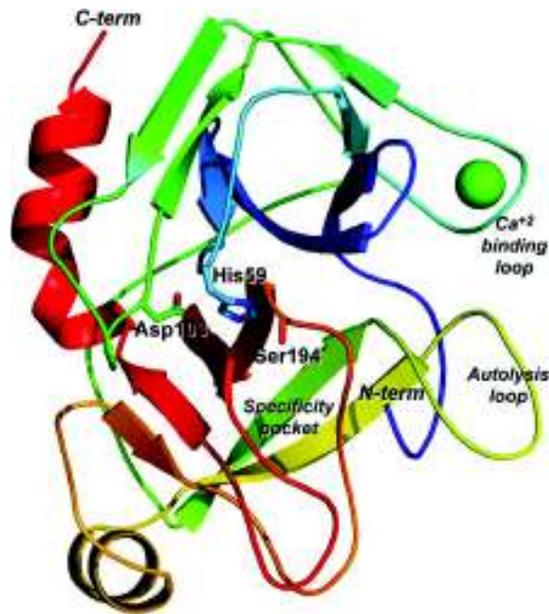


Figura 2. Representación en listones de un modelo teórico de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) donde se muestra su sitio activo. (Arvizu y col, 2012).

Mecanismo de Proteólisis

Como primer paso, el residuo de serina nucleofílica ataca el enlace escindible del sustrato al donar un protón a la histidina catalítica, donde el nitrógeno correspondiente incrementa su electronegatividad debido al puente de hidrógeno formado por el aspartato catalítico. Este ataque resulta en la formación de un intermediario acil-enzima covalente y la liberación de un fragmento N-terminal del enlace peptídico escindido. En el segundo paso, una molécula de agua es activada por la Histidina y ataca al intermediario acil-enzima. Este ataque es seguido por la liberación de un fragmento C-terminal del enlace peptídico. Esta liberación tardía se alcanza mediante el paso del protón de la histidina hacia la serina catalítica, de manera que la enzima regresa a su conformación original para iniciar otro ciclo. Este mecanismo de catálisis es a menudo referido como el sistema carga-transferencia y tiene tres residuos como base, los cuales forman la triada catalítica: serina 195, histidina 57 y aspartato 102. Dentro de esta triada catalítica, la serina actúa como nucleófilo para iniciar la reacción, mientras que la histidina tiene una función dual. En el primer paso (paso de acilación) la histidina catalítica

actúa como la base para aceptar un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo proveniente de la serina catalítica, el cual promueve la formación de un intermediario tetrahédrico y la histidina catalítica actúa como un ácido al donar un protón adquirido hacia el grupo amino que se desprende cuando el intermediario tetrahédrico colapsa (Vandermarliere y col., 2013; Dodson y Wlodawer, 1998).

De manera similar al primer paso, en el segundo paso (paso de desacilación), la histidina catalítica actúa para activar una molécula de agua y después actúa como ácido al donar un protón al oxígeno saliente del grupo hidroxilo del residuo de serina. El aspartato es necesario para orientar correctamente la Histidina a fin de formar un puente de hidrógeno con ella. Esta orientación facilita la abstracción del protón de la serina y genera un nucleófilo potente (Vandermarliere y col., 2013; Dodson y Wlodawer, 1998). Este mecanismo se ilustra en la Figura 3.

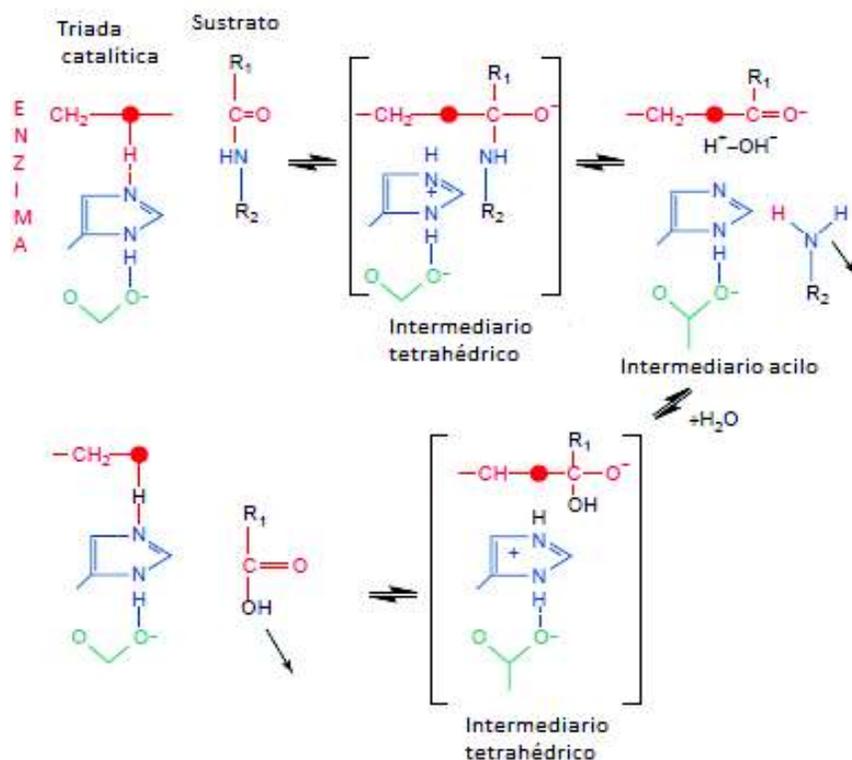


Figura 3. Representación del mecanismo de acción de tripsina. (Dodson y Wlodawer, 1998).

Muchos investigadores han analizado en detalle los roles de las cadenas laterales en la catálisis de la serina-proteasas; estos estudios han revelado la naturaleza sinérgica de la contribución de las cadenas laterales a la mejora de la velocidad de reacción. En general, en las serina proteasas, los tres residuos de la triada catalítica tienen un rol específico, tal es el caso de un nucleófilo potente en el oxígeno del residuo de serina. El residuo de aspartato forma un puente de hidrógeno con el grupo imidazol adyacente. La interacción orienta al grupo imidazol en la triada e incrementa el pK_a y la basicidad en cierto grado. Esta es una ventaja porque la Histidina catalítica, al ser removida por el sustrato durante la reacción, tendría un pK_a reducido y sería más renuente a aceptar un protón. En la reacción catalítica, el grupo imidazol (actuando como base) acepta un protón del oxígeno serilo, se carga positivamente y forma un puente salino transitorio con el aspartato 102. Usualmente hay una geometría desfavorable entre el oxígeno y/o el nitrógeno tanto en la enzima libre como en la enzima inhibida. Esta geometría forzada o tensa, reduce la energía del puente de hidrógeno, el cual podría ser importante en la liberación del protón del oxígeno serilo al grupo imidazol y, subsecuentemente en la liberación del péptido saliente (Dodson y Wlodawer, 1998).

Tripsina como enzima adaptada al frío

Los organismos en general han desarrollado la capacidad de vivir y adaptarse favorablemente en una amplia gama de entornos diferentes. Algunos organismos son capaces de vivir en ambientes de temperaturas extremadamente altas, mientras otros poseen la capacidad de crecer y desarrollarse en hábitats donde las temperaturas ambientales son sumamente bajas (D'Auria y Aurilia, 2009). Los peces antárticos son probablemente los vertebrados más adaptados al frío, puesto que su temperatura corporal está por debajo del punto de congelamiento de los líquidos corporales, sin embargo, llevan a cabo su metabolismo de forma eficaz durante todo el año. Estos organismos han capturado la especial atención de los científicos en las últimas décadas debido a las enzimas que facilitan su metabolismo. Estas enzimas tienen la propiedad de ser adaptadas al frío, es decir, pueden llevar a cabo reacciones catalíticas a temperaturas en las que la mayoría de las enzimas se encontrarían inactivadas. La sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) se considera un organismo adaptado al frío porque su hábitat oscila en rangos de temperatura que van de los 7° a los 22° C, y se puede encontrar desde Alaska hasta el Golfo de California; y en años fríos se extiende hasta Mazatlán. (Anaya, 2008).

Catálisis en la adaptación al frío

Durante una reacción catalítica las enzimas necesitan cierta cantidad de energía para llevar a cabo la formación del complejo activado. Esta energía requerida se conoce como energía de activación y depende en gran medida de la temperatura a la que se lleve a cabo la reacción. Siguiendo la ecuación de Arrhenius para describir esta reacción, tenemos:

$$K = Ae^{-E_a/RT}$$

Donde: K = constante de velocidad

A = factor de frecuencia o pre-exponencial que se obtiene de graficar $\ln K$ vs $1/T$

E_a = energía de activación

R = constante de los gases (8.31 kJmol^{-1})

T = temperatura de reacción en grados kelvin.

Al linealizar la ecuación tenemos: $\ln K = \ln A - E_a/RT$

Tal como se describe en la ecuación anterior, la velocidad de reacción depende directamente de la energía de activación, y también de la temperatura. Las enzimas adaptadas al frío, tienen modificaciones estructurales que les permiten “balancear” el aumento esperado en la E_a durante la reacción, mientras la temperatura disminuye (Marshall, 1997). Estas enzimas generalmente exhiben una velocidad de reacción elevada debido al decremento de la barrera de energía libre necesaria para el estado de transición. Dicho decremento es generalmente acompañado por una reducción en el número de interacciones que necesitan ser rotas durante la formación del estado de transición.

Es entonces razonable encontrar que estas enzimas contienen pliegues flexibles que tienen actividades específicas a bajas temperaturas. Debido a que las secuencias de aminoácidos involucrados en la catálisis son generalmente conservadas en otros homólogos termoestables, la causa de esta flexibilidad estructural de esta flexibilidad debe localizarse en otras partes de la estructura de la enzima (D'Auria y Aurilia, 2009).

También, se le atribuye dicha flexibilidad a la combinación de diversos factores como la reducción de la hidrofobicidad en el núcleo catalítico, el decremento de interacciones

iónicas y electrostáticas, el incremento de la carga en residuos de superficie que promueven interacciones con el solvente, bucles de superficie adicionales, un decremento en la razón de argininas/lisinas, menos interacciones interdominio e interacciones entre subunidades, así como menos interacciones entre grupos aromáticos (D'Auria y Aurilia, 2009; Marshall, 1997).

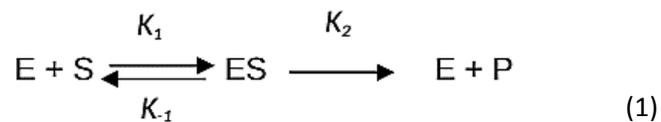
Está bien establecido que las enzimas psicrófilas, utilizan diferentes estrategias de adaptación donde cada familia de proteínas adopta su propia estrategia estructural (Papaleo y col., 2011) dejando a relucir entonces que la adaptación al frío no incluye nuevos mecanismos catalíticos, sino que los mecanismos convencionales son modificados para operar mejor a bajas temperaturas. Estudios de mutagénesis dirigida (específicamente en los residuos del sitio activo) demostraron un escaso aumento de la estabilidad proteica y por lo tanto, un escaso aumento de la eficiencia catalítica, dejando claro que la estrategia de adaptación es única para cada enzima (Gerday y col., 2000).

La aplicación de estas enzimas ofrece un potencial considerable en la industria biotecnológica, por ejemplo en la industria alimentaria se les utiliza para suavizar la carne, reducir la cantidad de lactosa en la leche, para mejorar la retención de aromas y humedad en el pan, para reducir la viscosidad de los jugos de frutas, entre otras. También se les da uso en la industria textil como aditivos en los detergentes que mejoran la calidad y suavidad de las telas o bien se les aplica ya sea para la producción de químicos y procesos de biorremediación. En los últimos años, el mercado de enzimas termoestables representa un capital de aproximadamente 250 millones de dólares en aplicaciones biotecnológicas (Gerday y col., 2000).

Así pues, una comprensión detallada de los mecanismos moleculares que regulan la relación entre estabilidad, flexibilidad y actividad en las enzimas psicrófilas es de crucial importancia para la investigación básica y aplicada. Gracias a los avances proporcionados por técnicas como la cristalografía de rayos X, la modelación molecular en 3D, la ingeniería de proteínas, así como estudios de mutagénesis dirigida en enzimas, las estrategias de adaptación de estas enzimas están comenzando a entenderse (Angelaccio y Florio, 2012).

Parámetros Cinéticos

La cinética es la disciplina que estudia la velocidad a la cual ocurre una reacción química. El estudio de la cinética de las reacciones enzimáticas comenzó en 1902 cuando Adrian Brown investigaba la velocidad de hidrólisis de la sacarosa por acción de la enzima de levadura β -fructofuranosidasa. Al observar ciertos fenómenos de esta reacción, Brown propuso que la reacción global estaba compuesta por 2 reacciones elementales en las que el sustrato forma un complejo con la enzima que subsecuentemente se descompone para aportar los productos y regenerar la enzima:



Donde:

E= enzima

S= sustrato

ES= complejo enzima-sustrato

P= producto.

De acuerdo con este modelo, cuando la concentración del sustrato se hace lo suficientemente alta como para llevar por completo a la enzima a la forma ES, el segundo paso de la reacción se hace limitante de la velocidad y la velocidad de la reacción global se hace insensible a los aumentos posteriores de la concentración de sustrato.

Cada una de las reacciones elementales que constituyen la reacción enzimática anterior se caracteriza por una constante de velocidad: k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad en sentido directo e inverso para la formación del complejo ES (la primera reacción) y K_2 es la constante de velocidad para la descomposición de ES a P (la segunda reacción), asumiendo que la segunda reacción es irreversible, o sea que P no se convierte nuevamente en S (Voet y col., 2009).

La ecuación de Michaelis-Menten

La ecuación de Michaelis-Menten describe la velocidad de una reacción enzimática representada (en la ecuación 1) como una función de la concentración de sustrato, de modo que la formación de producto a partir de ES es un proceso de primer orden. Esto permite que la velocidad de formación del producto pueda expresarse como el producto entre la constante de velocidad de la reacción que genera el producto y la concentración de su intermediario inmediatamente anterior, como se muestra en la ecuación 2:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad (2).$$

La velocidad global de producción de ES es la diferencia entre las velocidades de las reacciones elementales que llevan a su aparición y las que conducen a su desaparición:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] \quad (3).$$

Sin embargo, esta ecuación no puede integrarse en forma explícita sin hacer 2 supuestos simplificadores.

1. Suposición de equilibrio. En 1913 Leonor Michaelis y Maud Menten, basándose en el trabajo de Victor Henri, asumieron que $k_{-1} \gg k_2$, de modo que el primer paso de la reacción alcanza el equilibrio:

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

Donde K_S = constante de equilibrio.

2. Suposición de estado estacionario. El concepto de estado estacionario se utiliza ampliamente en los sistemas dinámicos. Se refiere al valor de una cantidad particular que se mantiene constante, o en estado estacionario, cuando su velocidad de formación queda contrarrestada por su velocidad de destrucción (Fersht, 1980). En este caso en particular, se

refiere al estado en que la velocidad de síntesis de ES debe ser igual que su velocidad de consumo durante la mayor parte del curso de la reacción, de manera que [ES] puede tratarse como si tuviera un valor constante:

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

Esta suposición de estado estacionario, una condición más generalizada del estado de equilibrio, fue propuesta en 1925 por G. E. Briggs y John B. S. Haldane (Voet y col.,2009; Fersht 1980).

Si se combina la suposición del estado estacionario con la ecuación 3, obtenemos que

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (4).$$

Generalmente, las cantidades de [ES] y [E] no son directamente mesurables, pero la concentración total de la enzima sí, de tal manera que

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (5).$$

En consecuencia, la ecuación de velocidad para la reacción enzimática global en función de [S] y [E] puede deducirse al sustituir la ecuación 5 en la ecuación 4 y reordenar para obtener la expresión

$$\frac{([E]_T - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (6)$$

Cuyo valor resultante es conocido como la **constante de Michaelis-Menten (K_M)**:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Si se sustituye el valor de K_M en la ecuación 6 y se despeja [ES] tenemos que:

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

Entonces la expresión para la velocidad inicial de la reacción (v_0) puede calcularse mediante la ecuación:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt}_{t=0} = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Para alcanzar las condiciones de la suposición del estado estacionario, la concentración del sustrato debe ser mucho mayor que la de la enzima, lo que permite que cada molécula de enzima una en forma repetida una molécula de sustrato y la convierta en producto, de modo que $[ES]$ es constante. A altas concentraciones de sustrato cuando la enzima está saturada, es decir, está completamente bajo la forma ES se alcanza la velocidad máxima de reacción:

(9)

$$V_{m\acute{a}x} = k_2 [E]_T$$

Combinando la ecuación 9 con la ecuación 8 obtenemos la **ecuación de Michaelis-Menten**:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad (10)$$

que describe una hipérbola rectangular como se observa en la Figura 4.

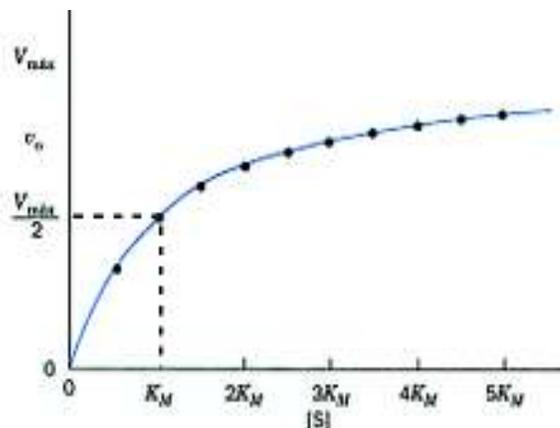


Figura 4. Gráfica de Michaelis-Menten (Voet y col., 2009).

La constante de Michaelis-Menten (K_M) tiene una definición operacional simple. A la concentración de sustrato a la que $[S] = K_M$, el valor de la velocidad inicial es igual a $V_{m\acute{a}x}/2$ de modo que K_M es la concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de la máxima; por lo tanto, si una enzima tiene un valor pequeño de K_M , alcanza la eficiencia catalítica máxima a bajas concentraciones de sustrato. Así, el valor de K_M es único para cada par enzima-sustrato y las diferentes enzimas que actúan sobre un solo sustrato tienen distintos valores de K_M , que depende también de la temperatura y el pH de reacción.

La constante de equilibrio K_S es la constante de disociación del complejo de Michaelis. A medida que disminuye K_S , aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato. Debido a que el valor de K_M está directamente relacionado con el valor de la constante de equilibrio, K_M es también una medida de la afinidad de la enzima por su sustrato (Voet y col., 2009).

Constante catalítica (k_{cat})

Se puede definir la constante catalítica (k_{cat}) de una enzima como:

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E]_T}$$

Este valor también se conoce como número de recambio de una enzima, porque es el número de procesos de reacción (o recambios) que cada sitio activo cataliza por unidad de tiempo. Estos valores pueden variar por encima de ocho órdenes de magnitud. Para un sistema simple de reacción, como el modelo de Michaelis-Menten, $k_{cat} = k_2$, mientras que para enzimas con mecanismos más complicados k_{cat} puede ser función de varias constantes de velocidad. Entretanto que k_{cat} es una constante, $V_{m\acute{a}x}$ depende de la concentración de la enzima presente en el sistema experimental de tal manera que la velocidad de reacción aumenta a medida que se incrementa la concentración de enzima total.

La velocidad varía directamente con la frecuencia con la que se encuentran la enzima y el sustrato en solución. El valor de k_{cat}/K_M es, por lo tanto, una medida de la eficiencia catalítica de una enzima. Hay un límite superior del valor de k_{cat}/K_M , no puede ser mayor que k_1 , esto es, la descomposición del complejo enzima-sustrato a enzima más producto, no puede ser más frecuente que la formación del complejo enzima-sustrato a partir de E y S. Las enzimas más eficientes tienen valores de k_{cat}/K_M cercanos al límite controlado por la

difusión de 10^8 a 10^9 $M^{-1} s^{-1}$. Estas enzimas catalizan prácticamente una reacción cada vez que encuentran una molécula de sustrato y en consecuencia, alcanzaron un estado de perfección catalítica virtual (Voet y col., 2009).

A concentraciones muy altas de sustrato, la velocidad inicial v_0 se aproxima en forma asintótica a $V_{m\acute{a}x}$. Sin embargo, en la práctica es muy difícil determinar $V_{m\acute{a}x}$ con exactitud a partir de los gráficos directos de velocidad inicial contra concentración de sustrato. Un método mejor para determinar los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M formulado por Hans Lineweaver y Dean Burk, utiliza la recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten. Tomando los inversos de ambos lados de la ecuación de Michaelis, se obtiene:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Ésta es una ecuación lineal de $1/v_0$ en función de $1/[S]$. Si estas magnitudes se grafican para obtener el llamado gráfico de Lineweaver-Burk o doble recíproco, la pendiente de la recta es $K_M/V_{m\acute{a}x}$. La intersección en $1/v_0$ es $1/V_{m\acute{a}x}$ y la extrapolación de la intersección en $1/[S]$ es $-1/K_M$ (Figura 5). Se pueden utilizar otros tipos de gráficos, cada uno con sus ventajas y desventajas para determinar K_M y $V_{m\acute{a}x}$ a partir de datos cinéticos, sin embargo, en la actualidad, los datos cinéticos comúnmente se analizan por computadora, utilizando tratamientos matemáticos estadísticos sofisticados.

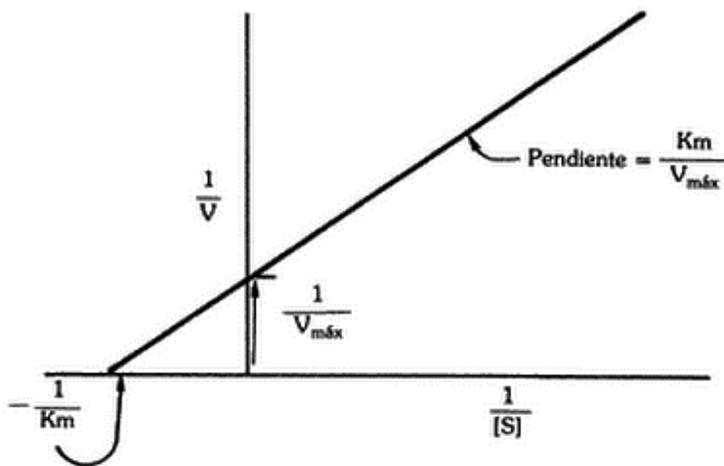


Figura 5. Gráfica de Lineweaver-Burk (Peña, 2004).

Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)

La introducción comercial de calorímetros disponibles lo suficientemente sensibles para medir el calor de interacciones biológicas fue a finales de la década de los ochentas y en la última década. La CTI se ha convertido en una herramienta necesaria para el estudio de los complejos de interacciones entre proteínas, las cuales juegan un papel clave en muchos procesos biológicos esenciales como la regulación de la actividad enzimática, el ensamblado de componentes celulares y la transducción de señales químicas. En los últimos años, el conocimiento acerca de la termodinámica del plegamiento de proteínas se ha obtenido mediante CTI y ha sido relativamente limitado. Sin embargo, este método combinado con otros métodos biofísicos ha brindado información útil sobre el plegamiento, ensamblado y desplegamiento de proteínas. Lo anterior es de gran interés médico porque está asociado a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la encefalopatía espongiforme transmisible y la enfermedad de Huntington (Liang, 2008).

También, en el campo de la inmunología, la elucidación de los roles de los puentes de hidrógeno involucrados en la asociación complementaria antígeno-anticuerpo requiere información tanto estructural como termodinámica. La cristalografía de rayos X junto con la técnica CTI proporcionan datos que indican que el enlace de hidrógeno formado a través del agua interfacial contribuye a la entalpía de la interacción entre el antígeno y anticuerpo a pesar de la oposición parcial debido a la pérdida de entropía, sugiriendo que los enlaces de hidrógeno brindan rigidez al complejo antígeno-anticuerpo (Liang, 2008). El uso del método CTI, se ha extendido incluso hasta ensayos de interacción entre un ligando y ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), o entre los mismos ácidos nucleicos. Como un método universal también puede tener una amplia aplicabilidad en genómica funcional (Buurna y Haq, 2007; Liang, 2008).

Otras de las nuevas aplicaciones o avances en este método es la titulación reversa. En este caso el reactante es colocado en la jeringa y se inyecta al "ligando" que se encuentra en la celda de reacción. Usualmente las moléculas pequeñas serían colocadas en la jeringa y la proteína blanco sería colocada en la celda. Las titulaciones reversas pueden ser utilizadas para comprobar la estequiometría o idoneidad de un modelo de enlace (Liang, 2008). Actualmente los experimentos de CTI pueden ser diseñados de tal manera que se puedan determinar parámetros que antes eran inaccesibles. Algunas de estas incluyen el

poder explotar diferentes condiciones experimentales, los ensayos en sistemas de baja afinidad y los ensayos en sistemas de alta afinidad mediante titulación de desplazamiento, lo cual se aplica en el campo de desarrollo de nuevos fármacos (Buurna y Haq, 2007).

En el desarrollo de nuevas drogas terapéuticas, un objetivo importante es diseñar inhibidores y ligandos que tienen una alta afinidad por las moléculas blanco. En la búsqueda de optimizar estas interacciones, la determinación precisa de la afinidad se vuelve progresivamente difícil una vez que se acerca o supera el nivel nanomolar (Holgate, 2001). La técnica de CTI puede usarse para determinar la termodinámica completa de unión de un ligando hasta un rango de concentración picomolar al utilizar un modo experimental llamado “titulación por desplazamiento” (Liang, 2008). Este método ha sido exitosamente aplicado en calorimetría cuando se trabaja con sistemas con muy alta o muy baja afinidad. Este método está basado en el hecho de que las propiedades del ligando se ven alteradas cuando otro ligando está presente. Para desarrollar este protocolo, se deben llevar a cabo 3 titulaciones: una titulación directa del ligando de alta afinidad a la proteína blanco, una titulación directa del ligando débil o de baja afinidad a la proteína blanco y una titulación de desplazamiento donde se titula el ligando de alta afinidad al complejo entre proteína-ligando débil. En esta titulación de desplazamiento, el ligando débil (o de menor afinidad) debe de estar presente en la celda calorimétrica a una concentración suficiente para reducir la afinidad del ligando de alta afinidad hasta niveles medibles (Liang, 2008).

Se puede resumir que el método de CTI se ha desarrollado para entender las interacciones moleculares y otros procesos biológicos dentro de las células, hasta un método ampliamente utilizado para investigar todo tipo de interacciones entre proteínas, incluyendo las interacciones entre proteína y DNA/RNA, entre proteínas y moléculas pequeñas.

Además de lo anteriormente mencionado, es importante resaltar que a partir de la calorimetría de titulación isotérmica se pueden obtener parámetros cinéticos (Liang, 2008; Buurna y Haq, 2007). Puesto que el calor es una propiedad intrínseca de todas las reacciones bioquímicas, esta técnica es relativamente fácil de llevar a cabo, lo cual permite obtener los parámetros cinéticos como K_M y k_{cat} con una pequeña cantidad de proteína, lo cual convierte a el ITC en una valiosa herramienta en la investigación de la ciencia de las enzimas (Liang, 2008).

El microcalorímetro de titulación isotérmica consta de dos celdas (una celda donde se coloca la muestra y otra celda de referencia) que son mantenidas a una temperatura constante mediante la adición continua de poder térmico. La diferencia de temperatura entre la celda de referencia y la celda que contiene la muestra es registrada y un nivel variable de poder térmico es suministrado a la celda de la muestra con el fin de disminuir la diferencia de temperatura hasta cero. El poder térmico total en la celda de la muestra es la suma del poder térmico suministrado por el instrumento sumado a cualquier poder térmico químico generado en la celda el cual se mantiene constante durante el experimento (Todd y Gómez, 2001; Bjelic´ y Jelesarov, 2008).

Controlando lo anterior, la velocidad de reacción es determinada mediante la medición del cambio de poder térmico instrumental suministrado a la celda de la muestra después de la adición del sustrato o la enzima. Si la reacción en la celda genera calor (exotérmica), el calorímetro deberá suministrar menos poder para mantener constante la temperatura, y se observará un cambio negativo en el poder térmico. Por el contrario, si la reacción consume calor (endotérmica), el calorímetro deberá suministrar poder térmico adicional para mantener las condición isotérmica y se observará un cambio positivo en el poder térmico suministrado (Todd y Gómez, 2001).

En los ensayos para determinar la cinética de enzimas, una vez que el equilibrio térmico es alcanzado, la línea base del poder térmico instrumental es registrada antes de comenzar la reacción. Para determinar las velocidades de reacción, el cambio de poder asociado con la adición de sustrato es promediado durante los primeros 10 a 60 segundos después de la inyección y se resta de la línea base original. De esta forma, el ruido en la señal asociado con la dilución del sustrato es ignorado y la precisión de los datos se incrementa (Todd y Gómez, 2001).

En una reacción de pseudo primer orden el calor (Q) medido en función del tiempo (dt) es definido como el poder térmico o calorífico:

$$\text{Poder térmico} = \frac{dQ}{dt}$$

La cantidad de calor asociada a la conversión de n moles de sustrato a producto es dada por la ecuación:

$$Q = n \cdot \Delta H_{app} = [P]_{total} \cdot V \cdot \Delta H_{app}$$

donde V es el volumen de la solución en la celda de reacción (celda de muestra), P es la concentración molar del producto generado y ΔH_{app} es la entalpía molar de la reacción experimentalmente determinada. Así el poder térmico generado por una enzima inmediatamente nos da un conocimiento de la velocidad de acuerdo a la ecuación:

$$\text{Poder térmico} = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \cdot V \cdot \Delta H_{app}$$

Si se despeja la ecuación, se puede determinar la velocidad directamente:

$$\text{Velocidad} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{app}} \cdot \frac{dQ}{dt}$$

Una vez obtenida la velocidad, es fácil determinar las constantes de catálisis y de Michaelis-Menten al despejarlas de la siguiente ecuación, sustituyendo el valor de velocidad:

$$\text{Velocidad} = \frac{k_{cat} \cdot [E_{Total}] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

donde $[E_{total}]$ es la concentración de enzima total de la reacción, $[S]$ es la concentración total de sustrato, K_{cat} es la constante de catálisis o de recambio y K_M es la constante de Michaelis-Menten.

Para calcular el valor de ΔH_{app} este se determina al permitir que la reacción sea completada e integrar la señal para obtener el total del calor involucrado, como se muestra en la ecuación

$$\Delta H_{app} = \frac{1}{[S_{Total}] \cdot V} \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ(t)}{dt} dt$$

En una calorimetría de inyección múltiple, después de que la temperatura se reequilibra, una segunda inyección de sustrato brinda una nueva curva con un área y forma idéntica a la primera, permitiendo confirmar el valor de ΔH_{app} (Todd y Gómez, 2001). Los ensayos cinéticos mediante CTI tienen dos modalidades. En la primera modalidad, la enzima puede ser titulada varias veces con cantidades crecientes de sustrato mientras se mantengan las condiciones de una reacción de pseudo-primer orden. En la segunda, la enzima puede ser titulada con una sola inyección, y el cambio de poder térmico suministrado es continuamente monitoreado mientras el sustrato se va reduciendo en la reacción. Las dos técnicas permiten una caracterización cinética altamente precisa y esto puede ser utilizado también para medir la inhibición enzimática (Liang, 2008).

Este método no destructivo permite el análisis preciso de reacciones en soluciones espectroscópicamente opacas utilizando sustratos fisiológicos. Además, estudios recientes han resaltado la factibilidad de utilizar el método de CTI en soluciones no ideales, otra ventaja de este método es que permite descartar la influencia del efecto perturbador de osmolitos extraños presentes en una reacción enzimática, efecto que frecuentemente representa una desventaja en los métodos espectroscópicos tradicionales (Bjelic' y Jelesarov, 2008; Liang 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los reactivos utilizados durante el proceso de purificación fueron Trizma-HCl marca Sigma Aldrich grado reactivo de alta calidad, con una pureza del 99%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Sigma Aldrich grado reactivo plus pureza del 99%, NaCl marca Fermont grado reactivo pureza 99.6%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sigma Aldrich grado analítico, pureza 99.5%, Glicina Bio-Rad pureza grado electroforesis, Sephadex-G75 GE, pureza 100%. Para el análisis electroforético se utilizó, Acrilamida Bio-Rad grado biología molecular pureza 99.9%, Acrilamida Bis Bio-Rad grado biología molecular, pureza 99.9%, SDS Bio-Rad pureza grado electroforesis.

Para el ensayo de actividad específica se utilizó N- α -Benzoil-DL-arginina *p*-nitroanilida clorhidrato (BAPNA) Sigma Aldrich 99% puro, disuelto en DMSO marca Sigma Aldrich 99.9% puro, como sustrato para tripsina I de sardina Monterey, así como para las primeras etapas de estandarización de las condiciones de inyección de CTI, con tripsina bovina Sigma Aldrich T.1426 (90-100% UV).

Para los ensayos cinéticos mediante espectrofotometría y CTI con tripsina de sardina Monterey, se utilizó N- α -Benzoil-L-arginina etil éster clorhidrato (BAEE) Sigma Aldrich B4500 pureza 99% como sustrato. Para la preparación del amortiguador utilizado en la reacción se utilizó polietilenglicol (PEG) 8000, Sigma Aldrich grado biología molecular, pureza 99% además de Trizma-HCl y CaCl_2 descritos anteriormente.

Obtención de la Muestra

Los ejemplares de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) se obtuvieron de la empresa de Productos Pesqueros de Guaymas S.A. a través del Laboratorio de Productos Pesqueros de Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD). Se evisceraron 130 ejemplares,

y se obtuvieron alrededor de 65.8 g de ciegos pilóricos, se dividió en porciones de 29.36 g y 36.38 g los cuales se utilizaron para la extracción y purificación de tripsina.

Extracción de la Tripsina

Se homogenizaron 36.38 g de ciegos pilóricos en 182 mL de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 10 mM de CaCl₂, 0.5 M de NaCl) durante 1 min en intervalos de 15 s. El homogenizado se dejó reposar 12 h a 4°C, y se centrifugó a 20,000 x g durante 45 min. Se consideró el sobrenadante como el extracto enzimático crudo que es donde se encuentran las enzimas digestivas y se descartó el precipitado. Se recuperaron 175 mL de extracto crudo a los que se les agregaron aproximadamente 5 mL de CCl₄ y se dejó reposar durante 60 min para eliminar la mayor cantidad de grasa posible. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 20,000 x g durante 30 min para eliminar la grasa sólida fácilmente. Se obtuvieron 160 mL de clarificado el cual se precipitó con sulfato de amonio al 70% de saturación. Una vez disuelto el sulfato de amonio, se centrifugó a 20,000 x g durante 45 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se recuperaron 5.70 g de precipitado, que fue resuspendido en 70 mL de tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M). Se tomó la muestra y se dejó dializar en tampón A durante aproximadamente 12 h, a una temperatura de 4°C con dos recambios de tampón (Castillo, 2006).

Purificación de Tripsina Mediante Cromatografía de Exclusión Molecular

El clarificado obtenido en la parte anterior se eluyó en una columna de cromatografía de exclusión molecular (1.6 x 70 cm) utilizando como fase estacionaria Sephadex G-75 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). El tampón A fue utilizado como la fase móvil y se eluyeron los 70 mL de muestra a un flujo de 0.25 mL/min. Se colectaron fracciones de 5 mL a las cuales se le determinó proteína directamente a 280 nm, así como con ensayo de Bradford a 595 nm. También se evaluó la actividad específica de tripsina utilizando BAPNA (benzoil-arginina-*p*-nitroanilida) como sustrato específico (Castillo, 2006). El patrón electroforético se determinó en condiciones desnaturalizantes y reductoras.

Ensayo de Actividad Específica

La actividad específica de tripsina se evaluó de acuerdo al método de Erlanger et al. 1961 el cual se basa en el incremento de la absorbancia a 410 nm a 25 °C utilizando como sustrato benzoil-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA). Experimentalmente, se tomaron 50 µL de la solución enzimática y se añadieron a una solución de 150 µL de BAPNA 10 mM en tampón Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM. El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pocillos y se leyó absorbancia en un lector de microplacas con un filtro de 415 nm.

Purificación de Tripsina Mediante Cromatografía de Afinidad

De las fracciones con mayor actividad que se obtuvieron a partir de la cromatografía de exclusión molecular, se tomaron las fracciones con un patrón electroforético similar y mayor cantidad de proteína y se eluyeron por una columna de afinidad a benzamidina (HiTrap Benzamidine FF, GE) con un flujo de 0.25 mL/min; una vez que la absorbancia fue mayor a 0.04 se cambió el tampón de elución por el tampón B (Glicina-HCl 50 mM, pH 3.0). Cada tubo de ensayo en el que se recolectaron las fracciones, contenía previamente 500 µL de tampón Tris-HCl 1M, pH 9.0 y se recolectaron fracciones de 5 mL.

Se colectaron fracciones de 5 mL a las cuales se les determinó proteína directamente a 280 nm, así como por el método de Bradford a 595 nm. También se evaluó la actividad específica de tripsina utilizando BAPNA (benzoil-arginina-*p*-nitroanilida) como sustrato específico (Castillo, 2006). El patrón electroforético se determinó en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemmli, 1979).

Determinación de Parámetros Cinéticos Mediante Espectrofotometría

Se realizó el análisis de la cinética enzimática de tripsina I de sardina Monterey, utilizando la fracción 20 obtenida en el paso descrito previamente. Se utilizó una solución amortiguadora compuesta de polietilenglicol 8000 (PEG) al 0.2%, CaCl₂ 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.0

(Todd y Gómez, 2001), en la cual se disolvió el sustrato benzoil-arginina-etil-ester (BAEE) para generar una solución estándar de 9.94 mM. Con la enzima purificada se preparó un estándar 10 nM en dicho amortiguador.

Se utilizaron concentraciones de BAEE de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 y 400 μ M. Los ensayos se llevaron a cabo en celdas de cuarzo de 2.5 mL de capacidad por 1 cm de longitud, en un rango de longitud de onda de 210 a 450 nm durante 90 min, midiendo la absorbancia cada 45 s. El volumen de las soluciones en cada celda para el ensayo cinético fue de 2 mL y se prepararon de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Ensayo cinético de tripsina I de sardina Monterey, utilizando BAEE como sustrato.

μL de Amortiguador	μL Tripsina	μL de sustrato (BAEE)	Concentración del sustrato (BAEE)
1979	20	1	5
1978	20	2	10
1976	20	4	20
1970	20	10	50
1960	20	20	100
1940	20	40	200
1920	20	60	300
1900	20	80	400

Todos los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro de arreglo de diodos marca Agilent 8453 con un controlador de temperatura Thermo Scientific SC 100. Se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo a 15, 20 y 25°C y se promediaron los valores de los resultados más cercanos entre sí. El valor promedio se graficó y se determinaron las constantes cinéticas a partir de dicha gráfica. Todo el análisis de datos se llevó a cabo en el software Origin Lab v. 9.1

Determinación de Parámetros Cinéticos Mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)

Estandarización del método

De manera inicial se estandarizaron las condiciones del método mediante una serie de experimentos con distintas concentraciones de tripsina bovina comercial, utilizando BAPNA y BAEE como sustratos.

Se preparó una solución estándar del sustrato BAPNA con una concentración de 9.94 mM. La concentración de la tripsina bovina fue 10 nM. La enzima fue titulada con el sustrato a 25°C, con retraso inicial de 100 s, una duración de la inyección de 50 s y un espaciamiento de 180 s después de la inyección, con un suministro de poder de 10, un periodo de filtro de 2 s y una velocidad de rotación de la jeringa de 307 rpm. Se probaron concentraciones finales de sustrato en la muestra de 171 μ M, 85.5 μ M, 17.04 μ M. Para generar el calor de dilución se tituló el tampón polietilenglicol 8000 (PEG) al 0.2%, CaCl₂ 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.0 con BAPNA bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Debido a que el calor de dilución fue excesivo, de tal manera que enmascaraba el calor de interacción entre enzima-sustrato, se seleccionó el sustrato BAEE (benzoil-arginina-etil-éster) para realizar los ensayos cinéticos con tripsina bovina.

Se encontró que las condiciones ideales de titulación a 25°C fueron: concentración de sustrato BAEE 9.94 mM, concentración de tripsina bovina 10 nM, velocidad de rotación de la jeringa de 307 rpm, volumen de inyección de 25 μ L, retraso inicial de 60 segundos, duración de la inyección de 1400 segundos, seguida de un espaciamiento de 1580 segundos, con un periodo de filtro de 2 s y un suministro de poder de 10, utilizando el tampón de reacción polietilenglicol 8000 (PEG) al 0.2%, CaCl₂ 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.0 con (Todd y Gómez, 2001). Para estimar el calor de dilución se tituló el tampón antes descrito con BAEE bajo las mismas condiciones ya mencionadas.

Ensayos cinéticos con Tripsina I de Sardina Monterey

Después de realizada la purificación de tripsina I, se efectuaron los ensayos cinéticos en un microcalorímetro marca MicroCal VP-ITC, para determinar la constante de Michaelis-Menten y la constante catalítica a temperaturas de 4, 10, 15, 20 y 25°C.

Los ensayos se realizaron con un suministro de poder de 10, la concentración del sustrato BAEE fue 9.94 mM, la concentración de tripsina I de sardina fue 10 nM, el volumen de inyección de 25 μ L, un retraso inicial de 60 s, la duración fue de 1400 s, seguida de un espaciado de 1800 s con un periodo de filtro de 2 s y una velocidad de rotación de la jeringa de 307 rpm. Para generar el calor de dilución se tituló el tampón de polietilenglicol 8000 (PEG) al 0.2%, CaCl_2 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.0 con BAEE bajo las mismas condiciones de inyección. Los datos fueron registrados y analizados por el programa Origin v 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de Tripsina de Sardina Monterey

En la purificación de tripsina I de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) se obtuvo un volumen de extracto crudo de 160 mL, los cuales presentaron 176 mg de proteína total con una actividad específica de 1.9 U/mg, que es 3.2 veces menor a lo reportado por Castillo y colaboradores en el 2006. Se logró obtener el 1 % de recuperación de la enzima pura con una concentración de 0.17 mg/mL el cual presentó un aumento en la actividad específica de 2.3 veces con respecto al extracto crudo. La Tabla 3 muestra el resumen del proceso de purificación y la Figura 6 muestra el perfil electroforético del mismo, donde se puede observar una banda de alrededor de 25 kDa que corresponde al peso molecular de la tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

De acuerdo con la recuperación y porcentaje de rendimiento de proteína, además del incremento de 2.3 veces de la actividad específica en la última etapa de purificación, se define que el resultado del proceso es coherente con lo reportado previamente. De las fracciones de enzima pura recuperadas se utilizó la fracción 20 (obtenida de la cromatografía de afinidad a Benzamidina) para la obtención de las constantes cinéticas mediante ITC y mediante espectrofotometría.

Tabla 3. Resumen de purificación de tripsina de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

Etapas 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	160	176	1.1	334	1.9	100	1
Fracción a partir de S.A. F.G.	70	75	1.07	143	1.9	42.6	1
Sephadex G-75	3.5	2.2	0.62	6	2.8	1.3	1.5
Benzamidina	10	1.7	0.17	2.5	4.2	1	2.3

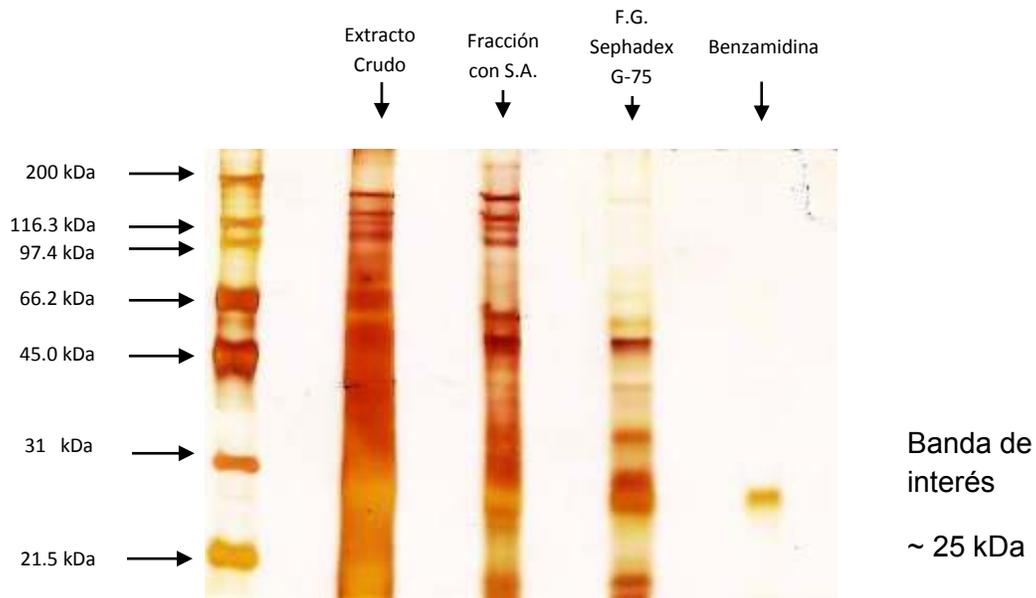


Figura. 6 Gel de resumen de purificación de tripsina I de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

Determinación de Parámetros Cinéticos Mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)

Se efectuaron diversos ensayos cinéticos en el calorímetro antes mencionado, para encontrar el resultado que mejor se ajustara a la curva de la gráfica de Michaelis-Menten de la reacción, descrita por el software (Origin v 8.0) integrado al ordenador del equipo. De estas repeticiones, se escogieron las que presentaron el ajuste más cercano a los valores modelo descritos por el software. A 20°C se obtuvo el ajuste que se observa en la Figura 7, donde [S]= concentración de sustrato y las líneas punteadas en las figuras, representan los valores experimentales obtenidos por el microcalorímetro, mientras que las líneas continuas representan los valores modelo propuestos por el análisis realizado por el software.

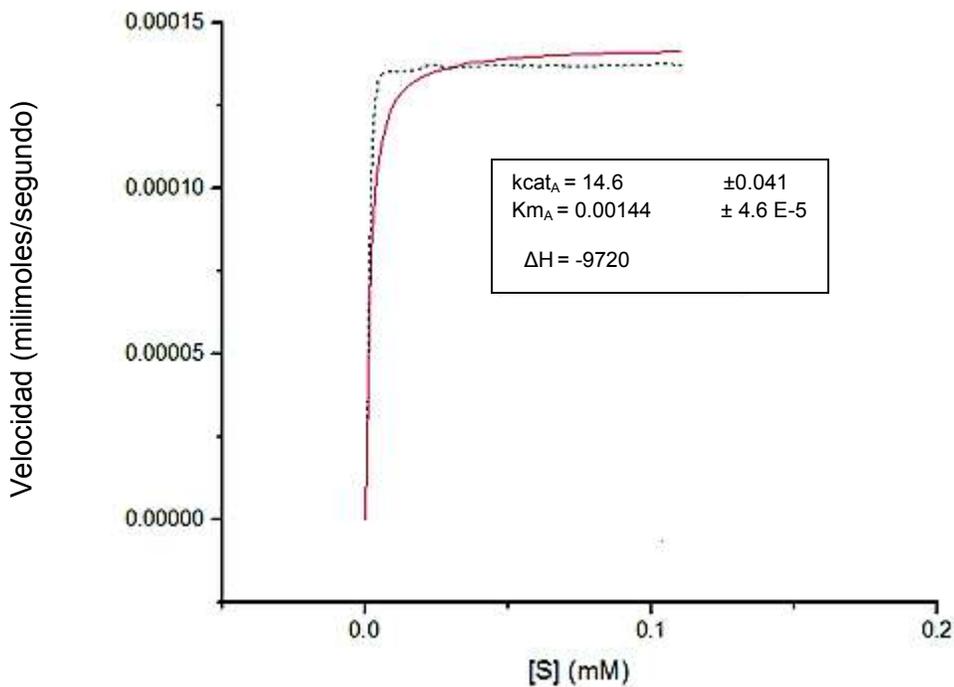


Figura 7. Ajuste cinético de tripsina I de sardina Monterey titulada con BAEE a 20°C obtenido mediante CTI.

Como se puede observar en la figura, la cinética de reacción muestra una hipérbola rectangular, característica de la ecuación de Michaelis-Menten. A partir de los datos obtenidos en esta gráfica, se encontró que el valor de k_{cat} a 20°C fue de 14.6 s⁻¹ con un error de ± 0.041 s⁻¹ y el valor de K_M de 0.00144 mM, con su respectivo error de $\pm 4.6 \times 10^{-5}$ mM.

Se puede observar que a 20°C la saturación de la enzima se logra rápidamente, alcanzando altas velocidades (aproximadamente 0.000137 mM/s) de reacción, lo que se muestra en la curva obtenida en la gráfica.

Así mismo, el ajuste obtenido a 15°C se muestra en la Figura 8:

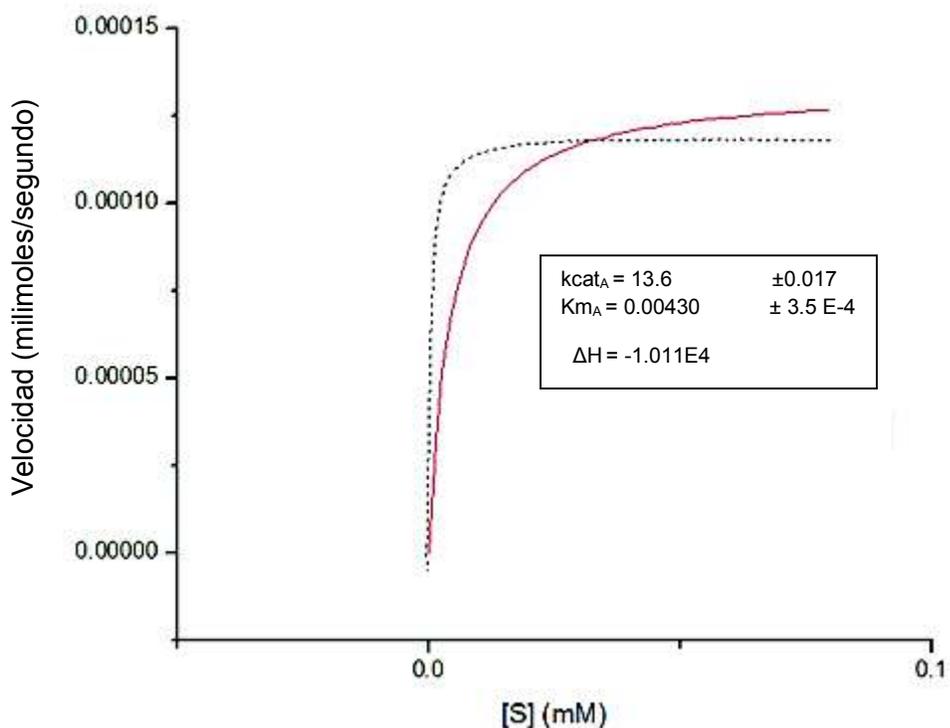


Figura 8. Ajuste cinético de tripsina I de sardina Monterey titulada con BAEE a 15°C obtenido mediante CTI.

A partir de la gráfica obtenida a 15°C, se obtuvo que el valor de k_{cat} resultó de 13.6 s^{-1} con un error de $\pm 0.17 \text{ s}^{-1}$ y el valor de K_M resultó de 0.00430 mM con su respectivo error de $\pm 3.5 \times 10^{-4} \text{ mM}$. La curva punteada obtenida de los datos experimentales muestra que la saturación de la enzima a 15°C se logra aproximadamente a una velocidad de 0.000125 mM/s , que es similar a la velocidad alcanzada a 20°C.

Así mismo, el ajuste obtenido a 4°C se muestra en la Figura 9.

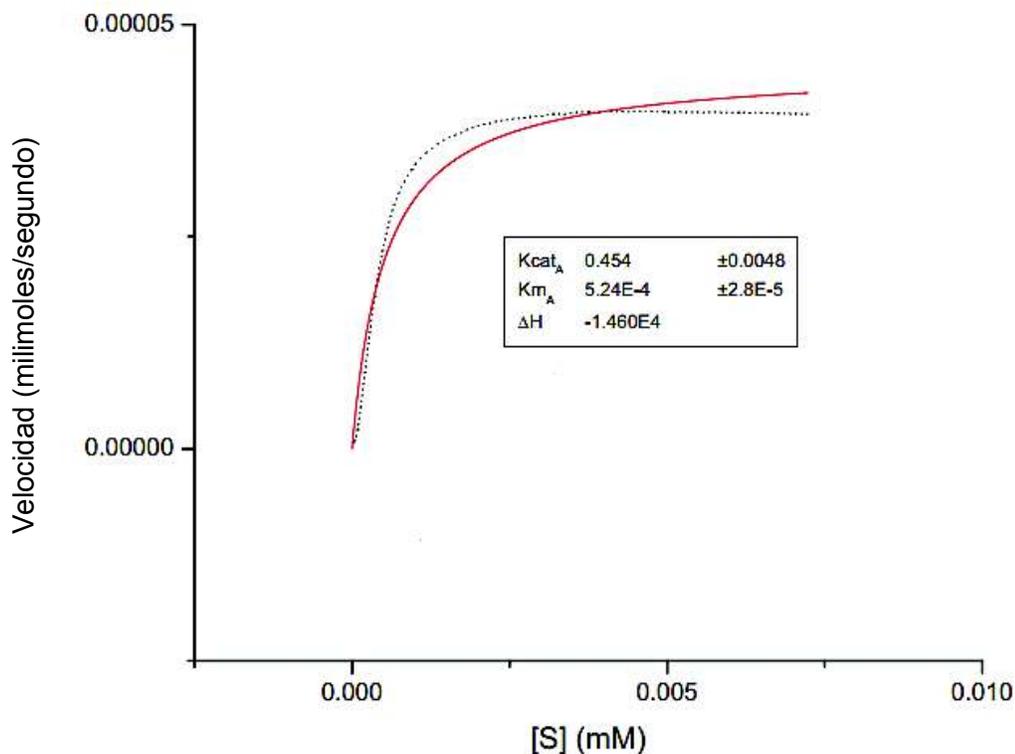


Figura 9. Ajuste cinético de tripsina I de sardina Monterey titulada con BAEE a 4°C obtenido mediante CTI.

Con base en la gráfica obtenida a 4°C, se obtuvo que el valor de k_{cat} resultó de 0.454 s^{-1} con su respectivo error de $\pm 0.0048 s^{-1}$ y el valor de K_M resultó de 0.00052 mM con un error de $\pm 2.5 \times 10^{-5}$ mM. La curva punteada representa la cinética de reacción obtenida a partir de los datos experimentales muestra que la saturación enzimática de la tripsina I en la hidrólisis de BAEE a 4°C se lleva a cabo a una velocidad aproximada de 0.0000375 mM/s, que es significativamente menor que en el ensayo realizado a 15°C, lo que se relaciona una saturación a menor concentración de sustrato a bajas temperaturas. Se puede observar una alta eficiencia catalítica de la tripsina I aún a pesar de la baja temperatura de reacción, eficiencia que es característica de las enzimas adaptadas al frío.

Determinación de Parámetros Cinéticos Mediante Espectrofotometría.

Se realizaron los ensayos cinéticos a temperaturas de 25°C, 20°C y 15°C. Se realizaron mínimo 3 repeticiones de cada ensayo y se promediaron los valores más cercanos entre sí, los cuales se graficaron para obtener los valores que se muestran en las Figuras 10, 11 y 12.

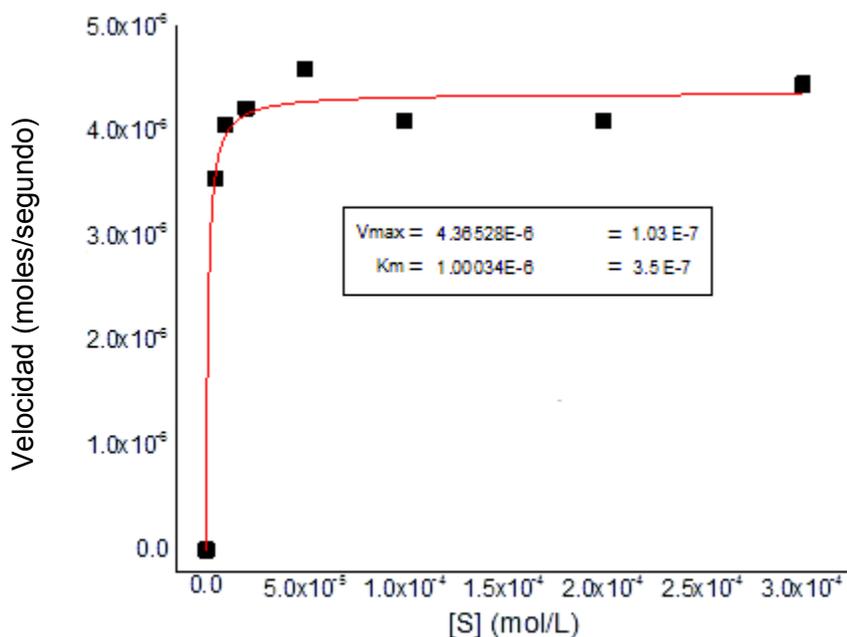


Figura 10. Cinética de la hidrólisis de BAEE por tripsina I de sardina Monterey a 25°C.

Partiendo los datos generados en la gráfica anterior se obtuvo que a 25°C la k_{cat} para esta reacción fue de 436.5 s^{-1} y la K_M de 0.0010 mM con un error de $\pm 3.4 \times 10^{-4} \text{ mM}$. En este ensayo se muestra una saturación de la enzima a una velocidad de $4.3 \times 10^{-3} \text{ mM/s}$ y se puede observar en la gráfica que la saturación se lleva a cabo a muy baja concentración de sustrato.

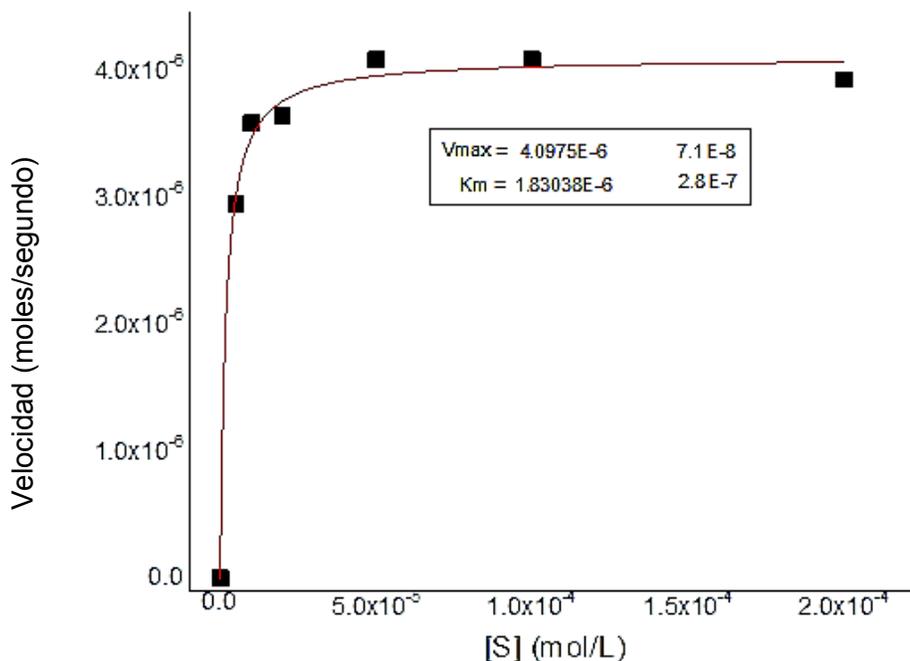


Figura 11. Cinética de la hidrólisis de BAEE por tripsina I de sardina Monterey a 20°C obtenida por espectrofotometría.

Con base en los datos generados a partir de la gráfica anterior se obtuvo que a 20°C, la k_{cat} para esta reacción resultó de 409.7 s⁻¹ y la K_M de 0.0018 mM con un error de $\pm 2.8 \times 10^{-4}$ mM. Como se puede observar en la gráfica, la saturación enzimática de tripsina I en esta reacción se llevó a cabo a una velocidad de 4.09 x10⁻³ mM/s. Esta velocidad es un poco menor que la velocidad de saturación observada en el ensayo a 25°C, sin embargo, esto es congruente con la disminución de la temperatura en el sistema de reacción. Se puede apreciar también, que la saturación se lleva a cabo a concentraciones de sustrato muy similares a las observadas en el ensayo a 25°C, es decir, bajas concentraciones BAEE.

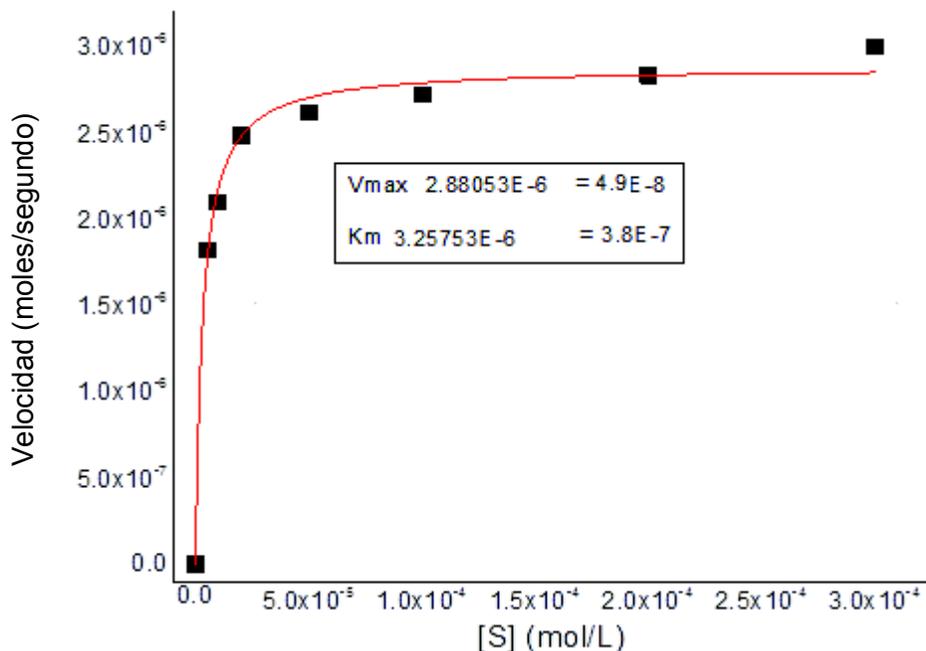


Figura 12. Cinética de la hidrólisis de BAEE por tripsina I de sardina Monterey a 15°C obtenida por espectrofotometría.

Los datos generados en la gráfica anterior arrojaron que a 15°C la k_{cat} para esta reacción resultó de 288.05 s⁻¹ y la K_M de 0.0032 x10⁻³ mM con su respectivo error de ± 3.8 x10⁻⁴ mM. La saturación enzimática se logra a una velocidad de 2.88 x10⁻³ mM. En esta gráfica en particular, se observa un marcado descenso en la velocidad a la cual se alcanza la saturación enzimática con respecto a las velocidades observadas a 25° y 20°C, sin embargo, este comportamiento es coherente con la disminución de la temperatura de reacción, ya que la velocidad de reacción es directamente proporcional a la temperatura debido al aporte de la misma en la entalpía de la reacción. Por otra parte, la concentración de sustrato a la cual se alcanza la saturación es muy similar a la observada en los ensayos de 25 y 20°C.

Al analizar los valores de los parámetros cinéticos obtenidos mediante espectrofotometría y por el método de ITC, se observa que a la misma temperatura de reacción, algunos de estos difieren considerablemente entre sí, lo cual se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de comparación de constantes cinéticas obtenidas a partir del método de CTI y por espectrofotometría.

	25°C	20°C	15°C	4°C
Método ITC k_{cat}	-----	14.6 s ⁻¹	13.6 s ⁻¹	0.454 s ⁻¹
Espectrofotometría k_{cat}	436.5 s ⁻¹	409.7 s ⁻¹	288.05 s ⁻¹	-----
Método ITC K_M	-----	0.0014 mM	0.0043 mM	0.00052 mM
Espectrofotometría K_M	0.0010 mM	0.0018 mM	0.0033 mM	-----

Los valores obtenidos para las constantes catalíticas (k_{cat}) por el método de espectrofotometría poseen magnitudes que podrían parecer desproporcionadas con respecto a los valores reportados para las constantes de Michaelis-Menten (K_M) en este trabajo, sin embargo, esto concuerda con lo reportado en la bibliografía para las enzimas adaptadas al frío. Cabe recordar que la tripsina I de sardina Monterey se ha reconocido como una enzima adaptada al frío (Quintero, 2008).

Muchos científicos han investigado el proceso de adaptación de las enzimas psicrófilas, y se ha encontrado que, en principio, las enzimas adaptadas al frío pueden optimizar su eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) al incrementar su k_{cat} y disminuir su valor de K_M . Una reacción enzimática se caracteriza por dos parámetros cinéticos fundamentales: k_{cat} y K_M y su constante específica k_{cat}/K_M , que es un mejor indicador de la eficiencia catalítica que sólo la k_{cat} , especialmente cuando las enzimas realizan la catálisis a muy bajas concentraciones de sustrato (Georlette y col., 2004; Hoyoux y col., 2004).

La termodependencia de la velocidad de reacción en las enzimas psicrófilas está únicamente sujeta a su k_{cat} , cuyos valores a bajas temperaturas pueden ser hasta 10 veces más altos que los valores de k_{cat} de sus homólogas mesofílicas. En la ecuación de Michaelis-Menten, la k_{cat} o número de recambio, es la constante de velocidad de una reacción de primer orden para la conversión del complejo enzima y sustrato a enzima y producto, por lo que, los

altos valores de k_{cat} exhiben una alta eficiencia de las estas enzimas en descender la energía de activación necesaria para la reacción (Georlette y col., 2004; Hoyoux y col., 2004; Johns y Somero, 2004).

En las enzimas adaptadas al frío la barrera de energía de activación es menor debido a un decremento en la entalpía de activación y una mayor negatividad de la entropía de reacción en comparación con los ortólogos mesófilos. La entalpía de reacción (ΔH^*) tiene una fuerte contribución a la energía libre de activación necesaria para la reacción (ΔG^*); de manera que a medida que la entalpía disminuye, la energía libre de activación disminuye su valor también, mientras la entropía (ΔS^*) adquiere una mayor negatividad ($\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$). Puesto que la ΔG^* determina el valor de k_{cat} , es de esperarse que el valor de k_{cat} dependa de la temperatura de reacción (Hoyoux y col., 2004; Johns y Somero, 2004).

La baja entalpía de activación es el principal parámetro de una reacción catalizada por las enzimas psicrófilas y es alcanzada por un reducido número interacciones que deben romperse para llegar al estado de transición. Estos cambios conformacionales durante la reacción deben proveer suficiente flexibilidad para incrementar la k_{cat} , pero deben ser menos estables que los de las enzimas mesófilas, de manera que el incremento en la k_{cat} sea logrado mediante la flexibilidad conformacional del sitio activo. Si el sustrato se une débilmente, la barrera de energía de activación se reduce y por consiguiente, se incrementa el valor de k_{cat} . La optimización de la afinidad del sustrato se puede obtener mediante la sustitución de aminoácidos no polares por aminoácidos polares en las enzimas psicrófilas y esta sustitución podría conducir al decremento de K_M a bajas temperaturas (Hoyoux y col., 2004).

Un proyecto realizado con la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) proveniente de peces damisela del pacífico, encontró que la K_M determinada para una versión recombinante de dicha enzima, no tuvo diferencias significativas con respecto a su ortólogo mesófilo, aunque se encontró que las sustituciones mutantes en la LDH recombinante tuvieron efectos diversos en la K_M (Johns y Somero, 2004).

En otro estudio efectuado con tripsina I adaptada al frío obtenida del bacalao se realizó la determinación de las constantes cinéticas de la hidrólisis del sustrato CBZ-Gly-Pro-Arg-pNA a 25°C, se utilizaron diferentes valores de pH, encontrando que la mayor eficiencia catalítica se alcanzó a un pH de 8.0, donde el valor de k_{cat} de 53.1 s⁻¹ mientras el valor de K_M resultó en 0.007 mM, alcanzando una eficiencia catalítica de 7590.0 s⁻¹ mM⁻¹. En dicho estudio se comparó la hidrólisis de CBZ-Gly-Pro-Arg-pNA mediante tripsina bovina a 25°C a

un pH de reacción de 8.0 y se obtuvo una k_{cat} de 105.6 s^{-1} , con una K_M 0.029 mM y una eficiencia catalítica de $3558.2 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (Stefansson y col., 2010).

Los estudios antes mencionados apoyan la idea de que la eficiencia catalítica es mayor en enzimas adaptadas al frío, y que el aumento de k_{cat} a expensas de la disminución de K_M es una estrategia común empleada por las enzimas psicrófilas, lo que se pudo observar en este trabajo.

Otro dato interesante del trabajo realizado por Stefansson y colaboradores en 2010, fue que la tripsina I recombinante mostró una mayor estabilidad frente a la escisión autolítica con respecto a la tripsina I nativa del bacalao, hecho que puede ampliar la aplicabilidad comercial de los enzimas psicrófilas recombinantes, lo que merece especial atención y un análisis cuidadoso de qué tipo de mutaciones pudieran aumentar la eficiencia catalítica de la tripsina I psicrófila.

Se podría pensar que los valores para k_{cat} obtenidos en este ensayo, son de magnitudes anormales o difieren considerablemente, sin embargo, en una investigación desarrollada por Gardner y colaboradores en 2012, se cuantificaron los parámetros cinéticos para la acción de la tripsina sobre la proinsulina humana y sus especies intermediarias involucradas en la conversión de proinsulina en insulina y se obtuvieron valores de k_{cat} de 11.6 y 14.7 s^{-1} y valores de K_M de 0.0133 mM y 0.0115 mM . Por otra parte, los parámetros para la hidrólisis de BAEE por tripsina evaluados en dicho ensayo resultaron de k_{cat} de 16.5 s^{-1} y K_M de 0.00153 mM . Estas reacciones se llevaron a cabo por tripsinas mesófilas a una temperatura de 37°C . Mientras tanto, un estudio realizado por Xin Jiang y col. 2014, para la oxidación de tetrametilbenzamidina (TMB) por peróxido de hidrógeno, simulando la actividad de peroxidasa, mostró un valor de k_{cat} de hasta $5.8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ y una K_M de 0.097 mM .

Dichos estudios respaldan la idea de que los valores en órdenes de magnitud elevados para la constante catalítica (k_{cat}) son una posibilidad común en la catálisis enzimática, por lo que se puede inferir que los valores para k_{cat} obtenidos mediante CTI y espectrofotometría para la hidrólisis de BAEE por tripsina I de sardina Monterey son congruentes.

Como se puede observar en la Tabla 5, en este trabajo se obtuvo que las constantes catalíticas (k_{cat}) generadas mediante el método de CTI y espectrofotometría difieren en un orden de magnitud; mientras que en las constantes de Michaelis-Menten (K_M) se obtuvieron

valores similares. Esto puede explicarse por la diferencia de la naturaleza intrínseca de los métodos utilizados.

En los años 30's surgió la espectrofotometría como una herramienta invaluable para la determinación de cinéticas de reacción la cual permite que los estudios de cinética química se lleven a cabo controlando una propiedad física en la mezcla de reacción. La determinación de una característica física varía de manera considerable de un método a otro (potenciometría, conductividad eléctrica, espectrofotometría, etc.), propiciando diferencias entre los parámetros cinéticos obtenidos de un método con respecto a otro, por lo que es de esperarse que dichos parámetros varíen también de un método físico a un método termodinámico como lo es la calorimetría (González, 1985; Logan, 2000).

Aunque en 2001 Todd y Gómez reportaron valores k_{cat} y K_M similares para la hidrólisis de glucosa por tripsina en determinaciones realizadas mediante CTI y otros métodos tradicionales, estos valores están dados para una tripsina mesófila, por lo que es razonable que los valores pudieran diferir de los obtenidos para una enzima psicrófila o adaptada al frío como en este trabajo.

Otro de los tópicos a discutir en este trabajo, es que la calorimetría de titulación isotérmica (CTI) posee ciertas ventajas sobre la espectrofotometría, como por ejemplo, un control más estricto sobre la temperatura de reacción, que es un requisito necesario para que el estudio de la cinética de una reacción química sea significativo puesto que las velocidades de reacción dependen directamente de la temperatura (Logan, 2000).

Esta ventaja permite realizar ensayos cinéticos a bajas temperaturas que son difícilmente realizados mediante la espectrofotometría convencional, tal es el caso del ensayo a 4°C realizado por CTI, que en este trabajo, no pudo ser desarrollado por espectrofotometría. Esto debido a que las celdas se encontraban expuestas al medio ambiente, y la temperatura ambiental externa afectaba directamente en la temperatura del ensayo, que a su vez estaba regulada por un sistema hidráulico que disminuía o aumentaba la temperatura de las celdas, y que a estas temperaturas, la humedad del medio ambiente se condensaba en las paredes externas de las celdas, interfiriendo con el haz de luz y dificultando en sumo grado la correcta medición de absorbancia generada por la reacción, provocando que las determinaciones a

temperaturas menores de 15°C no pudieran realizarse con precisión. Este problema se incrementó en las temporadas de lluvia y tormentas tropicales, puesto que la humedad del ambiente alcanzó hasta el 55% en ciertos días.

Además, otra de las ventajas de la CTI que se refleja en este trabajo, fue la óptima homogenización de la mezcla de reacción, ya que en el equipo del método por CTI la jeringa gira a 307 rpm y agita la solución al mismo tiempo que inyecta el sustrato para favorecer la homogenización completa de la mezcla de reacción. Esto es importante para iniciar una reacción en solución, ya que lograr la homogeneidad completa por difusión de los reactivos es un proceso notoriamente lento. Por tanto, en el caso de reacciones químicas en disolución que deben estudiarse en un periodo de pocos minutos, la mezcla completa debe alcanzarse desde el comienzo para que los resultados obtenidos sean representativos (Logan, 2000). Mientras en el método espectrofotométrico en este trabajo, la enzima se colocó en la celda de reacción manualmente, procedimiento que está sujeto a múltiples errores por parte del operador y que pudieran ser reflejados en el tiempo de estabilización de la reacción enzimática.

Así como la CTI presenta ventajas, también existen ciertas desventajas que se deben de considerar. Una de las desventajas es la cantidad de tiempo que puede tomar el llevar a cabo un solo ensayo (Feshner y col.,2014). Esto se debe al hecho de que el equipo puede tardar en estabilizar el sistema a una determinada temperatura desde unos minutos hasta horas o bien puede deberse al tiempo intrínseco que la reacción necesita para llevarse a cabo de manera completa y reproducible, característica que se reflejó en este proyecto. Dicha desventaja va muy ligada a la estandarización de los criterios de inyección de dicho ensayo, que también representó en este caso, una desventaja para el usuario en cuestión de tiempo y otros recursos materiales.

Otra desventaja de utilizar la CTI para llevar a cabo ensayos de cinética enzimática, es la cantidad de enzima que se necesita en cada ensayo en comparación con la espectrofotometría u otros métodos (Fechner y col., 2014). En este trabajo el método de CTI requería 2.5 mL de tripsina de Sardina Monterey 10 nm, mientras que la espectrofotometría requirió sólo 20 µL por celda.

Los resultados obtenidos en este trabajo, así como las ventajas y desventajas de la CTI reportados en la bibliografía, nos orientan a la afirmación de que la CTI puede ser implementada como un método alternativo para determinar la cinética enzimática de la tripsina.

CONCLUSIONES

Con base en el análisis electroforético y de actividad específico realizados, se logró la purificación de tripsina I procedente de los ciegos pilóricos de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

El valor de la constante de catálisis (k_{cat}) obtenido a partir del método de calorimetría de titulación isotérmica de inyección simple difiere considerablemente del valor de la constante de catálisis calculada por el método de espectrofotometría.

Los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_M) generados mediante calorimetría de titulación isotérmica de inyección simple son similares a los obtenidos mediante el método espectrofotométrico.

Podemos definir a la calorimetría de titulación isotérmica como un método alternativo para la determinación de parámetros cinéticos no solo de la hidrólisis enzimática llevada a cabo por tripsina, si no para otros procesos enzimáticos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda estandarizar las condiciones de inyección del método de CTI utilizando BAPNA como sustrato. Es decir, buscar las condiciones donde el calor de dilución sea menor que el calor de interacción de manera que no lo enmascare.

Se recomiendan realizar ensayos cinéticos con tripsina I recombinante mediante CTI para determinar las constantes cinéticas (k_{cat} y K_M) de tripsina I que ha sido sometida a mutagénesis sitio-dirigida y compararlas con los resultados tripsina I endógena obtenidos en este trabajo, de forma que pueda estudiarse el efecto de la mutagénesis sitio-dirigida en la catálisis de la reacción.

En cuanto al protocolo experimental, en la purificación de tripsina I procedente del ciego pilórico de la sardina Monterey, se recomienda ampliamente utilizar la cromatografía de afinidad a benzamidina, realizando el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos. Se recomienda utilizar una fracción con proteína cada vez y lavar la columna después de eluir la fracción, para evitar la saturación de la columna y obtener la enzima pura.

BIBLIOGRAFÍA

Angelaccio S, Florio R, Consalvi V, Festa G, Pascarella S. Serine Hydroxymethyltransferase from the Cold Adapted Microorganism *Psychromonas ingrahamii*: A Low Temperature Active Enzyme with Broad Substrate Specificity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(2):1314-26.

Anaya Barragán, C. Obtención del ADNc Del Tripsinógeno Tipo III de Vísceras de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*). Tesis Profesional Químico Biólogo Especialidad en Tecnología de Alimentos. Hermosillo, Sonora, Diciembre de 2008

Arvizu-Flores AA, Quintero-Reyes IE, Felix-Lopez M, Islas-Osuna MA, Yepiz-Plascencia G, Pacheco-Aguilar R, et al. Thermodynamic activation and structural analysis of trypsin I from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Food Chemistry*. 2012;133(3):898-904.

Bjelic S, Jelesarov I. A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry. *Journal of Molecular Recognition*. 2008;21(5):289-311.

Buurma NJ, Haq I. Advances in the analysis of isothermal titration calorimetry data for ligand-DNA interactions. *Methods*. 2007;42(2):162-72.

Castillo-Yanez FJ, Pacheco-Aguilar R, Garcia-Carreño FL, Navarrete Del Toro M, Lopez MF. Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food Chemistry*. 2006;99(2):252-9.

Castillo-Yañez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, Navarrete-Del Toro MdlÁ. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B*. 2005;140(1):91-8.

Castillo-Yañez FJ, Pacheco-Aguilar R, Garcia-Carreño FL, Toro MdlAN-D. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry*. 2004;85(3):343.

Castillo-Yañez FJ, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sanchez ME, Garcia-Sanchez G, Quintero-Reyes IE. Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of

Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. *Food Chemistry*. 2009;112(3):634-9.

Castro-Ceseña AB, del Pilar Sánchez-Saavedra M, Márquez-Rocha FJ. Characterisation and partial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. *Food Chemistry*. 2012;135(2):583-9.

Carretas Valdez, M. I., Replegamiento In Vitro del tripsinógeno III de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) sobreexpresado en *Escherichia Coli*. Tesis profesional Químico Biólogo Clínico. Hermosillo, Sonora, Enero del 2011.

D'Auria S, Aurilia V, Marabotti A, Gonnelli M, Strambini G. Structure and Dynamics of Cold-Adapted Enzymes as Investigated by Phosphorescence Spectroscopy and Molecular Dynamics Studies. 2. The Case of an Esterase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Physical Chemistry B*. 2009;113(40):13171-8.

Dodson G, Wlodawer A. Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences*. 1998;23(9):347-52.

Fechner P, Bleher O, Ewald M, Freudenberger K, Furin D, Hilbig U, et al. Size does matter! Label-free detection of small molecule-protein interaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014;406(17):4033-51.

Fersht, A. 1980. Estructura y mecanismo de los enzimas. 1ra Ed. Editorial Reverte, 400 p. (85-94)

Gardner Q-t-AA, Younas H, Akhtar M. Studies on the regioselectivity and kinetics of the action of trypsin on proinsulin and its derivatives using mass spectrometry. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 2013;1834(1):182-90.

Georlette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, et al. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *Fems Microbiology Reviews*. 2004;28(1):25-42.

Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2000;18(3):103-7.

González Ureña, A. 1985. Cinética y dinámica molecular de las reacciones químicas elementales. 1ra Ed. Editorial Alhambra.

González, Y. Inhibidores de serino proteasas de naturaleza proteica aislados de invertebrados marinos. Proteic serine-proteases inhibitor isolated from marine invertebrates. In: Gil Dayrom dRMA, Pascual Isel, García Rossana, Delfín Julieta, Díaz Joaquín, Araujo Mariana S., Tanaka Aparecida S., Pons Tirso y Chávez María A., editor. Revista Cubana de Ciencias Biológicas: Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Farmacología y Biología Molecular, Universidad Federal de São Paulo, Brasil.; 2013. p. 5-13.

Holdgate GA. Making cool drugs hot: Isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *Biotechniques*. 2001;31(1):164-+.

Hoyoux A, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Huston AL, et al. Extreme catalysts from low-temperature environments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2004;98(5):317-30.

Jiang X, Sun C, Guo Y, Nie G, Xu L. Peroxidase-like activity of apoferritin paired gold clusters for glucose detection. *Biosensors & Bioelectronics*. 2015;64:165-70.

Johns GC, Somero GN. Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A(4)-Lactate dehydrogenases of pacific damselfishes (*Chromis* spp.). *Molecular Biology and Evolution*. 2004;21(2):314-20.

Khan AR, James MNG. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science*. 1998;7(4):815-36.

Liang Y. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*. 2008;40(7):565-76.

Logan, Sam R., 2000. Fundamentos de cinética química. 1ra. Ed., Editorial Addison Wesley Iberoamericana, Madrid. 272 p.

Marshall CJ. Cold-adapted enzymes. *Trends in Biotechnology*. 1997;15(9):359-64.

Manrique, Fernando A. 2000. Ecología alimenticia de los pelágicos menores del Golfo de California, México. Revista Transferencia Año 13, Número 50, abril de 2000. (Transferencia Posgrado, Investigación y Extensión en el Campus Monterrey) Recuperado: <http://www.mty.itesm.mx/die/ddre/transferencia/Transferencia50/eli-02.htm>

Neurath H. EVOLUTION OF PROTEOLYTIC-ENZYMES. Science. 1984;224(4647):350-7.

Nevárez Martínez MO. Estructura por edad y crecimiento de la sardina monterrey (*Sardinops sagax caeruleus*) del Golfo de California, México: Temporada de pesca 1990/91. In: Cisneros Mata Miguel A. MLG, Santos Molina J. Pablo, editor. Instituto Nacional de Pesca. Secretaría de Pesca. ed. INP. SEMARNAP. Ciencia pesquera: Centro Regional de Investigación Pesquera de Guaymas, Sonora.; 1991. p. 30-6.

Noriega-Rodríguez JA, Gámez-Meza N, Alanis-Villa A, Medina-Juárez LA, Tejeda-Mansir A, Angulo-Guerrero O, et al. Extraction and fractionation of lipolytic enzyme from viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). International Journal of Food Science & Technology. 2009;44(6):1223-8.

Olivera-Nappa A, Reyes F, Andrews BA, Asenjo JA. Cold Adaptation, Ca²⁺ Dependency and Autolytic Stability Are Related Features in a Highly Active Cold-Adapted Trypsin Resistant to Autoproteolysis Engineered for Biotechnological Applications. Plos One. 2013;8(8).

Ortiz Delgado, I.G. Utilización de los Subproductos de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) para la Obtención de Péptidos con Actividad Antioxidante. Tesis Profesional Químico Biólogo Especialidad en Tecnología de Alimentos. Hermosillo, Sonora, Diciembre de 2009.

Papaleo E, Pasi M, Tiberti M, De Gioia L. Molecular Dynamics of Mesophilic-Like Mutants of a Cold-Adapted Enzyme: Insights into Distal Effects Induced by the Mutations. Plos One. 2011;6(9).

Peña, A. 2004. Bioquímica. 2da. ed. Editorial Limusa, 427 p. (194-200)

Quintero Reyes, I.E. Evaluación de la Eficiencia Catalítica de Tripsina de Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) a Bajas Temperaturas. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Hermosillo, Sonora, Diciembre de 2008

SAGARPA, Anuario 2013, Recuperado:

http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/anuario_2013

Somero G. Lessons from cold-adapted enzymes: Can protein adaptation to temperature be simple and quick? *Integrative and Comparative Biology*. 2013;53:E204-E.

Stefansson B, Helgadóttir L, Ólafsdóttir S, Guðmundsdóttir A, Bjarnason JB. Characterization of cold-adapted Atlantic cod (*Gadus morhua*) trypsin I - Kinetic parameters, autolysis and thermal stability. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 2010;155(2):186-94.

Stroud RM. Mechanisms of zymogen activation. In: Kossiakoff AA, editor. Copyright (f) 1977 by Annual Reviews Inc. All rights reserved: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1977.; 1977. p. 6:177-93.

Todd MJ, Gomez J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity? *Analytical Biochemistry*. 2001;296(2):179-87.

Uriarte-Montoya MH, Villalba-Villalba AG, Pacheco-Aguilar R, Ramirez-Suarez JC, Lugo-Sánchez ME, García-Sánchez G, et al. Changes in quality parameters of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) muscle during the canning process. *Food Chemistry*. 2010;122(3):482-7.

Vandermarliere E, Mueller M, Martens L. GETTING INTIMATE WITH TRYPSIN, THE LEADING PROTEASE IN PROTEOMICS. *Mass Spectrometry Reviews*. 2013;32(6):453-65.

Villalba-Villalba AG, Ramirez-Suarez JC, Valenzuela-Soto EM, Sanchez GG, Ruiz GC, Pacheco-Aguilar R. Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: Its purification and characterization. *Food Chemistry*. 2013;141(2):940-5.

Voet, D., Voet J. G. 2006. *Bioquímica*, 3ra. Ed. Editorial Médica Panamericana, 1756 p. (533-542)

Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. 2009. *Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry*. 2da Ed. Editorial Médica Panamericana, 1260 p. (319-368)

Zhu F, Wang S, Zhou P. Molecular mechanisms of cold-adapted enzymes to cold environment and their application in biotechnology industry. *Weishengwu Xuebao*. 2002;42(5):640-4.