

ESTUDIO CINETICO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LA ENZIMA FICINA

KINETIC STUDIES OF THE ACTIVITY OF THE ENZYME FICIN.

M.G. Bertoluzzo, S. M. R. Bertoluzzo, R. Rigatuso

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional De Rosario – TALLER DE FISICA
Suipacha 531 - (2000) Rosario - Argentina
Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional De Rosario
Santa Fe 3100- (2000) Rosario- Argentina
e-mail: mgbysmb@cablenet.com.ar

La ficina es una enzima proteolítica proveniente del látex de *Ficus carica* (higuera). Su actividad proteolítica se manifiesta al desnaturalizar sus proteínas sustrato mediante la ruptura de los enlaces disulfuro generados por aminoácidos sulfurados (cisteína). Pertenece al grupo de las tiol proteasas y es muy similar a la papaína que se extrae del látex de papaya. Como la extracción de látex de la planta se hace difícil en invierno, se diseñó y construyó a escala de laboratorio, un liofilizador para conservar látex de higuera por largo tiempo y a temperatura ambiente. De esta manera se puede obtener ficina para su uso en el laboratorio a bajo costo y sin modificación de su actividad enzimática. El objetivo de este trabajo es determinar la actividad enzimática de la ficina a partir del látex de higuera liofilizado.

Palabras Claves: liofilizador, ficina, actividad enzimática

Ficin is a proteolytic enzyme obtained from latex of *Ficus carica*. This protein belongs to the group of thiol protease enzymes and is very similar to papain from latex of papaya. As the extraction of latex from fig tree becomes difficult in winter, a lyophilizator was designed and built to operate at laboratory scale in order to conserve the latex for a long time at room temperature. With this procedure, ficine for laboratory use can be obtained at low cost. The objective of this work is to determine the enzymatic activity of ficin from lyophilized fig tree latex.

Key Word: lyophilizator, ficin, enzymatic activity

I. INTRODUCCIÓN

La ficina de látex de diversas especies de *Ficus* (familia moreáceas) al igual que la papaína obtenida del fruto inmaduro de la papaya (familia caricácea) es una enzima proteolítica. Hidroliza péptidos, amidas y ésteres, y ha sido también denominada “pepsina vegetal”. A diferencia de la pepsina, actúa tanto en medio ácido como en medio neutro o alcalino. Se ha utilizado en la digestión de proteínas, para el ablandamiento de carnes y en la fabricación de quesos.

Pertenece al grupo de las tiol proteasas (grupo 3.4.4), ya que en el sitio activo se encuentra un grupo sulfhidrilo (-SH). La actividad de esta enzima depende de la edad de la planta, así como también de la época del año en que se realiza la extracción del mismo. En invierno la extracción de látex es muy limitada.^(1,2) En la figura 1 se muestra una micrografía de micelas de látex de higuera.

Se diseñó y construyó a escala de laboratorio, un liofilizador para conservar látex de higuera por largo tiempo y a temperatura ambiente. De esta manera se puede obtener ficina para su uso en el laboratorio a bajo costo y sin modificación de su actividad enzimática.

La liofilización es un procedimiento de secado cuyo principio es la sublimación del hielo de un producto congelado. Es un proceso utilizado principalmente en la

industria alimentaria para la eliminación de agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas. Es una técnica bastante costosa comparada con los métodos tradicionales de secado, pero origina productos de una mayor calidad. En nuestro caso, el proceso se desarrolla en dos fases, una fase de sublimación propiamente dicha, llamada “deshidratación primaria”, que elimina alrededor del 90% del agua y una fase de desorción o de “desecación secundaria”, que elimina el 10% de agua ligada restante. Como la sublimación sólo puede tener lugar a una temperatura inferior a 0°C y a una presión inferior a 4,00 mmHg, en la primera etapa se trabaja con la muestra congelada y una bomba de vacío (Siemens-Schuckert: 220 V, 25 A). En la segunda etapa se realiza una evaporación al vacío pero a una temperatura entre 20°C y 60°C. A las presiones aplicadas en liofilización, el vapor de agua ocupa volúmenes muy grandes, y como éste no puede ser absorbido por la bomba y es indispensable eliminarlo, se colocó un balón de destilación con una serpentina de cobre montada dentro de su cuello, por la cual circula una solución de NaCl a 0°C.⁽³⁾

En este trabajo analizamos la actividad enzimática de látex de higuera liofilizado.

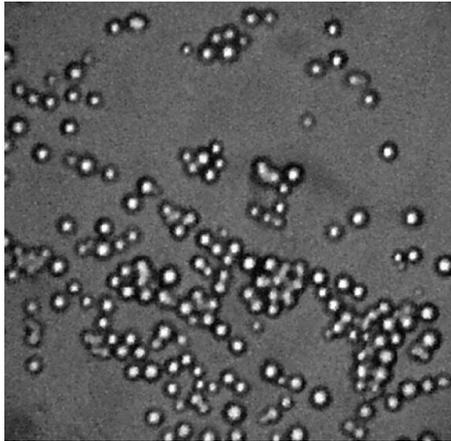


Fig. 1: Micelas de látex de higuera, vistas al microscopio. 40X

La cinética de Michaelis-Menten describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas. Este modelo es válido cuando la concentración de sustrato es mayor que la concentración de enzima, y para condiciones de estado estacionario, o sea que la concentración del complejo enzima-sustrato es constante. Para determinar la velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) de una reacción enzimática, la concentración de sustrato ($[S]$) se aumenta hasta alcanzar una velocidad constante de formación de producto. En este caso, los sitios activos de la enzima están saturados con sustrato. Las enzimas pueden ser caracterizadas por la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Esta concentración de sustrato se conoce como constante de Michaelis-Menten (K_M).

Según el modelo propuesto, las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas:
 1º-Formación del complejo enzima-sustrato (ES)
 2º-Formación del producto (P) y enzima libre (E):
 Reacción irreversible



Siguiendo la aproximación del estado estacionario, la concentración del complejo enzima-sustrato (ES) es pequeña y se mantiene casi constante a lo largo de la reacción enzimática.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

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

Definimos la constante de Michaelis-Menten (K_M) como:

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

Entonces,

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$

La velocidad de reacción es:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

Como la concentración total de enzima ($[E_o]$) es:

$$[E_o] = [E] + [ES]$$

Obtenemos finalmente:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[E_o] \frac{[S]}{K_M + [S]} = V_{\text{máx}} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

II. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se recolectaron muestras de látex de higuera; parte de las muestras se congeló para su posterior liofilización mediante un equipo que básicamente consta de una cámara hermética donde se coloca el producto a liofilizar congelado y se procede a realizar vacío en la misma hasta alcanzar una presión por debajo de la presión de vapor correspondiente al hielo a la temperatura de congelamiento. (Figura 2)

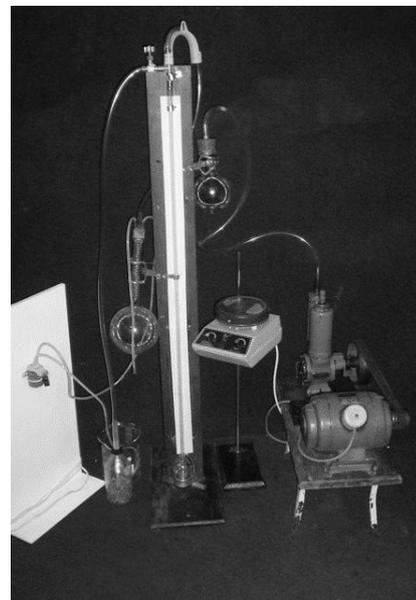
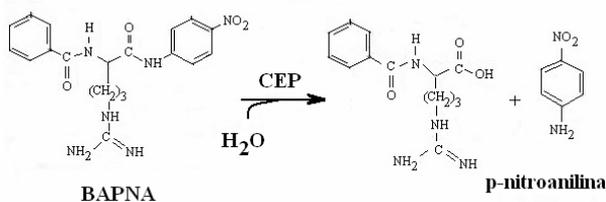


Fig. 2. Equipo de liofilización

Obtenida una dilución de látex recién extraído de las hojas de higuera y muestras de látex liofilizadas se determinó su actividad enzimática utilizando BAPNA (N- α -benzoyl-L-Arginine-4-nitroanilide- hydrochloride) como sustrato. La interacción específica con BAPNA se produce a través del residuo de fenilalanina. La hidrólisis de este enlace peptídico genera entre otros productos de reacción, la p-nitroanilina, de color amarillo, lo que permitió seguir espectrofotométricamente el progreso de la reacción mediante la medida de la velocidad de formación de ese producto. Para ello se midió el aumento de absorbancia de la disolución en función del tiempo, a la longitud de onda de máxima absorción de la p-nitroanilina 400nm, para distintas concentraciones iniciales de BAPNA⁽⁴⁾.



La cuantificación del producto p-nitroanilina se determinó usando el coeficiente de extinción ($\epsilon_{405}=9890 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y los datos se ajustaron con la ecuación de Michaelis-Menten. La concentración de enzima E_0 se determinó midiendo la absorbancia de la muestra a 280 nm y aplicando la relación⁽¹⁾:

$$\frac{\text{mg Proteína}}{\text{ml}} = A_{280\text{nm}} \times 0.47$$

III-RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la figura 3 se muestra la absorbancia en función del tiempo para distintas concentraciones de BAPNA. Las pendientes de las rectas representan las velocidades iniciales V_0 . (Tabla I)

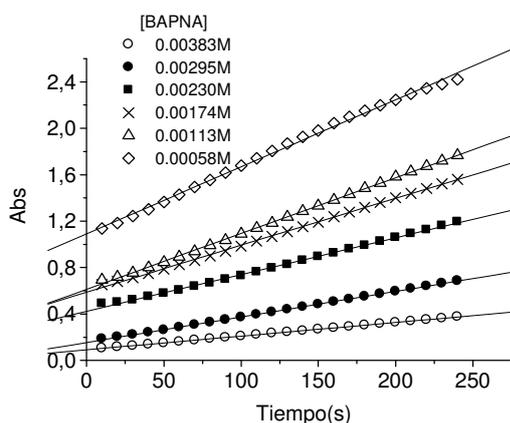


Fig. 3- Absorbancia en función del tiempo para los primeros 4 minutos de iniciada la reacción.

La dependencia de V_0 con la concentración de BAPNA sigue la cinética propuesta por Michaelis-Menten, la gráfica de V_0 en función de la concentración de BAPNA es una hipérbola. A partir de estos datos construimos un gráfico de Lineweaver-Burk y calculamos las constantes cinéticas, K_M y $V_{\text{máx}}$. (Figura 4).

[BAPNA] M	V_0 Ab/s
0,0006	0,00118
0,0011	0,00220
0,0017	0,00316
0,0023	0,00405
0,0029	0,00481
0,0038	0,00578

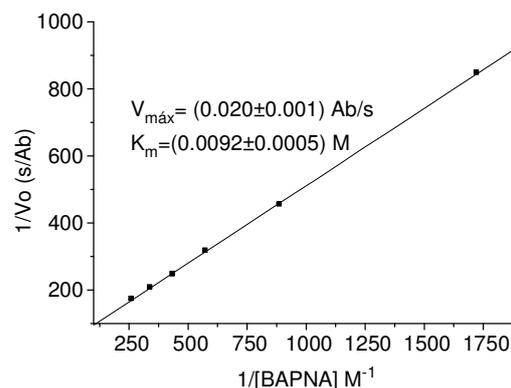


Fig. 4. Gráfico de Lineweaver-Burk.

La velocidad máxima obtenida para las muestras liofilizadas fue de $(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-6} \text{ M/s}$, para una concentración de enzima de $1.7 \times 10^{-5} \text{ M}$, obteniéndose una constante catalítica de 0.119 s^{-1} , similar a la obtenida para las muestras de látex fresco.

Las muestras liofilizadas mantienen intacta la actividad enzimática, mientras que las muestras sin liofilizar guardadas en el freezer durante 5 meses mostraron desnaturalización de la proteína y pérdida de la actividad enzimática.

Referencias

- 1-Liener, I.E., and Friedenson, B., Ficin. Meth. Enzymol., 19, 261-273 (1970).
- 2-Caygill, J.C. Sulphydryl plant proteases. Enzyme and Microb. Technology, v. 1, p.233-42 (1979).
- 3-Mayer, L.; Bertoluzzo, S.M.; Bertoluzzo, M.G. Conservación de alimentos. Diseño y construcción de un liofilizador. Invenio 9(17), p. 147-157. (2006)
- 4-Cornely K., et al, Kinetics of papain. J. of Chemical Education, vol. 76, 5, p. 644-645 (1999).