

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Elizabeth Lira Silva y Ricardo Jasso Chávez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología.

Correo: eli_lira_sil@hotmail.com

Cinética enzimática

Cinética enzimática. Efecto del pH

Las enzimas microbianas han reemplazado a los catalizadores químicos utilizados en la industria química, farmacéutica, alimenticia y textil debido a que su proceso de producción es más amigable con el ambiente comparado con los procesos utilizados con anterioridad. En la actualidad dichas enzimas tienen un gran potencial a nivel industrial, un ejemplo de ello son las proteasas alcalinas que se utilizan preferencialmente como aditivos en la formulación de detergentes sobre compuestos sintéticos, debido a su capacidad para degradar manchas proteínicas como sangre, chocolate y leche (1). Dos tercios de las proteasas producidas a nivel industrial son de origen microbiano, entre los que destacan principalmente el género *Bacillus sp.*. Las proteasas utilizadas deben tener un alto nivel de actividad y estabilidad en un amplio intervalo de pH y temperatura, por lo que es importante implementar estrategias para su obtención con la finalidad de incrementar su rendimiento. En este sentido, se implementó el uso de lodos residuales para la producción de proteasas alcalinas a partir de *Bacillus licheniformis*, para lo cual se llevó a cabo la recuperación y purificación de la proteasa a partir del filtrado del cultivo fermentado. La eficacia de la enzima se ha examinado en presencia de detergentes comerciales estándar y se determinó que su máxima actividad fue a 60 °C, manteniendo el 97 % de su actividad durante 180 min de incubación y que la presencia de Ca²⁺ y Mn²⁺ incrementaron la actividad (2).

La actividad de la enzima se determinó por el método modificado de Kunitz (2), midiendo a 275 nm la producción de tirosina liberada a partir

de la hidrólisis de caseína. Se incubó 1 mL de la enzima diluida con 5 mL de caseína (1.2 % p/v) por 10 min a 37° C a diferentes valores de pH. El intervalo de pH se realizó utilizando diferentes amortiguadores; acetato (pH 5), fosfato (pH 6-7), borato (pH 8-9), bicarbonato (pH 10), Robinson y Stokes ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaOH}$) (pH 11-12). La reacción se detuvo por la adición e incubación de la mezcla con 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (w/v) para desnaturalizar y precipitar la proteína no hidrolizada. Una unidad internacional de actividad (IU) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol (181.2 μg) de tirosina/min a partir de caseína a pH 8.2 y 37° C. La tabla 1 muestra la actividad de la proteasa alcalina de *B. licheniformis* a diferentes valores de pH.

Con los valores obtenidos determinar:

1. la V_{max} , K_m y la eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) a cada valor de pH del ensayo.
2. los valores de pK_a e identificar los residuos de los aminoácidos involucrados en la unión y en la catálisis.

Referencias

1. Renganathan Jayakumar , Shanmugam Jayashree, Balumuri Annapurna, Sundaram Seshadri (2012) Appl Biochem Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-012-9902-6.
2. Jyothi Bezawada, S Yan, Rojan P John, RD Tyagi, RY Surampalli (2011) Biotechnology Research International doi:10.4061/2011/238549.
3. Segel IH (1975) Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York. p.957