

UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA



CASA ABIERTA AL TIEMPO

LA IRREVERSIBILIDAD DEL DESDOBLAMIENTO
TERMICO DE LA BROMELAINA

T E S I S
QUE PRESENTA :
JOSE ALFONSO ARROYO REYNA
PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

MEXICO, D. F.

ABRIL 1995

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

División de Ciencias Básicas e Ingeniería

LA IRREVERSIBILIDAD DEL DESDOBLAMIENTO TERMICO DE
LA BROMELAINA

Tesis que presenta

José Alfonso Arroyo Reyna

Para la obtención del grado de Doctor en Ciencias

México, D.F., 25 de Abril de 1995

Este trabajo se realizó en el Área de Biofísicoquímica del Depto. de Química bajo la dirección del Dr. Andrés Hernández Arana. Agradecemos el financiamiento del CONACYT (Proyecto No. 0609-N9110).

Agradezco al SNI el apoyo económico que me brindó como Candidato a Investigador Nacional (No. Exp. 8999).

A la Patria, con la más profunda humildad y lealtad, dedico esta tesis.

"This hypothesis states that the three-dimensional structure of a native protein in its normal physiological milieu is the one in which the Gibbs free energy of the whole system is lowest; that is, that the native conformation is determined by the totality of interatomic interactions and hence by the amino acid sequence, in a given environment"

Christian Anfinsen

"Danzamos alrededor de un anillo y suponemos, pero el secreto reposa en el centro y sabe"

Robert Frost

INDICE

1 INTRODUCCION	1
2 ESTRUCTURA PRIMARIA DE BROMELAINA DE TALLO	9
3 METODOS EXPERIMENTALES Y MATERIALES	12
3.1 Materiales	12
3.2 Purificación de las proteinasas del extracto crudo de la bromelaína de tallo	12
3.3 Inhibición de la autólisis	13
3.4 Cromatografía de intercambio iónico	13
3.5 Actividad proteolítica	14
3.6 Electroforesis en gel	14
3.7 Dicroísmo circular	14
3.8 Calorimetría diferencial de barrido	16
4 ANALISIS DE DATOS	17
4.1 Modelo irreversible de dos estados	17
4.1.1 Calorimetría diferencial de barrido	17
4.1.2 Dicroísmo circular	24
4.2 Ecuación de Eyring	26
4.3 El modelo cinético Lumry-Eyring y su solución analítica a partir del método de la ecuación secular	27
5 RESULTADOS Y DISCUSION	30
5.1 Purificación de las proteinasas	30
5.2 Masa molar	34
5.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida nativa y Enfoque isoelectrico	34

5.4 Análisis de espectros de dicroísmo circular	34
5.5 Desnaturalización térmica	39
5.5.1 Efecto de la velocidad de calentamiento en la transición	41
5.5.2 Mediciones cinéticas a temperatura constante	50
5.5.3 Calorimetría diferencial de barrido	57
5.6 El mecanismo Lumry-Eyring	61
6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	68
REFERENCIAS	70

1

INTRODUCCION

Los ácidos nucleicos son los auténticos portadores de la vida, las proteínas no son menos importantes para los seres vivos, pues cumplen funciones muy importantes: catálisis, estructura, movimiento, reconocimiento y regulación. En 1976 el grupo de investigación dirigido por el Dr. James D. Watson logra por primera vez introducir un gene humano en una bacteria, con lo que se inicia la era de la biotecnología moderna. Después de este importante acontecimiento la genética molecular y la biofísica se unieron para crear un nuevo campo: la ingeniería de proteínas, que permite diseñar proteínas con aplicaciones médicas e industriales. Entre la gran variedad de sustancias que ya se fabrican industrialmente usando como sintetizador a la bacteria *Escherichia coli* se cuentan la insulina humana, la somatotropina, los factores de coagulación sanguínea y el interferón.

La ingeniería genética permite manipular los ácidos nucleicos, y en principio, es posible construir la secuencia primaria de las diferentes proteínas (entre 10^5 y 10^6) que intervienen en la organización y funcionamiento del cuerpo humano. La ingeniería genética ha proporcionado información para el estudio de los receptores, que es un grupo de proteínas que ocupan un lugar clave en el sistema de información del cuerpo. La importancia de estas proteínas es obvia, ya que la mayoría de

los medicamentos bloquean o activan receptores o enzimas; en los albores del siglo XXI empieza a desarrollarse la medicina molecular.

El mecanismo que origina la estructura primaria de una proteína es bien conocido, pero aún no está aclarado el proceso por medio del cual las proteínas se pliegan para adquirir su conformación nativa en la célula. La cristalografía de rayos-X ha proporcionado información valiosa de la estructura tridimensional de las proteínas, la espectroscopía de dicroísmo circular permite predecir la estructura secundaria de algunas proteínas y se han logrado algunos avances en el estudio conformacional de proteínas pequeñas por resonancia magnética nuclear (hasta 150 residuos de aminoácidos). Todos estos logros nos dan una idea clara de la conformación del estado nativo, la siguiente meta es saber como se obtiene esa estructura activa y estable.

La estabilización de la estructura de una proteína en disolución acuosa es el resultado del balance entre la entropía conformacional que tiende a desdoblarse la proteína, y otros factores que tienden a estabilizar el plegamiento como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y fuerzas electrostáticas. Las interacciones que determinan la formación de estructuras estables únicamente pueden caracterizarse en un ambiente químico bien definido. Por esta razón, los aspectos energéticos y cinéticos del plegamiento se han deducido fundamentalmente de experimentos *in vitro*. En 1958 Crick propuso que el plegamiento es sólo función de la estructura primaria. Esta hipótesis fue ampliada con el trabajo de Anfinsen [1], quien demostró que la ribonucleasa pancreática de bovino puede ser desnaturalizada y

posteriormente plegada *in vitro*, en ausencia de cofactores relacionados con la maquinaria que sintetiza proteínas.

En los últimos años el plegamiento de proteínas se ha convertido en un tema muy importante en fisiología celular, inmunología y biotecnología. El plegamiento *in vivo* de proteínas juega un papel muy importante en procesos celulares como el transporte de polipéptidos a través de membranas, la adaptación celular a condiciones extremas, el ensamble de virus y enzimas oligoméricas y la destrucción de polipéptidos no funcionales por proteasas. El plegamiento está relacionado con la inmunosupresión y ciertos procesos que se dan en enfermedades. Es de gran interés para la biotecnología el estudio de la estabilidad de las proteínas, ya que para controlar la síntesis y el plegamiento de una proteína es imprescindible saber como se adquiere esa estabilidad; varias proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* y otras bacterias no se pliegan para dar la estructura nativa, dando como resultado la formación de agregados de proteínas en las células que son conocidos como cuerpos de inclusión, que generalmente son proteínas desnaturalizadas [2].

Para numerosos procesos celulares es ahora aparente la acción de cierta clase de proteínas auxiliares cuya función es dirigir el plegamiento correcto de otros polipéptidos. Se ha sugerido el nombre de chaperonas moleculares para esta familia de proteínas. Una chaperona molecular es una proteína caracterizada por la unión transitoria con proteínas nacientes, desestabilizadas o translocadas. Esta unión previene los fenómenos indeseables y promueve el plegamiento correcto y el ensamble de complejos de proteínas en formas biológicamente activas [3].

El problema de la estabilidad proteica esta íntimamente relacionado con la pérdida de la estructura nativa, es decir, con su desnaturalización, ya que sólo podemos juzgar la estabilidad al destruir la estructura nativa. Es evidente que el proceso de plegamiento de una proteína ocurre espontáneamente con un descenso en la energía libre; desde el punto de vista de la termodinámica los procesos de plegamiento son reversibles o irreversibles, y más aún, pueden ocurrir por medio de un mecanismo complejo que involucre etapas reversibles e irreversibles. Se ha discutido si el proceso de plegamiento de una proteína está controlado por la termodinámica o la cinética, es decir, si la estructura nativa es la estructura de menor energía libre o bien corresponde a un mínimo local. El estudio de la desnaturalización de proteínas globulares pequeñas ha demostrado que estos procesos son reversibles y ocurren de acuerdo a un modelo simple que únicamente involucra dos estados; es de esperarse que para proteínas que involucran varios dominios la situación sea más compleja.

El cambio de energía libre que acompaña la transición entre el estado desdoblado y el plegado es generalmente pequeño, típicamente entre 20 y 45 kJ/mol en condiciones fisiológicas. Las etapas iniciales del plegamiento no se han definido claramente. Aparentemente, el plegamiento empieza con la formación de ciertos elementos de estructura secundaria, esta primera estructura tiene generalmente una intensidad de un 50 a un 100% del espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de la proteína nativa (en algunos casos más del 100%). Luego, esta estructura inicial da lugar a un intermediario compacto con una estructura

tridimensional similar a la nativa. Finalmente, se adquiere la estructura tridimensional detallada [4].

Las enzimas proteolíticas -o proteasas- catalizan la hidrólisis de proteínas, dentro de esta clase se encuentran las proteasas sulfhidrúlicas -o cisteínicas-, que se caracterizan porque sus propiedades catalíticas dependen de un residuo de cisteína, que posee el grupo SH. Las proteasas sulfhidrúlicas se encuentran en animales, plantas y bacterias, donde desarrollan una gran variedad de funciones, siendo las de origen vegetal las más conocidas. La secuencia de aminoácidos y sus propiedades catalíticas sugieren una amplia similitud entre ellas. En algunas enzimas de esta clase se presenta la multiplicidad molecular, es decir, hay varias formas moleculares que exhiben una gran homología en estructura primaria y masas molares similares, por lo que se acostumbra nombrar al conjunto con un mismo nombre genérico.

Del látex de papaya (*Carica papaya*) se obtiene una familia muy importante de proteasas sulfhidrúlicas globulares, de las cuales el prototipo es la papaína; otras proteasas de esta fuente son la quimopapaína y la proteinasa Ω , que exhiben varias formas moleculares. Varios miembros de esta familia se han aislado de otras plantas y en algunos casos se conoce la secuencia de aminoácidos completa. El alto grado de homología observado al comparar las secuencias de la papaína [5], actinidina [6], proteinasa Ω [7,8], quimopapaína [9,10] y bromelaína de tallo [11], es una clara indicación de que las cadenas polipeptídicas de estas proteínas comparten un patrón de plegamiento común. Esto se ha confirmado para las primeras tres proteinasas mencionadas anteriormente, por medio de estudios de difracción de rayos-X [12-14]. Además, la

papaína y la proteinasa Ω , exhiben espectros de dicroísmo circular muy similares en el ultravioleta lejano, sugiriendo que la conformación de estas proteínas en solución es casi idéntica [15]. Sin embargo, el espectro de la quimopapaína es diferente al de los espectros de las otras proteinasas de la papaya, surgiendo así la interrogante de cuáles propiedades moleculares son las causantes de las discrepancias espectroscópicas observadas. Los estudios de las estructuras primaria y secundaria de un mayor número de proteasas cisteínicas permitirá delinear los rasgos comunes y las diferencias de una manera más amplia. Con el propósito de saber si otras proteasas cisteínicas mostraban el espectro de dicroísmo circular típico de la papaína, decidimos estudiar dos de las formas más abundantes de bromelaína de tallo.

Un gran número de especies del género *Bromelia* (*Bromeliaceae*) contienen enzimas proteolíticas, la más conocida es la piña (*Ananas comosus*). Heinicke y Gortner [16] descubrieron que las preparaciones de bromelaína de tallo son heterogéneas; la bromelaína de tallo es una mezcla de proteasas que difieren una de otra en su acción sobre diferentes sustratos, su susceptibilidad a agentes oxidantes y reductores, y en especial, al valor de pH óptimo al cual hidrolizan sustratos. Posteriormente, Murachi & Neurath [17] demostraron que la preparación cruda puede fraccionarse en varios componentes por cromatografía de intercambio iónico; después de estos trabajos aparecieron otros que corroboraban que la preparación cruda puede fraccionarse en varios componentes proteolíticamente activos [18-20], Ota y colaboradores [21] demostraron que hay seis formas moleculares de bromelaína de tallo y dos

de bromelaína de fruto. Rowan y colaboradores [22] concluyeron que la planta de piña contiene cuando menos cuatro tipos distintos de proteasas, tres de ellas presentes en el tallo: bromelaína de tallo (con varias formas moleculares), ananaína y comosaína; mientras que en el fruto la proteasa predominante es la bromelaína de fruto.

La calorimetría diferencial de barrido (CDB) se ha usado ampliamente para estudiar las características del proceso de desnaturalización en las proteínas. El análisis de los datos calorimétricos en términos del formalismo del equilibrio requiere, evidentemente que el proceso sea reversible [23-24]. Muchas proteínas no cumplen este requisito y sus curvas calorimétricas son cinéticamente controladas por un paso irreversible presente en el mecanismo de desnaturalización [25]. En esos casos, el análisis de la desnaturalización debe incluir el estudio detallado de la dependencia de las trazas calorimétricas con la velocidad de barrido [25]. Para algunas proteínas obtenidas de sus fuentes naturales en rendimientos relativamente bajos, esta clase de estudios es prácticamente imposible de efectuar. En este trabajo, empleamos un método espectroscópico para seguir el desdoblamiento térmico de una proteína, que consiste en medir continuamente su elipticidad mientras que la muestra se calienta a una velocidad constante determinada. Con este procedimiento, la cantidad de muestra necesaria es mucho menor que la requerida en los experimentos de calorimetría.

Se ha reportado que el desdoblamiento térmico de papaína y quimopapaína es completamente irreversible, cuando se juzga por la ausencia de una endoterma en muestras que han sido previamente sujetas a un ciclo de calentamiento y enfriamiento [26]. Sin embargo, no se sabe si estas

enzimas siguen un mecanismo irreversible simple de dos estados. En base a estos hechos, resulta muy interesante estudiar el proceso de desnaturalización de bromelaína para establecer comparaciones con los otros miembros de su familia.

2

ESTRUCTURA PRIMARIA DE BROMELAINA DE TALLO

Se considera que la bromelaína de tallo es una glicoproteína que consiste de una cadena polipeptídica sencilla y una cadena lateral simple de carbohidratos unida a la proteína en el residuo 117. Los resultados de Ritonja y colaboradores [11] demuestran que la bromelaína contiene 211 o 212 residuos, con un M_r de 22,828 Da (figura 1). El oligosacárido está compuesto de manosa, fucosa, xilosa y N-acetilglucosamina [27-29], su estructura (figura 2) indica que éste tiene un M_r de 1000, por lo que el M_r total de la proteína es de aproximadamente 23,800.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la bromelaína con las secuencias de otras proteasas sulfhidrúlicas demuestra sin duda que la enzima es un miembro de la superfamilia de la papaína [11]. Los porcentajes de homología con respecto a papaína, actinidina y proteinasa Ω son de 38, 42 y 43 % respectivamente. Si se sigue el esquema de numeración de la papaína [5], y de acuerdo al alineamiento mencionado [11], los puentes disulfuro se establecen entre los residuos 22-63, 56-95 y 153-200.

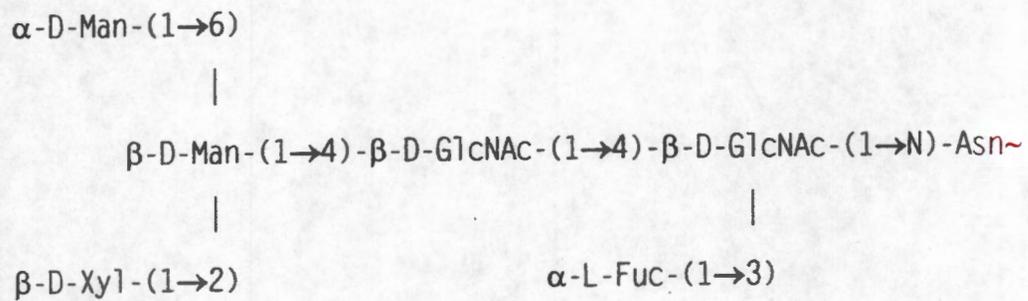


Figura 2. Estructura de la cadena de carbohidratos de la bromelaína.

El oligosacárido se encuentra unido a la cadena polipeptídica en el residuo Asn 117, y consta de dos unidades de manosa, dos de acetilglucosamina, una de fucosa y una de xilosa.

3

METODOS EXPERIMENTALES Y MATERIALES

3.1 Materiales

La bromelaína de tallo (extractos crudo y cromatográficamente purificado) y la yodoacetamida se obtuvieron de la Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.), el 2-mercaptoetanol se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los reactivos fueron de grado analítico.

3.2 Purificación de las proteinasas del extracto crudo de bromelaína de tallo

Una muestra de 0.45 g de extracto crudo se disolvió en 10 ml de amortiguador de fosfatos (0.047 M KH_2PO_4 /0.003 M $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, pH 6.0; 5mM HgCl_2). La disolución fue centrifugada 25 minutos a 5 °C y 4000 X g (r_{av} , 9.75 cm). El sobrenadante se filtró con una membrana Millipore de 0.42 μm y a continuación se inyectó a una columna de exclusión TSK HW-50F (Merck, Darmstadt, Alemania) de 2.6 X 52 cm (Límites de M_r de 500 a 200.000), equilibrada con regulador de fosfatos 0.05 M. La muestra se eluyó a un flujo de 0.8 ml/min, colectándose fracciones de 9 ml. Las fracciones con la actividad proteolítica más alta se combinaron y se recromatografiaron en las mismas condiciones.

3.3 Inhibición de la autólisis

Algunas muestras se inactivaron por medio de reducción y carboximetilación irreversible, con el fin de evitar el proceso de autohidrólisis. La reducción se llevó a cabo usando una concentración 0.01 M de 2-mercaptoetanol durante 30 minutos, y a continuación se agregó yodoacetamida sólida para tener una concentración 0.12 M; después de agitar durante 60 minutos, las disoluciones se dializaron contra agua destilada. El objetivo de esta operación fué convertir el grupo activo sulfhidrilo en el grupo $RSCH_2CONH_2$.

3.4 Cromatografía de intercambio iónico

Como se mencionó anteriormente, en este estudio se usaron extractos crudo y cromatográficamente purificado de bromelaína de tallo para la separación de formas múltiples. El extracto crudo se purificó primeramente por filtración en gel y a continuación por cromatografía de intercambio iónico.

Se inyectaron disoluciones conteniendo de 0.7 a 3.5 mg de bromelaína en amortiguador 0.05 M de fosfatos (pH 6.0) a una columna de intercambio catiónico TSK-SP5PW (0.75 X 7.5 cm) montada en un cromatógrafo Varian 5020B. cabe mencionar que esto se efectuó en inyecciones sucesivas, debido a la baja solubilidad relativa de la enzima a este pH (aproximadamente 1 mg/ml). Sólo algunas muestras fueron carboximetiladas con el fin de estimar la actividad proteolítica. Las fracciones proteicas se eluyeron con un gradiente lineal de 0.15 a 0.20 M de $NaCl$ (pendiente de 0.0025 M/ml) usando el regulador de fosfatos para crear el gradiente a un flujo de 0.5 ml/min.

3.5 Actividad proteolítica

La actividad se probó a pH 6.0 y a 35 °C usando caseína como sustrato, el método ha sido descrito anteriormente por Solís Mendiola *et al.* [30]. Una unidad es la cantidad de enzima que causa un incremento de 1 (A_{280}) en un minuto a 35 °C.

3.6 Electroforesis en gel

Los experimentos de electroforesis se efectuaron en un equipo Phast System (Pharmacia LKB). La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida se efectuó de la manera descrita por Tablero *et al.* [31]; las posiciones de las bandas se determinaron por medio de un densitómetro laser LKB 2202 ultrosan. En la electroforesis en gel de poliactilamida nativa se usaron placas homogéneas (12.5 % w/v, pH 6.5) de dimensiones 0.45 X 43 X 50 mm, se aplicó una potencia constante de 2 W por 40 minutos a 15 °C. Para el enfoque isoeléctrico se usaron placas con un gradiente de pH en el rango de 3 a 9 (0.35 X 43 X 50 mm), aplicando una potencia constante de 3.5 W por 40 minutos a 15 °C. La fijación, teñido y desteñido se efectuó de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor (LKB).

3.7 Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectropolarímetro JASCO J-500A, calibrado con ácido (+)-10-canforsulfónico [32]. Las medidas en la región del ultravioleta lejano (185-250 nm) se efectuaron en una celda de 0.05 cm de trayectoria óptica en soluciones de concentración aproximada a 0.2 mg/ml. En la región aromática (250-320 nm) se usaron celdas de 1.0 cm de recorrido

óptico y concentraciones de proteína en el rango 0.3 a 0.8 mg/ml. Antes de registrar los espectros, las muestras se dializaron 72 horas a 4 °C contra un amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.0 (0.006 M KH_2PO_4 /0.004 M $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente empleando el coeficiente de absorción ($A_{1\text{cm}, 280\text{nm}}^{1\%}$) de 20.1 [33]. La elipticidad por residuo medio, $[\theta]_{\text{m.r.w.}}$, se calculó usando el valor de 108 para la masa molar del residuo promedio [11].

En lo que respecta a los experimentos de desnaturalización, se usó un baño de agua marca Haake NK-22 para mantener a temperatura constante el contenedor de la celda, y la temperatura en el interior de ésta se midió con un teletermómetro. En la región del ultravioleta lejano empleamos una celda de 0.1 cm, y concentraciones cercanas a 0.19 mg/ml, mientras que en la región aromática, se usó la celda mencionada en el párrafo anterior y concentraciones cercanas a 0.3 mg/ml. Todos los experimentos se efectuaron en un amortiguador de glicina-HCl 0.02 M, pH 3.4.

La desnaturalización de bromelaína se siguió midiendo el cambio de elipticidad, a una longitud de onda fija, como una función de la temperatura. La temperatura se varió usando velocidades de calentamiento constantes en el rango 0.1-1.5 °C/min con una desviación estándar de ± 0.03 °C/min.

Los estudios cinéticos de desnaturalización a temperatura constante se efectuaron también a pH 3.4. En estos experimentos se colocaban 1.7 ml de amortiguador de glicina en la celda del espectropolarímetro (0.1 cm de trayectoria) y se permitía que se alcanzase el equilibrio térmico a la temperatura deseada. Luego, se añadían 0.4 ml de disolución nativa de bromelaína (0.88 mg/ml, 25 °C) empleando una jeringa de cromatografía

para facilitar el proceso de mezclado por convección en la celda cilíndrica. El mezclado de las disoluciones tomó aproximadamente de 4 a 5 minutos, después de este intervalo, el equilibrio térmico también se había obtenido y entonces se iniciaba con el registro de los datos espectroscópicos a 220 nm. Con este método, fuimos capaces de estudiar la cinética de desnaturalización hasta 50 °C. Arriba de este valor, la reacción era demasiado rápida y casi todo el cambio de elipticidad ocurría dentro del tiempo muerto de mezclado.

3.8 Calorimetría diferencial de barrido

Los experimentos de calorimetría se efectuaron en un calorímetro diferencial de barrido Microcal MC-2. Se usaron disoluciones de bromelaína en regulador de glicina-HCl 0.02 M, pH 3.4 (0.8-1.0 mg/ml). Las muestras fueron desgasificadas al vacío y con agitación durante 20 minutos, posteriormente se registraba la concentración y el pH de la muestra. Los barridos se realizaron a 1 °C/min a una presión total de 2.0 Kg/cm². Se obtuvo una línea base amortiguador-amortiguador en las mismas condiciones y se restaron a las endotermas de la muestra. El análisis de datos fue hecho con el paquete "Origin" (Microcal).

4

ANALISIS DE DATOS

4.1 Modelo irreversible de dos estados

Los datos de elipticidad obtenidos del estudio de la desnaturalización térmica de bromelaína fueron analizados asumiendo que se trata de un proceso irreversible de dos estados:



donde N y D representan, respectivamente, la estructura nativa y desnaturalizada de la enzima; k es la constante de primer orden que obedece la ecuación de Arrhenius, $k=A \exp(-E/RT)$, donde E es la energía de activación y A el factor pre-exponencial. Sánchez Ruiz y colaboradores [34] han propuesto varios métodos para el análisis de las curvas calorimétricas basadas en el mecanismo anterior. Dos de estos métodos se adaptan fácilmente a nuestros estudios de dicroísmo circular. A continuación describo el modelo matemático desarrollado por los autores mencionados y su adaptación a las mediciones de elipticidad en función de la temperatura.

4.1.1 Calorimetría diferencial de barrido

Este modelo simple considera que no hay cambio neto de capacidad calorífica, esto es, $\Delta C_p = C_p(D) - C_p(N) = 0$. Esta condición es equivalente a decir que ΔH es constante en el intervalo de la transición.

A una temperatura dada T, ha fluído una cantidad de calor Q desde el inicio de la transición, mientras que el calor total que fluye a la

muestra durante la transición completa es Q_t , esto puede expresarse de acuerdo a las siguientes relaciones:

$$Q = [D]\Delta HV, \quad Q_t = c\Delta HV \quad (4.1.1)$$

donde $[D]$ es la concentración molar del estado desnaturalizado a la temperatura T , c es la concentración molar total de la proteína en la celda de muestra, V es el volumen de la celda, y ΔH es el cambio de entalpía del proceso.

Para un proceso cinético de primer orden

$$\frac{d[N]}{dt} = -k[N]$$

y si la velocidad de barrido es $v = \frac{dT}{dt}$,

$$k = \frac{-v}{[N]} \frac{d[N]}{dT} \quad (4.1.2)$$

donde $[N]$ es la concentración del estado nativo a la temperatura T . Este valor también puede expresarse -aplicando un balance de materia- como

$$[N] = c - [D] = \frac{(Q_t - Q)}{\Delta HV} \quad (4.1.3)$$

y derivando la ecuación anterior con respecto a la temperatura:

$$\frac{d[N]}{dT} = \frac{-1}{\Delta HV} \frac{dQ}{dT} = \frac{-C_p}{\Delta HV} \quad (4.1.4)$$

sustituyendo en la ecuación (4.1.2)

$$k = \frac{v C_p}{(Q_t - Q)} \quad (4.1.5)$$

La ec. (4.1.5) permite calcular la constante de velocidad a una temperatura T , a la cual se mide un C_p en exceso y ha fluído una cantidad

de calor Q desde el inicio de la transición. De aquí que midiendo k a diferentes temperaturas puede construirse un gráfico de Arrhenius ($\ln k$ vs. $1/T$) para las diferentes velocidades de barrido utilizadas.

Combinando la ec.(4.1.2) y la ecuación de Arrhenius, tenemos

$$\frac{d \ln[N]}{dT} = \frac{-k}{v} = \frac{-A}{v} \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) \quad (4.1.6)$$

derivando la expresión anterior con respecto a la temperatura

$$\frac{d^2 \ln[N]}{dT^2} = \frac{-A}{v} \left(\frac{E}{RT^2}\right) \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) = \left(\frac{E}{RT^2}\right) \frac{d \ln[N]}{dT} \quad (4.1.7)$$

por otro lado,

$$\frac{d^2 \ln[N]}{dT^2} = \frac{1}{[N]} \frac{d^2[N]}{dT^2} - \frac{1}{[N]^2} \left(\frac{d[N]}{dT}\right)^2 \quad (4.1.8)$$

rearrreglando la ec.(4.1.4)

$$C_p = -\Delta H v \frac{d[N]}{dT} \quad (4.1.9)$$

y derivando la expresión anterior con respecto a la temperatura, además de aplicar la condición del máximo a T_m , resulta que

$$\left(\frac{dC_p}{dT}\right)_{T_m} = -v \Delta H \left(\frac{d^2[N]}{dT^2}\right)_{T_m} = 0, \text{ lo cual implica que } \left(\frac{d^2[N]}{dT^2}\right)_{T_m} = 0. \text{ Si igualamos}$$

las ecs.(4.1.7) y (4.1.8), consideramos $T=T_m$, y aplicamos la conclusión anterior, obtenemos

$$\left(\frac{E}{RT_m^2}\right) \left(\frac{1}{[N]}\right) \left(\frac{d[N]}{dT}\right)_{T_m} = \frac{-1}{[N]^2} \left(\frac{d[N]}{dT}\right)_{T_m}^2 \quad (4.1.10)$$

que puede arreglarse de la siguiente manera

$$\frac{E}{RT_m^2} = \frac{-1}{[N]} \left(\frac{d[N]}{dT} \right)_{T_m} = - \left(\frac{d \ln[N]}{dT} \right)_{T_m} \quad (4.1.11)$$

Sustituyendo la ec.(4.1.6) en la anterior

$$\frac{E}{RT_m^2} = \frac{A}{v} \exp\left(\frac{-E}{RT_m}\right), \text{ y reorganizando}$$

$$\frac{v}{T_m^2} = \frac{AR}{E} \exp\left(\frac{-E}{RT_m}\right) \quad (4.1.12)$$

Por lo tanto, un gráfico de $\ln(v/T_m^2)$ versus $1/T_m$ es una línea recta con pendiente $(-E/R)$. Esta recta tiene tantos puntos como velocidades de barrido se hayan elegido, y a cada velocidad de barrido corresponde una T_m particular.

La obtención, a partir de la ec.(4.1.6), de una ecuación explícita que relaciona la concentración del estado nativo como una función de la temperatura requiere de la evaluación de la llamada integral de Arrhenius, que puede efectuarse numéricamente, o a través de una aproximación. Podemos relacionar la temperatura T por medio de la relación $T=T_m + \Delta T$: si aplicamos a la función $f(T)= 1/T$ una expansión de Taylor en la vecindad de $1/T_m$, y consideramos sólo los dos primeros términos de la serie (ya que en los límites de la transición calorimétrica $\Delta T \ll T_m$) obtenemos:

$$\frac{1}{T} = \frac{1}{T_m} + \left(\frac{d(1/T)}{dT} \right)_{T_m} (T - T_m) = \frac{1}{T_m} - \frac{\Delta T}{T_m^2} \quad (4.1.13)$$

sustituyendo la ec. anterior en (4.1.6)

$$\frac{d \ln[N]}{dT} = \frac{-A}{v} \exp\left(\frac{-E}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{\Delta T}{T_m^2} \right)\right), \text{ que puede expresarse como}$$

$$\frac{d \ln[N]}{dT} = \frac{-A}{v} \left(\exp\left(\frac{-E}{RT_m}\right) \right) \exp\left(\frac{E \Delta T}{RT_m^2}\right)$$

introduciendo la ec.(4.1.12) en la anterior

$$\frac{d \ln[N]}{dT} = \frac{-E}{RT_m^2} \exp(E \Delta T / RT_m^2) = -W \exp(W \Delta T) \quad (4.1.14)$$

donde $W = E/RT_m^2$, por otro lado, $\Delta T = (T - T_m)$ y $\Delta T_0 = (T_0 - T_m)$; despejando $d \ln[N]$ e integrando de T_0 a T

$$\int_{\ln[N]_0}^{\ln[N]} d \ln[N] = \int_{T_0}^T -W \exp(W(T - T_m)) dT$$

$$\ln \frac{[N]}{[N]_0} = -W \left(\frac{1}{W} \exp(W(T - T_m)) \right) \Big|_{T_0}^T$$

$$\ln \frac{[N]}{[N]_0} = \exp(W \Delta T_0) - \exp(W \Delta T) \quad (4.1.15)$$

ahora bien, como $T_m > T_0$, esto implica que $\Delta T_0 < 0$ y en consecuencia $\exp(W \Delta T) \gg \exp(W \Delta T_0)$ por lo que la ec. (4.1.15) se reduce a

$$\ln \frac{[N]}{[N]_0} \approx -\exp(W \Delta T) \text{ que puede verse como}$$

$$\ln [N]_0 / [N] = \exp(W \Delta T) = \exp\left(\frac{E}{RT_m^2} (T - T_m)\right) = \exp\left(\frac{E}{R} \frac{(T - T_m)}{T_m^2}\right) \quad (4.1.16)$$

Ahora, de las ecs.(4.1.1) y (4.1.3)

$$\frac{[N]_0}{[N]} = \frac{Q_t}{Q_t - Q} \quad (4.1.17)$$

y sustituyendo en la ec.(4.1.16)

$$\ln \frac{Q_t}{Q_t - Q} = \exp\left(\frac{E}{R} \frac{(T - T_m)}{T_m^2}\right)$$

si consideramos la ec.(4.1.13) en la forma $\Delta T/T_m^2 = 1/T_m - 1/T$, tenemos

$$\ln \frac{Q_t}{Q_t - Q} = \exp\left(\frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right)$$

aplicando la función ln a ambos lados de la expresión anterior

$$\ln\left(\ln \frac{Q_t}{Q_t - Q}\right) = \frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right) \quad (4.1.18)$$

Esto quiere decir que para cada velocidad de barrido se obtiene una endoterma con un valor constante de Q_t , y para cada una de ellas se obtienen valores de Q y T con los cuales se obtienen rectas con pendiente igual a $(-E/R)$.

En particular, cuando $T=T_m$

$$\ln\left(\ln \frac{Q_t}{Q_t - Q_m}\right) = 0 \Rightarrow \ln \frac{Q_t}{Q_t - Q_m} = 1 \text{ y por lo tanto}$$

$$\frac{Q_t}{Q_t - Q_m} = e \quad (4.1.19)$$

escribiendo la ec.(4.1.6) para $T=T_m$ y sustituyendo la ec.(4.1.12)

$$\frac{-k}{v} = \left(\frac{d \ln[N]}{dT}\right)_{T_m} = \frac{-A}{v} \exp\left(\frac{-E}{RT_m}\right) = \frac{-A}{v} \frac{v}{T_m^2 AR} = \frac{-E}{RT_m^2}$$

e introduciendo la ec.(4.1.5) para $T=T_m$, $k/v = C_p^m / (Q_t - Q_m)$

$$\frac{C_p^m}{Q_t - Q_m} = \frac{E}{RT_m^2} \quad (4.1.20)$$

Si sustituimos la ec.(4.1.19) en la anterior

$$E = \frac{RT_m^2 C_p^m}{Q_t - Q_m} = \frac{eRT_m^2 C_p^m}{Q_t} \quad (4.1.21)$$

Esta ecuación nos dice que podemos calcular también la energía de activación E de las coordenadas del máximo de cada traza calorimétrica obtenida, es decir de T_m y C_p^m .

Para obtener la función de capacidad calorífica en exceso teórica para este modelo, partimos de la ec.(4.1.18). Si aplicamos dos veces la función exponencial a ambos lados de esta ecuación obtenemos

$$\frac{Q_t}{Q_t - Q} = \exp\left(\exp\left(\frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right)\right) \quad (4.1.22)$$

Si despejamos Q de la ec. anterior

$$Q = \frac{\Delta H_{cal} \left\{ \exp\left(\exp\left(\frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right)\right) - 1 \right\}}{\exp\left(\exp\left(\frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right)\right)} \quad (4.1.23)$$

Donde $\Delta H_{cal} = Q_t$. Puesto que $C_p = dQ/dT$, la derivada de la ec. (4.1.23) con respecto a la temperatura nos da la función de capacidad calorífica en exceso

$$C_p^{ex} = \frac{\Delta H_{cal} E}{RT^2} \left[\exp\left(-\exp\left(\frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right)\right) \right] \exp\left(\frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right) \quad (4.1.24)$$

4.1.2 Dicroísmo circular

La fracción de proteína nativa, f_N , se calcula por medio de la relación:

$$f_N = \frac{\Theta_T - \Theta_D}{\Theta_N - \Theta_D} = \frac{[N]}{c} \quad (4.1.25)$$

en donde θ_T es la elipticidad de la muestra a una temperatura particular; θ_D y θ_N son los valores característicos del estado desnaturalizado y nativo, $[N]$ es la concentración del estado nativo a la temperatura T y c es la concentración total de proteína.

La ec. (4.1.2) es

$$k = \frac{-v \, d[N]}{[N] \, dT}$$

derivando (4.1.25) con respecto a la temperatura

$$\frac{df_N}{dT} = \frac{1}{(\Theta_N - \Theta_D)} \left(\frac{d\Theta}{dT} \right)_T = \frac{1}{c} \frac{d[N]}{dT} \quad (4.1.26)$$

donde $(d\theta/dT)_T$ es la derivada de la elipticidad a la temperatura T , esta ecuación puede arreglarse como

$$\frac{d[N]}{dT} = \frac{c}{(\Theta_N - \Theta_D)} \left(\frac{d\Theta}{dT} \right)_T \quad (4.1.27)$$

sustituyendo esta expresión en la ec. (4.1.2) obtenemos

$$k = \frac{-v}{(\Theta_T - \Theta_D)} \left(\frac{d\Theta}{dT} \right)_T \quad (4.1.28)$$

que es una expresión análoga a la ec. (4.1.5) y permite calcular la constante de velocidad a una temperatura T si se conoce el valor de la elipticidad y su derivada a esa temperatura. Sin embargo, en un experimento de dicroísmo circular no puede medirse directamente el valor

de la derivada, a diferencia de un calorímetro donde se mide directamente el valor $C_p=(dQ/dT)_T$. La ec. (4.1.12) puede usarse sin ninguna modificación para estimar los parámetros A y E, a partir de la variación de la T_m con la velocidad de calentamiento, v :

$$\frac{v}{T_m^2} = \frac{AR}{E} \exp\left(\frac{-E}{RT_m^2}\right)$$

Si analizamos la ec. (4.1.16), considerando que $[N]_0 = c$, y que $c/[N] = 1/f_N$ (ver ec. (4.1.25)), tenemos

$$\ln \frac{1}{f_N} = \exp\left(\frac{E(T-T_m)}{RT_m^2}\right) \quad (4.1.29)$$

y si seguimos un procedimiento análogo al de la sección 4.1.1 llegamos finalmente a

$$\ln\left(\ln \frac{1}{f_N}\right) = \frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right) \quad (4.1.30)$$

donde f_N a cada T se calcula de acuerdo a la ec. (4.1.25). Ahora resulta interesante saber cual es el valor de f_N cuando $T=T_m$. Si hacemos esto en la ec. (4.1.29) obtenemos

$$\ln \frac{1}{f_N} = \exp(0) = 1, \quad \ln f_N = -1, \text{ y por lo tanto}$$

$$f_N = \frac{1}{\exp(1)} = 0.37,$$

$$f_D = 1 - f_N = 0.63 \quad (4.1.31)$$

4.2 Ecuación de Eyring

En la formulación termodinámica de la teoría del complejo activado (también denominada teoría del estado de transición) para reacciones unimoleculares en disolución controladas químicamente se define la entropía de activación estándar como [35]

$$\Delta S^* = R \ln \left(\frac{A}{k_B T e/h} \right) \quad (4.2.1)$$

donde R es la constante de los gases, A es el factor pre-exponencial de Arrhenius y k_B y h son las constantes de Boltzmann y Planck respectivamente. Esta ecuación también puede escribirse como

$$\Delta S^*/R = \ln(A/T) + \ln(h/k_B e) \quad (4.2.2)$$

Si dividimos la ecuación de Arrhenius entre T y sacamos el logaritmo natural a ambos lados de la ecuación obtenemos

$$\ln(k/T) = \ln(A/T) - (E/R)(1/T) \quad (4.2.3)$$

y combinando esta última expresión con la ec. (4.2.2)

$$\ln(k/T) = \Delta S^*/R - \ln(h/k_B e) - (E/R)(1/T)$$

$$\ln(k/T) = \Delta S^*/R + \ln((k_B/h)e) - (E/R)(1/T)$$

$$\ln(k/T) = \Delta S^*/R + \ln(k_B/h) + 1 - (E/R)(1/T) \quad (4.2.4)$$

La teoría del complejo activado establece la relación entre la energía de activación y la entalpía estándar de activación de la siguiente forma:

$$E = \Delta H^* + RT \quad (4.2.5)$$

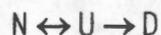
La combinación las ecuaciones (4.2.4) y (4.2.5) da como resultado la ecuación de Eyring:

$$\ln(k/T) = \Delta S^*/R + \ln(k_B/h) - (\Delta H^*/R)(1/T) \quad (4.2.6)$$

Un gráfico de $\ln(k/T)$ versus $1/T$ permite calcular la entalpía estándar de activación de la pendiente de la recta.

4.3 El modelo cinético Lumry-Eyring y su solución analítica a partir del método de la ecuación secular.

Se piensa que la desnaturalización irreversible de proteínas consiste de un desdoblamiento reversible y una segunda etapa irreversible que se representa de acuerdo al modelo propuesto por Lumry y Eyring [36]:



Si k_1 representa la constante de velocidad para la reacción $N \rightarrow U$, k_2 la constante para $U \rightarrow N$ y k_3 la constante para $U \rightarrow D$, todas de primer orden, se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{-d[N]}{dt} = k_1[N] - k_2[U] \quad (4.3.1)$$

$$\frac{-d[U]}{dt} = (k_2 + k_3)[U] - k_1[N] \quad (4.3.2)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_3[U] \quad (4.3.3)$$

$$\frac{d[N]}{dt} + \frac{d[U]}{dt} + \frac{d[D]}{dt} = 0 \quad (4.3.4)$$

El balance de materia esta dado por las relaciones:

$$[N] + [U] + [D] = [N]_0 \quad (4.3.5)$$

$$f_N + f_U + f_D = 1 \quad (4.3.5)$$

Donde f_N , f_U y f_D son las fracciones de las especies respectivas.

Ahora asumimos una solución particular para las ecs.(4.3.1)-(4.3.3) de la forma

$$[A]_i = B_i \exp(-\lambda t)$$

donde $[A]_i$ son las concentraciones de las especies N, U y D, B_i son constantes y λ es un parámetro por determinarse. La condición para una solución no trivial del sistema, como se menciona en el trabajo de Frost es que [37]:

$$\begin{vmatrix} k_1 - \lambda & -k_2 & 0 \\ -k_1 & k_2 + k_3 - \lambda & 0 \\ 0 & -k_3 & -\lambda \end{vmatrix} = 0$$

resolviendo el determinante secular obtenemos los tres valores de λ

$$\lambda_1 = 0$$

$$\lambda_2 = \frac{p+q}{2}$$

$$\lambda_3 = \frac{p-q}{2}$$

$$p = k_1 + k_2 + k_3$$

$$q = \sqrt{k_1^2 + k_2^2 + k_3^2 + 2k_1k_2 - 2k_1k_3 + 2k_2k_3}$$

$$\lambda_2 + \lambda_3 = p, \lambda_2 - \lambda_3 = q$$

la solución analítica del mecanismo Lumry-Eyring es entonces

$$f_N = \frac{k_1}{\lambda_2 - \lambda_3} \left\{ (\exp(-\lambda_2 t) - \exp(-\lambda_3 t)) + \frac{1}{k_1} (\lambda_2 \exp(-\lambda_3 t) - \lambda_3 \exp(-\lambda_2 t)) \right\} \quad (4.3.6)$$

$$f_U = \frac{k_1}{\lambda_2 - \lambda_3} \{ \exp(-\lambda_3 t) - \exp(-\lambda_2 t) \} \quad (4.3.7)$$

$$f_D = 1 + \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_3} \{ \lambda_3 \exp(-\lambda_2 t) - \lambda_2 \exp(-\lambda_3 t) \} \quad (4.3.8)$$

En este punto resulta interesante saber si la ec.(4.3.7) tiene un máximo; al tiempo para lo cual se cumple lo anterior lo llamaremos tiempo de inducción, t_e .

De la ec.(4.3.2) encontramos que

$$\frac{d[U]}{dt} = (k_2 + k_3)[U]_e - k_1[N]_e = 0$$

$$[U]_e = \frac{k_1[N]_e}{k_2 + k_3}$$

bajo la condición anterior la ec.(4.3.4) se convierte en

$$\frac{d[D]}{dt} = -\frac{d[N]}{dt}$$

si derivamos la ec.(4.3.3) con respecto al tiempo e imponemos la condición del máximo

$$\frac{d^2[D]}{dt^2} = 0$$

Finalmente, derivando la ec.(4.3.7) con respecto al tiempo e igualando a cero

$$\frac{df_U}{dt} = \frac{k_1}{\lambda_2 - \lambda_3} \{-\lambda_3 \exp(-\lambda_3 t_e) + \lambda_2 \exp(-\lambda_2 t_e)\} = 0$$

$$\therefore t_e = \frac{1}{\lambda_3 - \lambda_2} \ln\left(\frac{\lambda_3}{\lambda_2}\right) = \frac{-1}{q} \ln\left(\frac{\lambda_3}{\lambda_2}\right) \quad (4.3.9)$$

5

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Purificación de las proteinasas

El cromatograma de elución para la filtración en gel del extracto crudo de bromelaína se muestra en la figura 3. Las fracciones marcadas con las barras (las que presentan actividad) se unieron y se recromatografiaron en las mismas condiciones, obteniéndose un solo pico simétrico (no se muestran los resultados). Se inyectaron 3.5 mg de este material en una columna TSK-SP5PW, y como se aprecia en la figura 4, se detectaron aparentemente tres fracciones con actividad proteolítica, las que fueron resueltas pobremente. Por otro lado, cuando se inyectaron muestras previamente inactivadas de la enzima a la misma columna, aumentó notablemente la resolución (figura 5). Es probable que el cambio en la resolución se deba a que las muestras activas sufren autólisis.

Se colectaron las dos fracciones que se indican en la figura 5 y se recromatografiaron en las mismas condiciones; en cada caso se observó un pico razonablemente simétrico que aparecía aproximadamente al mismo volumen de elución indicado en la figura 5. Estos componentes se designaron como bromelaína de tallo I (SB1) y bromelaína de tallo II (SB2) en ese orden de elución. Estas muestras purificadas se usaron en estudios subsecuentes. En acuerdo con estos resultados, el diagrama de elución de bromelaína de tallo cromatográficamente purificada (de la compañía Sigma) es básicamente el mismo de la figura 5.

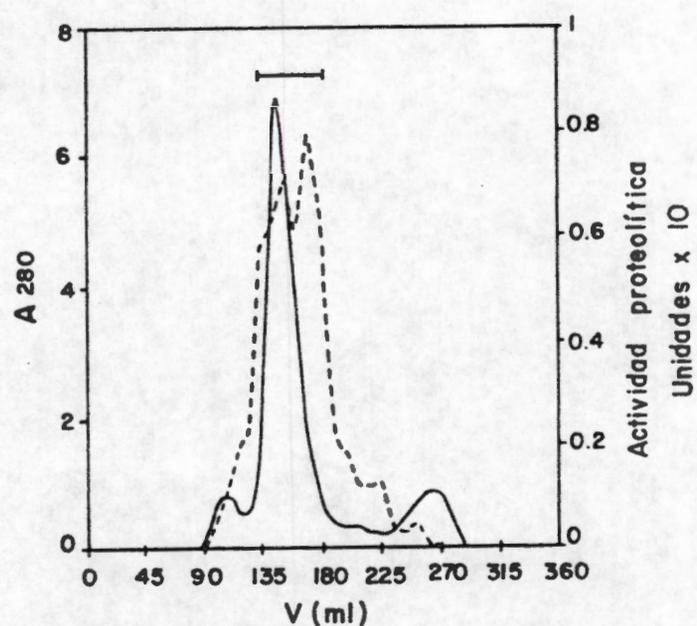


Figura 3. Cromatografía de filtración en gel de extracto crudo de bromelaína de tallo en una columna TSK HW-50 (Fino) a pH 6.0.

Se inyectó a la columna aproximadamente 0.45 g de extracto crudo y se eluyó con amortiguador de fosfatos 0.05 M (pH 6.0). Las fracciones marcadas por las barras (las que presentan una mayor actividad) se colectaron y recromatografiaron en las mismas condiciones. A_{280} (—), Actividad proteolítica(---).

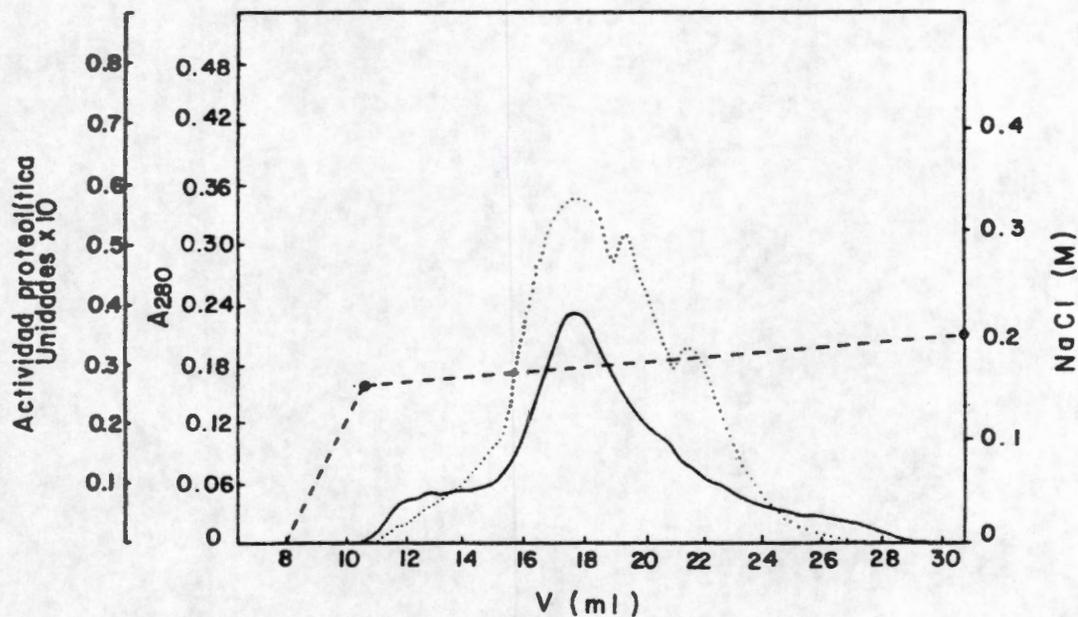


Figura 4. Cromatografía de intercambio catiónico de bromelaina de tallo en una columna TSK-SP5PW, a pH 6.0.

Se inyectó aproximadamente 3.5 mg de material activo obtenido por filtración en gel (marcado por las barras en la figura 3) y se eluyó con un gradiente lineal de 0.15-0.20 M de NaCl (---). A₂₈₀(—), Actividad proteolítica(···).

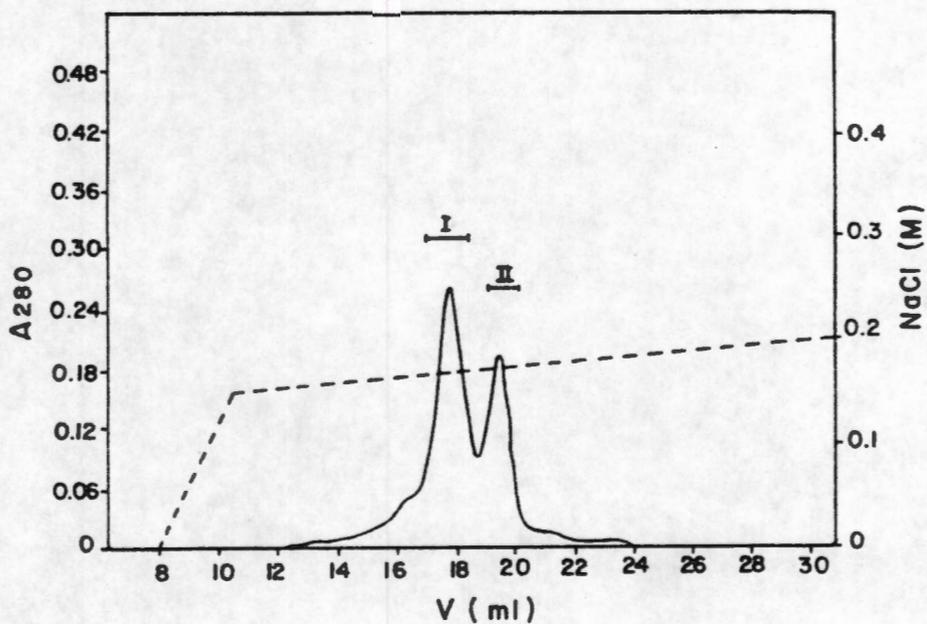


Figura 5. Cromatografía de intercambio catiónico de bromelaína de tallo inhibida, a pH 6.0.

El material obtenido por filtración en gel (marcado por las barras en la figura 3) se trató con yodoacetamida (para detalles ver el texto) y se inyectó a una columna TSK-SP5PW. Las fracciones se eluyeron con un gradiente lineal de 0.15-0.20 M NaCl (---). A₂₈₀(—).

5.2 Masa molar

La masa molar relativa calculada con respecto a la movilidad electroforética de los patrones de masa molar en el mismo gel (no se muestran los resultados) fue de 25,400 para SB1 y SB2. Dentro de los límites del error experimental, este valor está de acuerdo con el valor calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima (23,828)[11].

5.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida nativa y enfoque isoeléctrico

Los componentes SB1 y SB2 resultaron ser homogéneos en una placa nativa de electroforesis en gel de poliacrilamida (no se muestran los resultados), en donde mostraron diferentes movilidades. La forma SB2 exhibió un carácter más básico, ya que migró ligeramente más rápido hacia el cátodo que la forma SB1; este hecho concuerda con la conducta cromatográfica que se muestra en la figura 5. Los resultados del enfoque isoeléctrico (no se muestran los resultados) indican que los puntos isoeléctricos de las formas de bromelaína de tallo son mayores de 9, ya que las proteínas se enfocaron en posiciones muy cercanas al cátodo.

5.4 Análisis de espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) correspondientes a las dos formas de bromelaína de tallo se muestran en la figura 6. Las curvas son casi idénticas en la totalidad del intervalo espectral estudiado, lo cual indica que las diferencias estructurales entre SB1 y SB2 son mínimas.

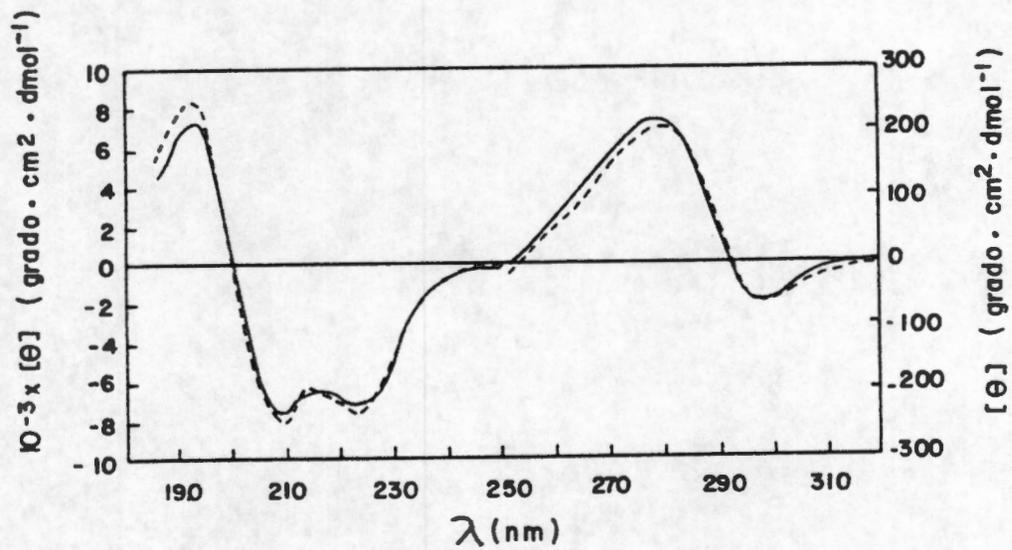


Figura 6. Espectro de dicroísmo circular de las bromelaínas de tallo. Los espectros se registraron en un amortiguador de fosfatos 0.01 M (pH 7.0) a 25 °C. — , SB1; - - - - , SB2.

En la región de absorción de residuos aromáticos (250-320 nm), las curvas de DC de las bromelaínas son muy similares al espectro reportado anteriormente por Sakai y colaboradores [38]. Por otro lado, en la región del ultravioleta lejano, estos autores han observado bandas considerablemente menores que las mostradas en la figura 6; ellos encontraron una banda negativa a 214 nm que está desplazada a 209 nm en el espectro reportado en este trabajo. No puede hacerse una comparación de la banda positiva, ya que los datos previos de DC se limitaron a longitudes de onda por arriba de 210 nm.

En general, las características espectrales mostradas por SB1 y SB2 son típicas de las proteínas $\alpha + \beta$; en esta familia, la señal de DC a 208 nm es más intensa que la señal a 222 nm [39], como se observa en los casos de papaína y proteinasa Ω [15]. Por lo tanto, es probable que las formas de bromelaína tengan el mismo patrón de plegamiento mostrado por otros miembros de la familia de la papaína, es decir, una estructura con dos dominios, con un dominio predominantemente de α -hélice y otro compuesto de hoja- β antiparalela [12]. En concordancia con esta propuesta, la estimación del contenido estructural en SB1 y SB2 dió resultados que en general son similares al contenido de otras proteinasas cisteínicas (tabla I), aunque son de alguna importancia las diferencias en contenido de hélice, ya que este tipo de estructura regular es la que se predice con mayor precisión [40].

A pesar de las similitudes mencionadas, las curvas de DC de las bromelaínas no muestran evidencia del hombro negativo a 200 nm que aparece claramente en los espectros de papaína y proteinasa Ω [15]. Puede pensarse que la causa de esta discrepancia radique en los dos residuos de

N-acetilglucosamina presentes en la porción de carbohidrato unida a la cadena polipeptídica de bromelaína [27-29]. En verdad, es bien sabido que los mono u oligosacáridos que contienen el cromóforo 2-acetamido muestran bandas intensas de DC a longitudes de onda menores a 220 nm [41]. Sin embargo, al considerar la elipticidad molar de estas bandas (-4000 a -24000 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) y la relación 100:1 de residuos de aminoácidos a N-acetilglucosamina, es de esperarse que la contribución al espectro de DC de las bromelaínas no exceda el 3% de la señal a 209 nm (figura 6). Esta cantidad parece ser demasiado pequeña para modificar seriamente el espectro de la proteína.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es aparente que hasta ahora el espectro de DC en el ultravioleta-lejano de bromelaína representa una tercera clase espectral dentro de la familia de las proteinasas sulfhidrúlicas. Los otros dos tipos, es decir, los espectros de papaína y quimopapaína, se han reportado antes [30,42]. No se sabe que factores estructurales son responsables de esta variación espectral, aunque se pueden citar algunas posibilidades: pequeñas diferencias en partes de la estructura secundaria o en su distribución para dar lugar a estructuras supersecundarias, interacciones dominio-dominio, microambientes diferentes de ciertos grupos aromáticos o de enlaces disulfuro.

Tabla I

Contenido de estructura secundaria en las proteinasas de la superfamilia de la papaína

Las fracciones de los diferentes tipos estructurales de las formas de bromelaína de tallo se calcularon a partir de los espectros de DC (185-250 nm) mostrados en la figura 6, de acuerdo al método de Compton y Johnson [40]. También se incluyen los valores de las proteinasas del látex de papaya [15]. Los valores mostrados son promedios \pm desviación estándar.

Estructura secundaria	SB1	SB2	Papaína	Proteinasa Ω	Quimopapaína
α -Hélice	0.23 \pm 0.007	0.23 \pm 0.007	0.27 \pm 0.006	0.27 \pm 0.006	0.31 \pm 0.006
Hoja β antiparalela	0.18 \pm 0.010	0.19 \pm 0.011	0.12 \pm 0.015	0.14 \pm 0.015	0.07 \pm 0.014
Hoja β paralela	0.05 \pm 0.008	0.05 \pm 0.008	0.05 \pm 0.012	0.02 \pm 0.012	0.09 \pm 0.013
Giros	0.18 \pm 0.004	0.18 \pm 0.004	0.15 \pm 0.012	0.17 \pm 0.012	0.13 \pm 0.012
Otros	0.35 \pm 0.027	0.34 \pm 0.030	0.53 \pm 0.028	0.50 \pm 0.029	0.48 \pm 0.027
Total	1.00	1.00	1.12	1.10	1.00

5.5 Desnaturalización térmica

Los espectros de bromelaína nativa (SB1) y desnaturalizada térmicamente a pH 3.4 se muestran en la figura 7. En la región del ultravioleta-lejano (185 a 250 nm), los cambios observados después del calentamiento son atribuibles a la pérdida de estructura secundaria [43]. Más aún, la forma del espectro de DC de bromelaína a 60 °C es similar al de otras proteínas desdobladas térmicamente [43-45]. Las diferencias en elipticidad dentro de la región del ultravioleta-cercano (250 a 310 nm) reflejan modificaciones en el ambiente asimétrico de los residuos aromáticos. La transición térmica de bromelaína, seguida por la elipticidad a 220 y 280 nm -usando una velocidad de calentamiento de 1 °C/min- se muestra en el recuadro de la figura 7. Como puede verse, ambas curvas son prácticamente idénticas, sugiriendo que no hay intermediarios presentes en cantidades apreciables durante el proceso. Además, se encontró que la desnaturalización de bromelaína es completamente irreversible, ya que las muestras que fueron calentadas a temperaturas particulares dentro de la zona de transición, no dieron lugar a un regreso de la señal de DC cuando se enfriaron rápidamente a 25 °C.

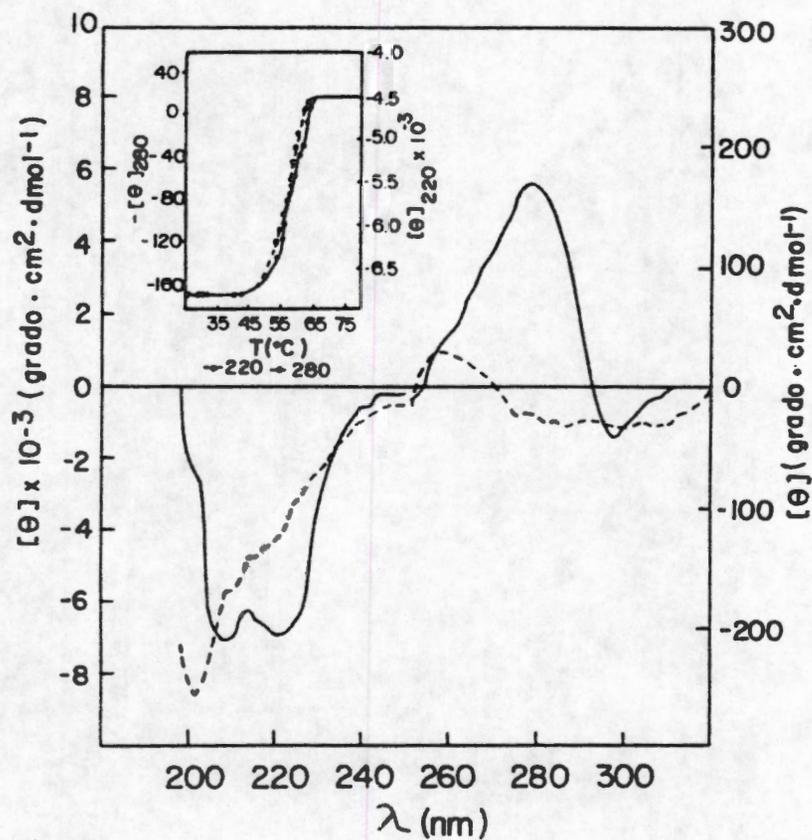


Figura 7. Espectros de DC de las formas nativa (SB1) y desnaturalizada de bromelaina.

Los espectros se obtuvieron en un regulador de glicina 0.02 M (pH 3.4) a 25 °C (—) y 60 °C (-----). El recuadro muestra los cambios de elipticidad a 220 (—) y 280 nm (-----) en función de la temperatura, imponiendo una velocidad de calentamiento de 1 °C/min.

5.5.1 Efecto de la velocidad de calentamiento en la transición

La desnaturalización de bromelaína a pH 3.4 se siguió registrando continuamente su señal de DC a 220 nm, empleando varias velocidades de calentamiento seleccionadas. Los valores de elipticidad se transformaron a continuación a fracciones de proteína desnaturalizada, f_D ($f_D = 1 - f_N$) de acuerdo con la ecuación (4.1.25). Los resultados obtenidos (figura 8) indican que la aparición de la transición está fuertemente influenciada por la velocidad de calentamiento, como es de esperarse para un proceso bajo control cinético. Por lo tanto, las curvas de la figura 8 se analizaron en términos de un modelo irreversible de dos estados. Las gráficas de $\ln(\ln 1/f_N)$ vs. $1/T$ (ecuaciones (4.1.25) y (4.1.30)) dieron buenas relaciones lineales (figuras 9 a 13) con coeficientes de correlación de 0.99. En la tabla II pueden apreciarse los resultados de la regresión lineal. Se obtuvo una energía de activación promedio de 211 ± 13 kJ/mol de estos datos. Por otro lado, los valores de T_m de las curvas de transición se usaron, junto con las velocidades de calentamiento para construir una gráfica de $\ln(v/T_m^2)$ vs. $1/T_m$, de acuerdo a la ec.(4.1.12). La línea recta que resultó, la cual es ilustrada en la figura 14, tuvo un coeficiente de correlación de 0.98, y de su pendiente se calculó una energía de activación de 164 ± 17 kJ/mol. El factor pre-exponencial fue de $1.31 \times 10^{25} \text{ min}^{-1}$.

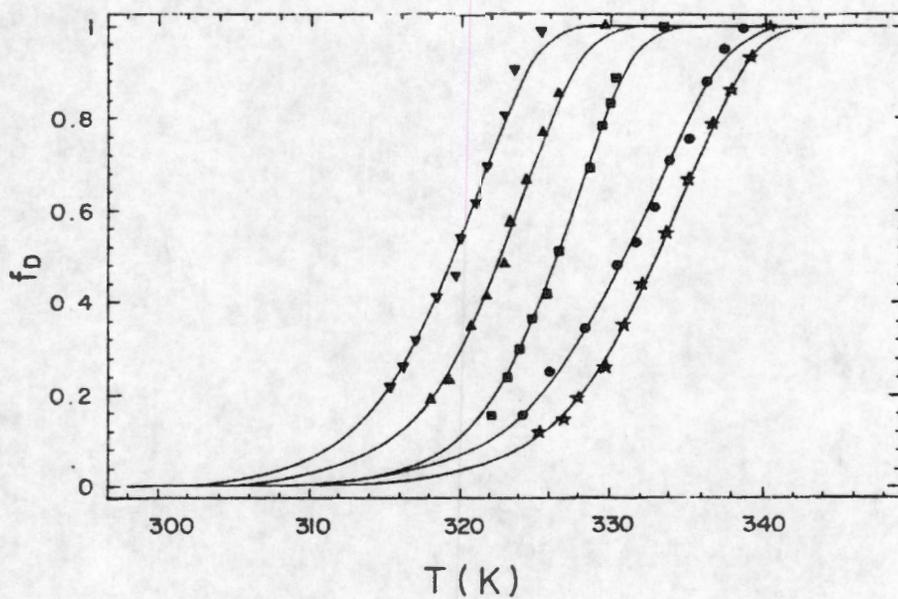


Figura 8. Curvas de transición térmica de la bromelaína a pH 3.4.

Las curvas de desnaturalización térmica de bromelaína se obtuvieron a diferentes velocidades de calentamiento; (★) 1.5 °C/min, (●) 1 °C/min, (■) 0.5 °C/min, (▲) 0.3 °C/min, (▼) 0.1 °C/min. La fracción de proteína desnaturalizada (f_D) se calculó como se indica en el texto.

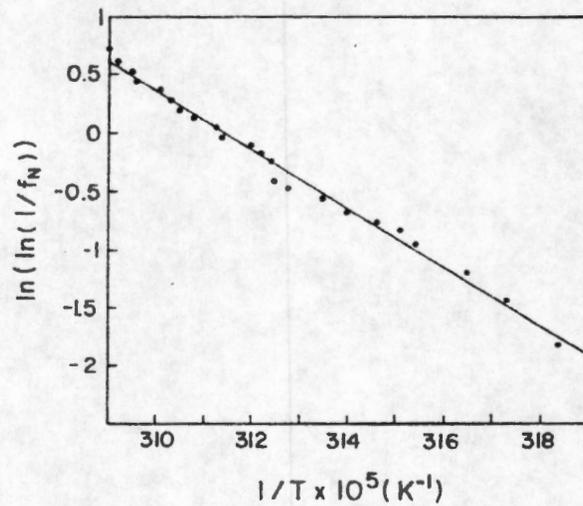


Figura 9. Gráfica de $\ln(\ln 1/f_N)$ vs. $1/T$ para la desnaturalización de la bromelaína a pH 3.4, a una velocidad de calentamiento de $0.1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

De la pendiente de la recta se obtiene una energía de activación de $209 \pm 5 \text{ kJ/mol}$, de la ordenada al origen se obtiene $T_m = 321 \text{ K}$.

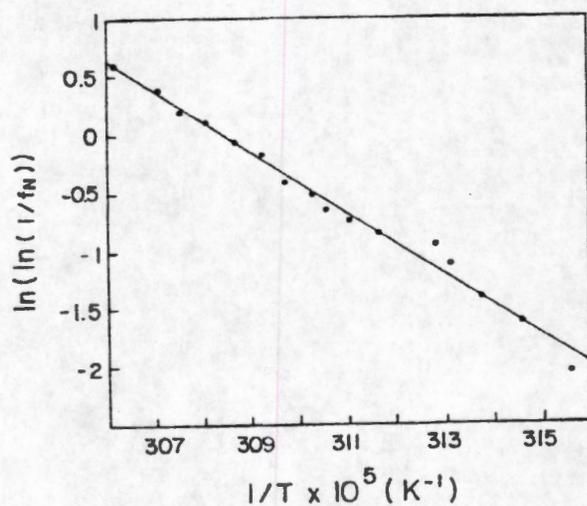


Figura 10. Gráfica de $\ln(\ln 1/f_N)$ vs. $1/T$ para la desnaturalización de la bromelaina a pH 3.4, a una velocidad de calentamiento de $0.3 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

De la pendiente de la recta se obtiene una energía de activación de $217 \pm 6 \text{ kJ/mol}$, de la ordenada al origen se obtiene $T_m = 324 \text{ K}$.

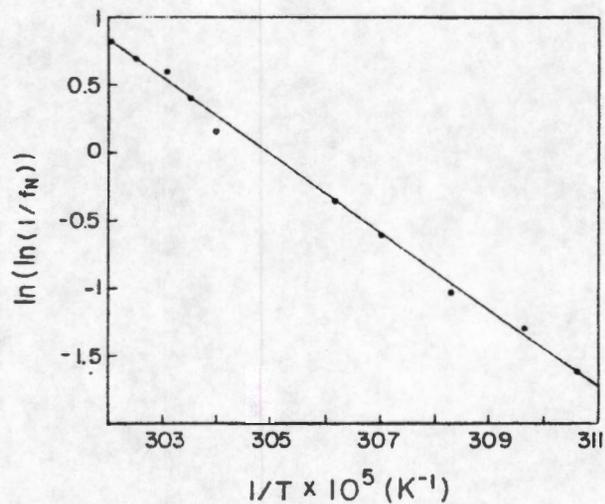


Figura 11. Gráfica de $\ln(\ln 1/f_N)$ vs. $1/T$ para la desnaturalización de la bromelaína a pH 3.4, a una velocidad de calentamiento de $0.5 \text{ }^\circ\text{C/min}$.

De la pendiente de la recta se obtiene una energía de activación de $239 \pm 6 \text{ kJ/mol}$, de la ordenada al origen se obtiene $T_m = 328 \text{ K}$.

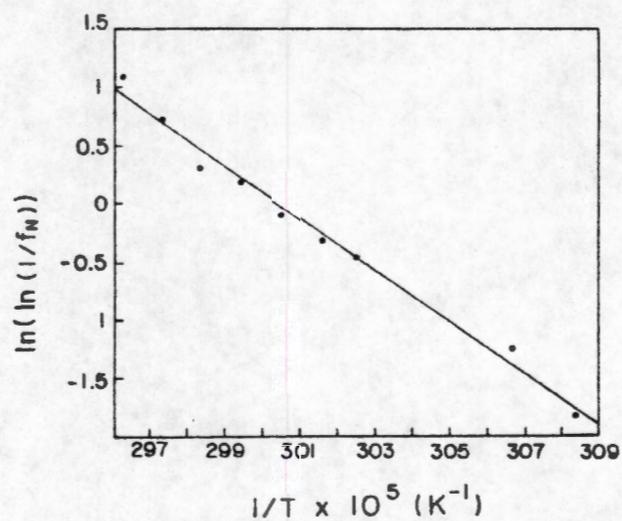


Figura 12. Gráfica de $\ln(\ln 1/f_N)$ vs. $1/T$ para la desnaturalización de la bromelaína a pH 3.4, a una velocidad de calentamiento de $1.0 \text{ }^\circ\text{C/min}$.

De la pendiente de la recta se obtiene una energía de activación de $185 \pm 8 \text{ kJ/mol}$, de la ordenada al origen se obtiene $T_m = 333 \text{ K}$.

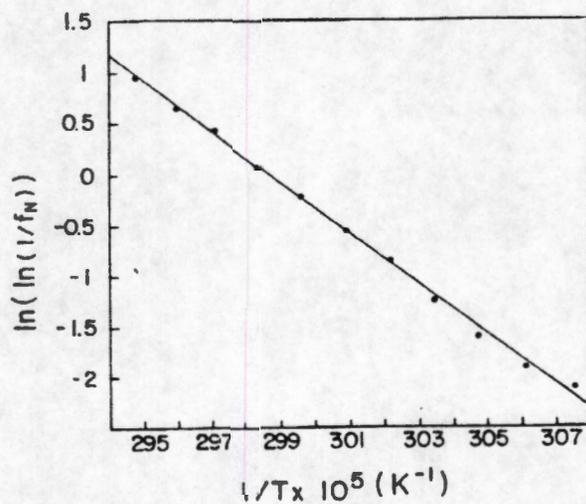


Figura 13. Gráfica de $\ln(\ln 1/f_N)$ vs. $1/T$ para la desnaturalización de la bromelaina a pH 3.4, a una velocidad de calentamiento de $1.5 \text{ }^\circ\text{C/min}$. De la pendiente de la recta se obtiene una energía de activación de $207 \pm 4 \text{ kJ/mol}$, de la ordenada al origen se obtiene $T_m = 335 \text{ K}$.

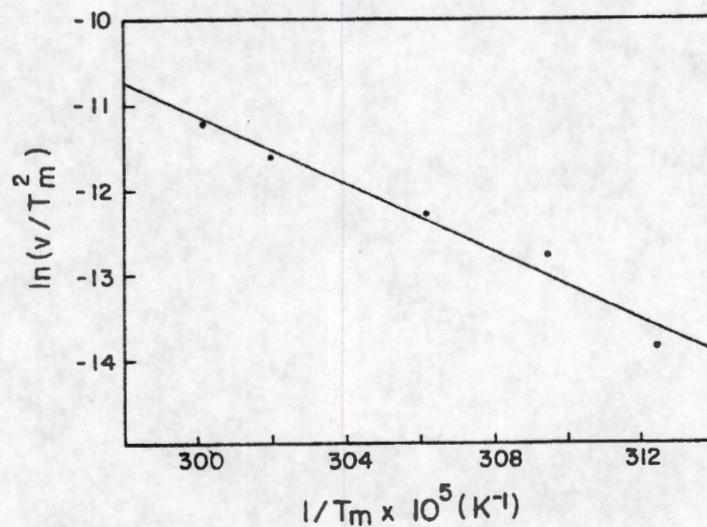


Figura 14. Gráfica de $\ln (v/T_m^2)$ vs. $1/T_m$ para la desnaturalización térmica de la bromelafina.

Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.98 para la regresión lineal. De la pendiente se calculó una energía de activación de $164 \pm 17 \text{ kJ/mol}$, y de la ordenada al origen un factor pre-exponencial de $1.31 \times 10^{25} \text{ min}^{-1}$.

Tabla II

Energía de activación determinada variando la velocidad de calentamiento

Energía de activación y valores de T_m para cinco velocidades de calentamiento. Se incluyen los valores de la desviación estándar, así como el coeficiente de correlación (CC) para la regresión lineal.

Velocidad de calentamiento (°C/min)	E (kJ/mol)	T_m (K)	CC
1.5	207 ± 4	335 ± 8	-0.99
1.0	185 ± 8	333 ± 20	-0.99
0.5	239 ± 6	328 ± 11	-0.99
0.3	217 ± 6	324 ± 13	-0.99
0.1	209 ± 5	321 ± 11	-0.99

De la ec.(4.1.12) se obtiene una energía de activación de 164 ± 17 kJ/mol, $A=1.31 \times 10^{25} \text{ min}^{-1}$, $CC=0.98$.

5.5.2 Mediciones cinéticas a temperatura constante

Ya que los resultados mencionados anteriormente indican que el comportamiento de desnaturalización de la bromelaína está de acuerdo con un mecanismo irreversible de dos estados, se decidió probar esta proposición estudiando directamente la cinética del proceso a temperatura constante (ver Métodos y Materiales). El cambio en la fracción de proteína nativa, f_N , medido como una función del tiempo dió como resultado una curva monofásica a todas las temperaturas estudiadas (en el intervalo 30-50 °C) como puede apreciarse en la figura 15. En cada caso, la dependencia en el tiempo de la función $\ln f_N$ se ajustó bien a una línea recta (con coeficientes de correlación entre 0.93 y 0.99), como se aprecia en la figura 16. Además, la extrapolación de $\ln f_N$ a tiempo cero, dió valores que siempre fueron cercanos a cero, indicando que si un proceso rápido ocurre dentro del tiempo muerto de mezclado, no involucra un cambio significativo en la estructura de la enzima. Los valores de las constantes de velocidad a las diferentes temperaturas estudiadas se dan en la tabla III. Es difícil comparar las constantes de velocidad estimadas en las condiciones del experimento con los valores de las constantes de otras proteínas reportadas en la literatura. Por ejemplo, para la lisozima a pH 2.6 y 303.7 K, se tiene un valor de $2.8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ [46], que es mayor que el valor correspondiente a la bromelaína ($6.34 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$). Para la tripsina a la misma temperatura y un pH de 2.4 se reporta un valor de $3.29 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ [47]. La variación de k con la temperatura se ajustó bien a la ecuación de Arrhenius, como muestra la figura 17. Los valores de energía de activación y del factor pre-

exponencial calculados de estos resultados son $181 \pm 35 \text{ kJ/mol}$ y $5.7 \times 10^{28} \text{ min}^{-1}$, respectivamente.

Con los valores determinados de las constantes de velocidad a las cinco temperaturas estudiadas, se construyó una gráfica de Eyring (ec. (4.2.6)) la cual se muestra en la figura 18. La correlación fué de 0.92, se obtuvieron los valores de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger para el estado activado de la reacción de primer orden, siendo estos de $173 \pm 42 \text{ kJ/mol}$ y $243 \pm 133 \text{ J/K mol}$, respectivamente.

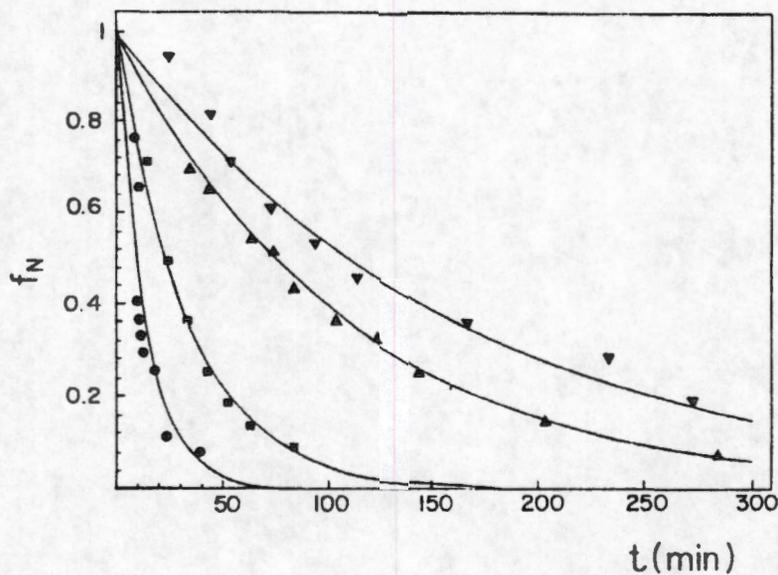


Figura 15. Cinética de la desnaturalización térmica de la bromelaina a varias temperaturas, a un pH de 3.4.

f_N representa la fracción de bromelaina nativa (calculada como se indica en el texto). (▼) 30.5, (▲) 36.1, (■) 43.2 y (●) 46.1 °C. Los puntos experimentales se ajustaron a curvas simples de decaimiento exponencial (curvas continuas).

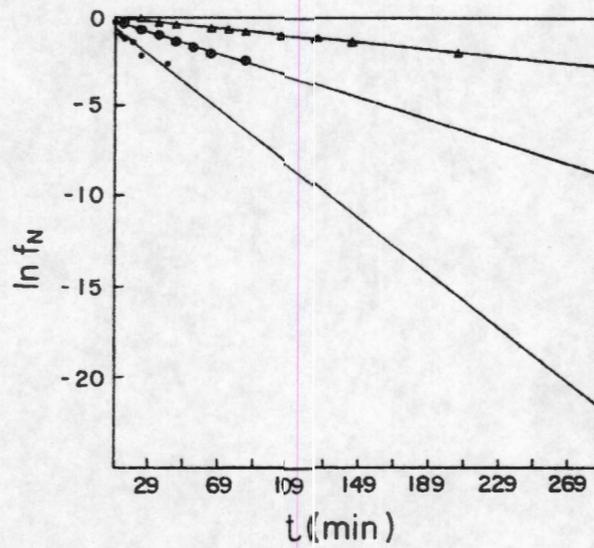


Figura 16. Gráficas de $\ln f_N$ contra el tiempo para la desnaturalización térmica de la bromelaína.

Se representan experimentos típicos a (▲) 36.1, (●) 43.2 y (·) 46.1 °C.

Tabla III

Constantes de velocidad

Constantes de velocidad para un modelo irreversible de dos estados de primer orden. Se incluyen las desviaciones estándar y el coeficiente de correlación (CC) para la regresión lineal.

T (K)	k x 10 ³ (min ⁻¹)	CC
303.7	6.34 ± 0.53	-0.97
309.3	9.35 ± 0.26	-0.99
316.4	30.32 ± 1.54	-0.99
319.3	74.05 ± 11.0	-0.93
322.9	514.28 ± 113	-0.95

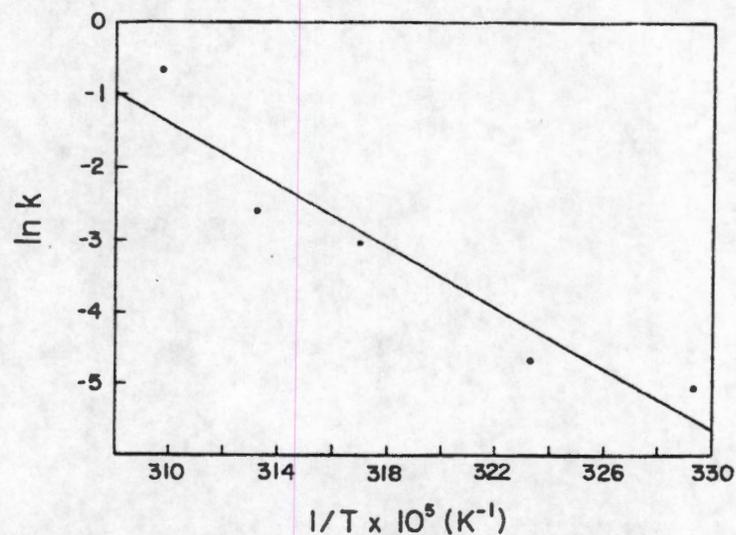


Figura 17. Gráfica de Arrhenius para la cinética de la desnaturalización térmica de la bromelaína.

Para construir la gráfica se usaron las constantes de velocidad de la tabla III, se obtuvo una energía de activación de $181 \pm 35 \text{ kJ/mol}$.

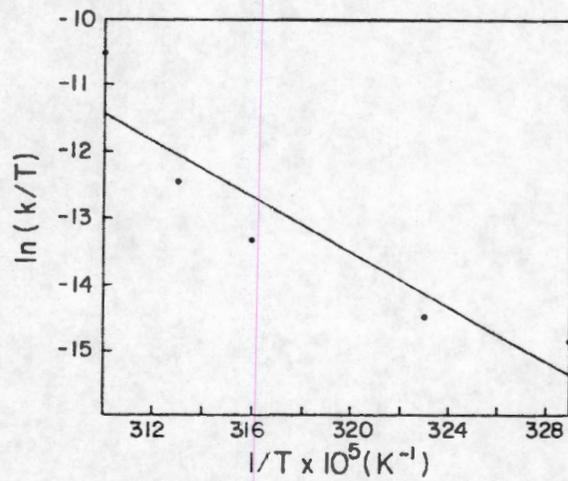


Figura 18. Gráfica de Eyring para la cinética de la desnaturalización térmica de la bromelaína.

Se usaron los valores de las constantes de velocidad de la tabla III, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.92.

5.5.3 Calorimetría diferencial de barrido

La endoterma de la bromelaína obtenida a pH 3.4 y 1 °C/min, después de restar la línea base amortiguador-amortiguador, se muestra en la figura 19. El máximo de la curva de capacidad calorífica ocurrió a 59.3 °C, en concordancia con el valor de T_m observado en los experimentos de dicroísmo circular efectuados bajo las mismas condiciones (60.6 °C). Debido a la baja solubilidad de la bromelaína, las curvas de CDB se obtuvieron con concentraciones de proteína de 0.80-1.0 mg/ml. Se consideró que, bajo estas circunstancias, los experimentos eran de baja precisión, y por lo tanto, el análisis de los datos calorimétricos se restringió a la entalpía de desnaturalización total, ΔH_{ca1} . Con este propósito, se restaron a las curvas calorimétricas líneas base sigmoidales conectando las temperaturas inicial y final de la transición. De esta manera, se integró la curva calorimétrica para calcular el valor de ΔH_{ca1} . Se obtuvieron resultados similares usando líneas base rectas (ver figura 20). El ΔH_{ca1} promedio obtenido de tres diferentes experimentos fue de 334 ± 17 kJ/mol.

Se usó la función de capacidad calorífica en exceso teórica (ec.(4.1.24) y una regresión no-lineal para calcular la energía de activación y el valor de T_m , manteniendo ΔH_{ca1} constante. En este caso, la energía de activación calculada es 243 kJ/mol, que es consistente con el valor calculado a partir de la ec.(4.1.21). La tabla IV resume los valores de los parámetros cinéticos obtenidos.

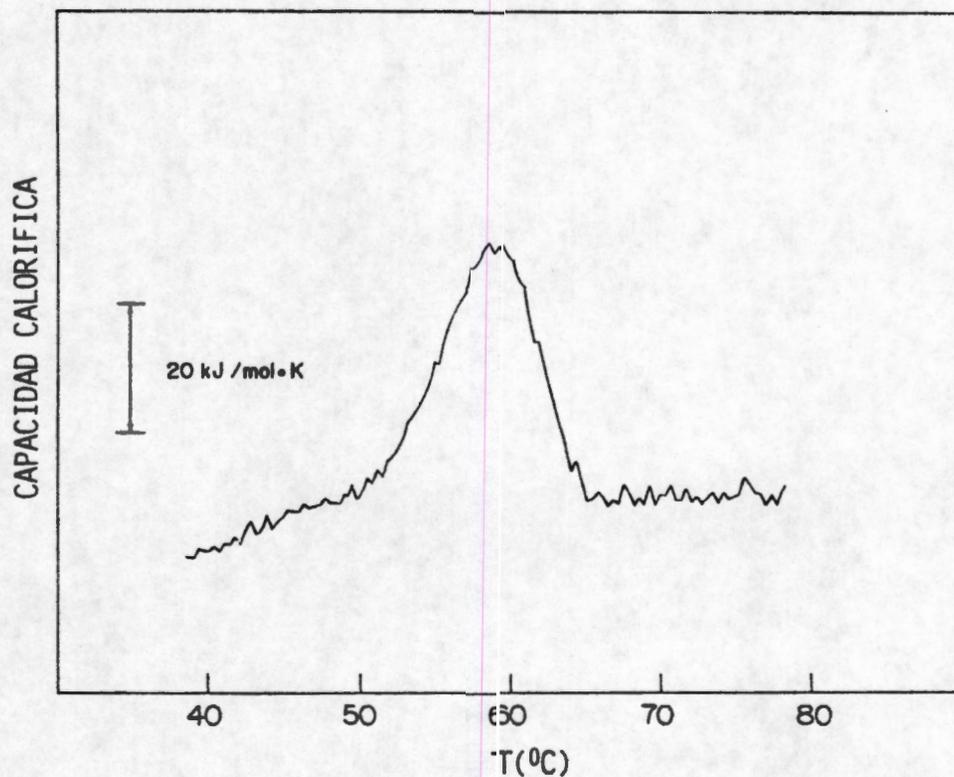


Figura 19. Curva de CDB de la bromelaina sustrayendo la línea base amortiguador-amortiguador.

La curva se obtuvo a un pH de 3.4 y una velocidad de barrido de 1.0 °C/min. Se utilizó una concentración de proteína de 0.8 mg/ml.

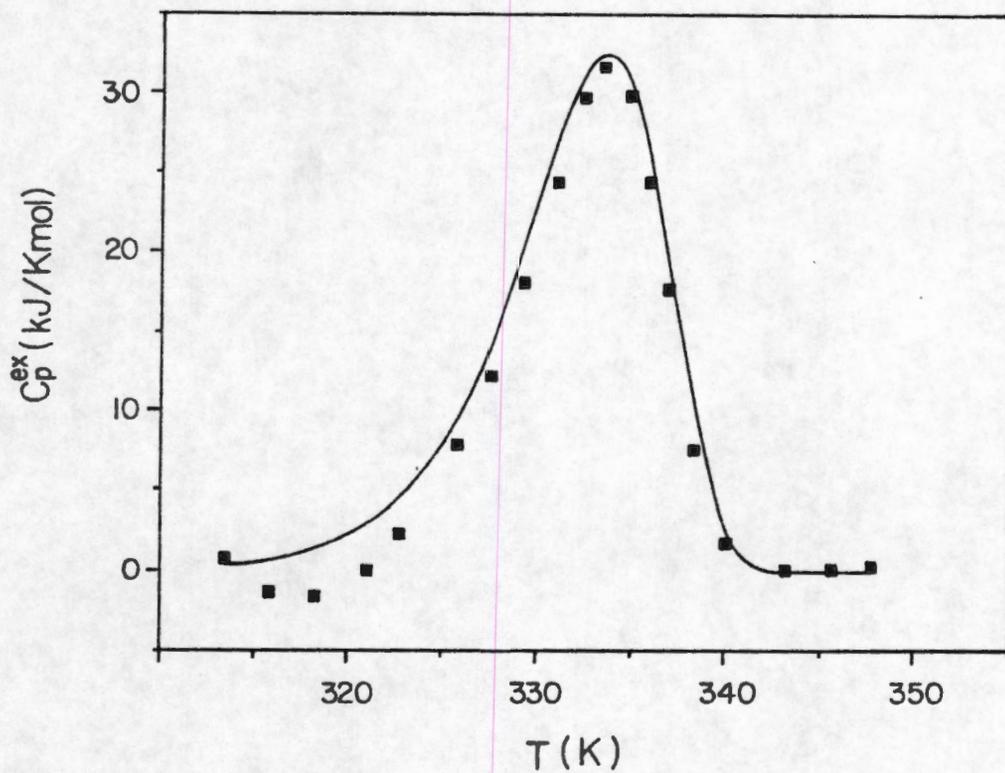


Figura 20. Función de capacidad calorífica en exceso teórica de la bromelaina a pH 3.4 para un experimento típico.

Los datos experimentales (■) se ajustaron a un modelo irreversible de dos estados de acuerdo a la ec. (4.1.24).

Tabla IV

Parámetros cinéticos de la desnaturalización térmica de bromelaína

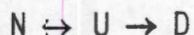
Los parámetros se calcularon como se indica en el texto. Se incluyen valores de \pm desviación estándar.

Método	E (kJ/mol)	\ln (A/min ⁻¹)
$\ln(v/T_m^2)$ vs. $1/T_m$	164 ± 17	57.8 ± 6.4
$\ln(\ln 1/f_N)$ vs. $1/T$	211 ± 13	-
$\ln k$ vs. $1/T$	181 ± 35	66.1 ± 13.6
Calorimétrico	243 ± 11	-

5.6 El modelo Lumry-Eyring

En esta tesis se han presentado varias líneas de evidencia que indican que la desnaturalización térmica de la bromelaína sigue un modelo irreversible de dos estados con una cinética de primer orden. Se llegó a esta conclusión a partir de resultados obtenidos de diferentes enfoques experimentales que cubrieron un amplio intervalo de temperatura (30-70°C). En uno de estos enfoques, es decir, el efecto de la velocidad de calentamiento en la curva de transición, se usó un método espectroscópico en lugar de la tradicional calorimetría diferencial de barrido [34,48-54]. Esta alternativa puede ser conveniente para proteínas de baja solubilidad o que están disponibles en una cantidad limitada.

Aunque el comportamiento de desnaturalización de la bromelaína es consistente con un modelo del tipo $N \rightarrow D$, hay otros esquemas de reacción que pueden conducir a una cinética de primer orden bajo ciertas condiciones. De especial importancia debido a su simplicidad es el mecanismo Lumry-Eyring:



donde U es la especie desdoblada en equilibrio con el estado nativo [55,56]. Si se supone que los tres procesos son de primer orden, la aplicación de la condición del estado estacionario para U da como resultado que la velocidad de formación de D obedecerá una cinética de primer orden con una constante de velocidad aparente dada por la expresión (para entender el significado de k_1 , k_2 y k_3 ver la sección 4.3)

$$k_{app} = k_1 k_3 / (k_2 + k_3)$$

Existen dos casos en los cuales los valores relativos de las constantes de velocidad dan lugar al modelo irreversible de dos estados, en donde no es posible detectar un intermediario en cantidades apreciables.

Cuando $k_2 \gg k_3$ y $k_2 \gg k_1$, esto implica que $K \ll 1$ ($K = k_1/k_2$); si empleamos las funciones analíticas para las fracciones de N , U y D , es decir, las ecuaciones (4.3.6), (4.3.7) y (4.3.8) encontramos que bajo estas condiciones, la fracción de U es muy pequeña y la constante de velocidad aparente de formación de D es $k_{app} = k_1 k_3 / k_2$ (lo cual puede deducirse de la aproximación del estado estacionario o bien de las ecuaciones (4.3.3) y (4.3.7)). Si, por ejemplo, tomamos $k_1 = 0.05$, $k_2 = 1.0$ y $k_3 = 0.01 \text{ min}^{-1}$; usando la ec. (4.3.9) para el tiempo de inducción encontramos que tiene un valor de 7.29 min, y como puede constatarse en la figura 21 -que nos muestra las poblaciones en función del tiempo-, la fracción del intermediario es pequeña. Para este caso, la constante aparente de formación de D es $5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. A temperaturas más altas, dado que el proceso de N a U es endotérmico, la constante de equilibrio aumentaría y en consecuencia también la concentración de U (ver la figura 22), lo que no se observó en los experimentos efectuados. En este caso la energía de activación aparente cambiaría con la temperatura, y se ha visto que en nuestro caso es constante en un amplio intervalo de temperaturas.

En el caso en que $k_3 \gg k_2$ y $k_3 \gg k_1$ en todo el intervalo de temperaturas estudiado, siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el párrafo anterior y tomando como ejemplo $k_1 = 0.001$, $k_2 = 0.01$ y $k_3 = 1.0 \text{ min}^{-1}$, se encuentra un tiempo de inducción de 6.87 min y como puede apreciarse en la figura 23, la fracción del intermediario es casi cero. Bajo estas condiciones la constante aparente de formación de D es $k_{app} = k_1$. En esta

situación, E representa la barrera de energía para la reacción $N \rightarrow U$, siendo este el paso limitante del mecanismo. Una conclusión similar se obtendría de las siguientes consideraciones. Se ha demostrado que muchas proteasas son sintetizadas como proenzimas [57], es decir, la región catalíticamente activa se obtiene del rompimiento de un polipéptido precursor más grande. Las proteasas sulfhidríticas se encuentran en este grupo [5]. Es posible que el segmento "pro" contenga información para el plegamiento reversible. Ahora bien, si consideramos que la bromelaína nativa es un estado metaestable, la presencia del segmento "pro" [58] originaría un descenso relativo de la barrera de energía de la reacción de plegamiento, permitiendo tal vez el desdoblamiento reversible.

Los resultados de los parámetros de activación estimados a través de la ecuación de Eyring se obtuvieron de una regresión lineal con una correlación de 0.92, esto puede deberse a que las constantes de velocidad deben medirse con una mayor exactitud. El valor de ΔH^\ddagger (173 ± 42 kJ/mol) representa aproximadamente el 52% del cambio de la entalpía calorimétrica (334 kJ/mol). Este resultado es consistente con la existencia de un estado de transición en el cual la mayoría de las interacciones que estabilizan a la proteína nativa están rotas. Aunque es difícil estimar el valor preciso de ΔS^\ddagger , es claro que este parámetro de activación es positivo (243 ± 133 J/K mol), y más aún, ΔS^\ddagger representa de un 8 a un 18% del cambio de entropía de desnaturalización para una proteína globular del tamaño de la bromelaína [23], sugiriendo así que la formación del estado de transición esta acompañado de un pequeño, pero significativo desorden del estado nativo. Considerando que los valores de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger son constantes en el intervalo de temperaturas estudiado (303.7

a 322.9 K) y aplicando la relación $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$, se tienen valores de ΔG^\ddagger del orden de 99 ± 58 kJ/mol. Se han descrito características similares para los estados de transición de desnaturalización del inhibidor de quimotripsina 2 [59,60] y lisozima [46]. Por lo tanto, la consideración de los parámetros de activación parece apoyar la idea de que la desnaturalización de bromelaína está limitada por la velocidad del proceso de desdoblamiento.

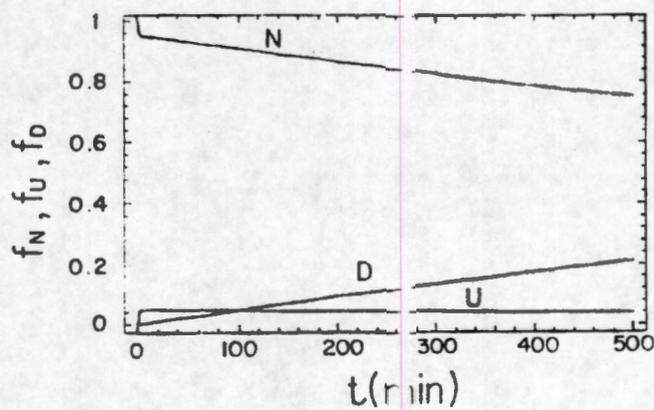


Figura 21. Población de especies de bromelaína de acuerdo al modelo Lumry-Eyring.

Se representan las fracciones de N , J y D calculadas de acuerdo a la solución analítica del modelo tomando $k_1=0.05$, $k_2=1.0$ y $k_3=0.01 \text{ min}^{-1}$. El tiempo de inducción es de 7.3 min.

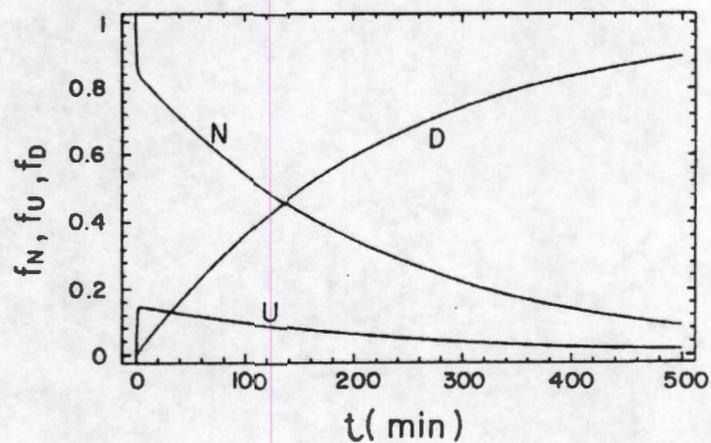


Figura 22. Población de especies de bromelaina de acuerdo al modelo Lumry-Eyring.

Se representan las fracciones de N , U y D calculadas de acuerdo a la solución analítica del modelo tomando $k_1=0.2$, $k_2=1.1$ y $k_3=0.03 \text{ min}^{-1}$. El tiempo de inducción es de 4.3 min.

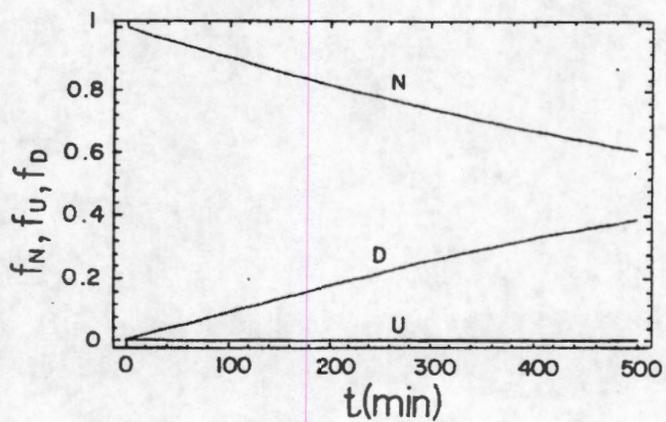


Figura 23. Población de especies de bromelaína de acuerdo al modelo Lumry-Eyring.

Se representan las fracciones de N , U y D calculadas de acuerdo a la solución analítica del modelo tomando $k_1=0.001$, $k_2=0.01$ y $k_3=1.0 \text{ min}^{-1}$. El tiempo de inducción es de 6.9 min.

6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las características del espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta-lejano de la bromelaína de tallo indican que es una proteína $\alpha + \beta$, como sería de esperar dada la gran homología con respecto a la papaína, actinidina y proteinasa Ω . Sin embargo, este espectro representa una tercera clase dentro de la superfamilia de la papaína. La determinación de la estructura molecular de la quimopapaína y la bromelaína por medio de la cristalografía de rayos-X podría ayudar a comprender que factores estructurales son los responsables de la variación espectral dentro de esta familia de proteínas.

La desnaturalización térmica de la bromelaína de tallo a pH 3.4 es un proceso irreversible de dos estados. Sin embargo, si consideramos el mecanismo Lumry-Eyring, los resultados obtenidos sugieren que $N \rightarrow U$ es la etapa limitante. Con el fin de comprobar esta hipótesis, sería interesante estudiar la cinética de desdoblamiento térmico por dicroísmo circular y fluorescencia con un accesorio de flujo retenido para medir concentraciones a tiempos del orden de milisegundos en los primeros cinco minutos del experimento.

Por otro lado, sería muy importante estudiar la cinética y la termodinámica de la probromelaína para determinar si el proceso es reversible. Este estudio nos ayudaría a comprender por qué la bromelaína se desnaturaliza a través de una trayectoria irreversible. Es necesario

analizar con más detalle el efecto del segmento "pro" en los procesos de plegamiento.

REFERENCIAS

1. Anfinsen, C.B. (1973) *Science* **181**, 223-230.
2. De Bernardes-Clark, E. and Georgiou, G. (1991) In *Protein Refolding* (Georgiou, G. and De Bernardes-Clark, E., eds.) pp. 1-20, American Chemical Society, Washington, D.C.
3. Goloubinoff, P., Gatengy, A., Lorimer, G.H. (1991) In *Protein Refolding* (Georgiou, G. and De Bernardes-Clark, E. eds.) pp. 110-118, American Chemical Society, Washington, D.C.
4. Plitsyn, O.B. (1994) *Protein Engineering* **7**, 593-596.
5. Cohen, L.W., Coghlan, V.M. and Diemel, L.C. (1986) *Gene* **48**, 219-227.
6. Carne, A. and Moore, C.H. (1978) *Biochem. J.* **173**, 73-83.
7. Dubois, T., Kleinshmidt, T., Schneck, A.G., Looze, Y. and Braunitzer, G. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 741-754.
8. Topham, C.M., Salih, E., Frazao, C., Kowlessur, D., Overington, J.P., Thomas, M., Brocklehurst, S.M., Patel, M., Thomas, E.W. and Brocklehurst, K. (1991) *Biochem J.* **280**, 79-92.
9. Jacquet, A., Kleinshmidt, T., Schneck, A.G., Looze, Y. and Braunitzer, G. (1989) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**, 425-434.
10. Watson, D.C., Yaguchi, M. and Lynn, K.R. (1990) *Biochem. J.* **266**, 75-81.
11. Ritonja, A., Rowan, A.D., Bittle, D.J., Rawlings, N.D., Turk, V. and Barrett, A.J. (1989) *FEBS Lett.* **247**, 419-424.
12. Kamphuis, I.G., Kalk, K.H., Swarte, M.B.A. and Drenth, J. (1984) *J. Mol. Biol.* **179**, 233-257.
13. Baker, E.N. (1980) *J. Mol. Biol.* **141**, 441-484.

14. Pickersgill, R.W., Rizkallah, P., Harris, G.W. and Goodenough, P.W. (1991) *Acta Crystallogr.* **B47**, 766-771.
15. Solís-Mendiola, S., Arroyo-Reyna, A. and Hernández-Arana, A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1118**, 288-292.
16. Heinicke, R.M. and Gortner, W.A. (1957) *Econ. Botany* **11**, 225-234.
17. Murachi, T. and Neurath, H. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 99-107.
18. El-Gharbawi, T., Whitaker, J.P. (1963) *Biochemistry* **2**, 476-481.
19. Silverstein, R.M. and Kezdy, F.J. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 678-686.
20. Lynn, K.R. (1977) *Anal. Biochem.* **77**, 33-33.
21. Ota, S., Muta, E., Katahira, V. and Okamoto, Y. (1980) *J. Biochem (Tokyo)* **98**, 219-228.
22. Rowan, A.D., Buttle, D.J. and Barret, A.J. (1990) *Biochem. J.* **266**, 869-875.
23. Privalov, P.L. (1979) *Adv. Protein Chem.* **33**, 167-241.
24. Sturtevant, J.M. (1987) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **38**, 463-488.
25. Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L. and Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**, 159-188.
26. Solís-Mendiola, S., Rojo-Domínguez, A. and Hernández-Arana, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1203**, 121-125.
27. Ishihara, H., Takahashi, N., Oguri, S. and Tejima, S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10715-10719.
28. Van Kuik, J.A., Hoffmann, R.A., Mutsaers, J.H.G.M., Van Halbeek, H., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1986) *Glycoconj. J.* **3**, 27-34.

29. Bowstra, J.B., Spoelstra, E.C., De Waard, P., Leeflang, B.R., Bastian, R., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1990) *Eur. J. Biochem.* **190**, 113-122.
30. Solís-Mendiola, S., Zubillaga-Luna, R., Rojo-Domínguez, A. and Hernández-Arana, A. (1989) *Biochem. J.* **257**, 183-186.
31. Tablero, M., Arreguín, R., Arreguín, B., Scriano, M., Sánchez, R., Rodríguez-Romero, A. and Hernández-Arana, A. (1991) *Plant Sci.* **74**, 7-15.
32. Hennessey, J.P. and Johnson, W.C. (1982) *Anal. Biochem.* **125**, 177-188.
33. Murachi, T. (1970) *Methods Enzymol.* **19**, 273-284.
34. Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M. and Mateo, P.L. (1988) *Biochemistry* **27**, 1648-1652.
35. Laidler, K.J. (1987) *Chemical Kinetics*, pp. 117-115, Harper Collins Publishers, New York.
36. Lumry, R. and Eyring, H. (1954) *J. Phys. Chem.* **58**, 110-120.
37. Frost, A.A. and Pearson, R.P. (1961) *Kinetics and Mechanism*, pp. 173-177, John Wiley & Sons, New York, London.
38. Sakai, T., Ikeda, K., Hanaguchi, K. and Murachi, T. (1970) *Biochemistry* **9**, 1939-1942.
39. Manavalan, P. and Johnson, W.C. (1983) *Nature (London)* **305**, 831-832.
40. Compton, L.A. and Johnson, W.C. (1986) *Anal. Biochem.* **155**, 155-167.
41. Kabat, E.A., Lloyd, K.O. and Beychok, S. (1969) *Biochemistry* **8**, 747-756.
42. Hennessey, J.P. and Johnson, W.C. (1981) *Biochemistry* **20**, 1085-1094.
43. Hernández-Arana, A. and Soriano-García, M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **954**, 170-175.

44. Vita. C., Fontana, A., Seeman, J.R. and Chaiken, I.M. (1979) *Biochemistry* **18**, 3023-3031.
45. Goto, Y. and Hamaguchi, K. (1987) *Biochemistry* **26**, 1879-1884.
46. Segawa, S. and Sugihara, M. (1984) *Biopolymers* **23**, 2473-2488.
47. Pohl, F.M. (1968) *Eur. J. Biochem.* **7**, 146-152.
48. Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Mateo, P.L., Vilanova, M., Serra, M.A. and Avilés, F.X. (1988) *Eur. J. Biochem.* **176**, 225-230.
49. Guzman-Casado, M., Parody-Morreale, A., Mateo, P.L. and Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Eur. J. Biochem.* **188**, 181-185.
50. Lepock, J.R., Rodhal, A.M., Zhang, Ch., Heynen, M.L., Waters, B. and Cheng, K.H. (1990) *Biochemistry* **29**, 681-689.
51. Morin, P.E., Diggs, D. and Freire, E. (1990) *Biochemistry* **29**, 781-788.
52. Galisteo, M.L., Mateo, P.L. and Sánchez Ruiz, J.M. (1991) *Biochemistry* **30**, 2061-2066.
53. Conejero-Lara, F., Mateo, P.L., Aviles, F.X. and Sánchez-Ruiz, J.M. (1991) *Biochemistry* **30**, 2067-2072.
54. Arriaga, P., Menéndez, M., Villacorta, J.M. and Laynez, J. (1992) *Biochemistry* **28**, 6603-6607.
55. Lumry, R. and Eyring, H. (1954) *J. Phys. Chem.* **58**, 110-120.
56. Sánchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.* **61**, 921-935.
57. Baker, D. and Agard, D.A. (1994) *Biochemistry* **33**, 7505-7509.
58. Silen, J.L. and Agard, D.A. (1989) *Nature* **341**, 462-464.*
59. Jackson, S.E. and Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 10428-10435.
60. Jackson, S.E. and Fersht, A.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 10436-10443.