

# Aislamiento, purificación y caracterización parciales de las proteasas obtenidas de hierba mora (*Solanum nigrum*) e higuerón (*Ficus apollinaris*)

Rubén Félix, Marco Sinche, Ricardo Muñoz y Patricio Castillo

Laboratorio de Investigaciones Aplicadas

Departamento de Ciencias Nucleares

patricio.castillo@epn.edu.ec

## Resumen

En este trabajo se estudiaron algunas características de las proteasas presentes en muestras de hojas de hierba mora (*Solanum nigrum*) y de tallos de higuerón (*Ficus apollinaris*). Los extractos se trataron con etanol al 96% y luego fueron sometidos a la filtración en gel. Se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes con las fracciones más activas resultantes y una caracterización cinética en la que se determinaron los efectos de la temperatura, del pH y de la concentración de sustrato sobre su actividad caseinolítica. Finalmente, se determinó cualitativamente la presencia de alcaloides en los extractos crudos y en las fracciones purificadas más activas de ambas muestras. La filtración en gel tuvo un rendimiento del 72.9% en actividad caseinolítica para la hierba mora y del 16.4% para el higuerón. La electroforesis con las fracciones más activas de hierba mora presentó bandas proteicas entre 24 y 137 kDa, mientras que en las fracciones más activas de higuerón, se encontraron bandas con peso molecular entre 17 y 74 kDa. Cinéticamente, las fracciones más activas de hierba mora presentaron una posible inhibición por exceso de sustrato, con valores de  $K_M = 31.4 \mu\text{mol/L}$ ,  $K_I = 58.5 \mu\text{mol/L}$  y  $V_{\text{máx}} = 878.7 \text{ mUE/mL}$ , a condiciones de pH y temperatura óptimas de 10.5 y 37 °C; mientras que, las de higuerón se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten, con  $K_M = 4.90 \mu\text{mol/L}$  y  $V_{\text{máx}} = 87.3 \text{ UE/mL}$ , a pH y temperatura óptimas de 8.5 y 45 °C. Se reportó la presencia de alcaloides en ambas muestras, pero los procesos de purificación utilizados mostraron su efectividad en la eliminación de estas sustancias.

**Palabras claves:** proteasas, higuerón, hierba mora, filtración en gel, electroforesis.

## Abstract

The proteases obtained from hierba mora (*Solanum nigrum*) leaves and higueron (*Ficus apollinaris*) stems were studied. The extracts were treated with 96% ethanol and passed through a gel filtration column. An SDS PAGE was performed using the most active resulting fractions and a characterization of the effects of temperature, pH and substrate concentration on their caseinolytic activity. Finally, qualitative determinations of alkaloids presence in semi-purified extracts and in concentrated samples of the more active fractions were made. The total yield percentage, based on caseinolytic activity, for the gel-filtration was 72.95% for *Solanum nigrum* leaves and 16.44% for *Ficus apollinaris* stems. SDS PAGE showed proteic bands between 137 and 24 kDa, for *Solanum nigrum*, while *Ficus apollinaris* showed proteins with molecular weights between 74 and 17 kDa. In the kinetics characterization with casein as substrate, the more active fractions of *Solanum nigrum* samples evidenced an inhibition by substrate excess with  $K_M = 31.4 \mu\text{mol/L}$ ,  $K_I = 58.5 \mu\text{mol/L}$  and  $V_{\text{max}} = 878.7 \text{ mUE/mL}$  at optimal conditions of temperature and pH (10.5 and 37 °C). *Ficus apollinaris* samples followed the Michaelis-Menten kinetics model with  $K_M = 4.90 \mu\text{mol/L}$  and  $V_{\text{max}} = 87.3 \text{ mUE/mL}$ , also at optimal conditions (8.5 and 45 °C). Alkaloid presence was positive for both samples, but the utilized purification processes permitted the elimination of these substances.

**Keywords:** proteases, *Solanum nigrum*, *Ficus apollinaris*, gel filtration, electrophoresis, caseinolytic activity.

## 1 Introducción

En el Ecuador existe una gran diversidad de plantas que poseen principios activos, que pueden utilizarse en varios procesos industriales, como el alimentario, textil, farmacéutico, entre otros.

Las fitoproteasas son enzimas que cumplen importantes funciones en el metabolismo de las plantas. Existe un particular interés en el estudio de su actividad enzimática, del efecto de sus sustratos y sus inhibidores, con

el fin de encontrar nuevas aplicaciones [19].

Entre los usos industriales de las fitoproteasas se destacan la elaboración de ablandadores de carne y de suplementos dietéticos; la clarificación de la cerveza; la fabricación de detergentes, la curtiembre, el blanqueo en la industria papelera, así como procesos de depuración de residuos líquidos.

En estudios previos, se determinó la actividad proteolítica de varias especies vegetales seleccionadas, de las provincias ecuatorianas de Pichincha, Pastaza, Bolívar, Loja y Zamora Chinchipe, mediante el método de Anson modificado, con caseína como sustrato [17],[6].

En dichos trabajos, la mayor actividad proteolítica fue encontrada en las hojas de hierba mora (*Solanum nigrum*) y en los tallos de higuerón (*Ficus apollinaris*). Por tal motivo, en el presente trabajo se aislaron, purificaron y caracterizaron cinética y molecularmente las proteasas obtenidas a partir de las muestras de los órganos mencionados de dichas plantas.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Preparación de los extractos vegetales a partir de muestras procesadas

Se recolectaron hojas de hierba mora y tallos de higuerón en la provincia de Pichincha, especies que antes fueron identificadas con ayuda del personal del Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador [17].

Para la preparación de los extractos vegetales crudos se pesaron 15 g de hojas o de tallos, en una balanza analítica, y se licuaron con 45 mL de tampón fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 7.5 [17]. Se filtró el extracto a través de papel filtro.

En esta etapa se ensayó la presencia de antioxidantes, para lo cual al tampón fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 7.5, se añadió la cantidad necesaria para lograr la concentración de 40 mmol/L de las siguientes sustancias: sal tetrasódica de EDTA, metabisulfito de sodio, ascorbato de sodio, sorbato de sodio, cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol, DTE (ditioeritritol) y DTT (ditiotretol) [16].

### 2.2 Precipitación de las proteínas de los extractos crudos obtenidos

A 20 mL de extracto crudo se agregó 1 mL de una solución de NaCl 4 mol/L, se agitó y posteriormente se añadieron 40 mL de etanol al 96 % (v/v), se agitó suavemente para luego centrifugar durante 5 min a 2700 g.

Se desechó el sobrenadante y se lavó la proteína precipitada con 20 mL de etanol al 70 % (v/v). Luego se eliminó el líquido sobrenadante.

A continuación, se resuspendió el precipitado en tampón fosfato de sodio 50 mmol/L y pH 7.5, que contenía 40 mmol/L de DTE, para obtener el extracto acuoso, según los resultados alcanzados en el ensayo descrito en el acápite 2.1.

### 2.3 Determinación de la actividad caseinolítica

Se colocaron 0.1 mL de extracto acuoso en 4 tubos de ensayo, 2 constituyeron los blancos y los otros 2, contenían la muestra. Para la preparación de los blancos se añadieron 1.8 mL de TCA (ácido tricloroacético), al 5 % y 1.1 mL de una solución de caseína al 1 % [1]. Las muestras se completaron con 1.1 mL de caseína al 1 %.

Los tubos se colocaron en un baño termostático a 37 °C, por 20 min. La reacción en los tubos con muestra se detuvo con 1.8 mL de TCA, en cada uno. Se centrifugaron a 3500 g, durante 20 min y finalmente, se determinó la DO<sub>280</sub> en el sobrenadante de cada muestra y blanco [1].

### 2.4 Cromatografía de filtración en gel

El soporte de Sepharosa se lavó tres veces con tampón fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 7.5, se colocó en una columna de vidrio de 1 m de largo y se realizó un lavado adicional con el mismo tampón durante 30 min.

Luego se alimentaron 20 mL de extracto semi-purificado, centrifugado y filtrado para realizar la corrida cromatográfica. Las fracciones eluidas con el mismo tampón fueron colectadas y se determinó la concentración proteica y la actividad caseinolítica.

### 2.5 Selección de las fracciones más activas de la cromatografía de filtración en gel

Para la selección de la fracción más activa de la filtración en gel, se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0, que evaluó la distribución *t* (de Student), para comprobar las diferencias significativas entre las muestras analizadas, con un nivel de confianza de 95 % (Norman *et al.*, 2004).

### 2.6 Electroforesis

Con las fracciones que presentaron las actividades proteolíticas más altas se realizó una electroforesis, en condiciones desnaturizantes (Thermo Electron Co., 2003). Cuando fue necesario, las muestras se concentraron antes de aplicarlas en el gel, mediante ultra-centrifugación realizada con la ayuda de tubos de centrifuga Amicon® Ultra 15, dotados de membrana semipermeable de 10 kDa, durante 15 min, a 3400 g.

Se mezclaron 40  $\mu$ L de cada muestra concentrada con 10  $\mu$ L de tampón en tubos Eppendorff. Los tubos fueron sumergidos en agua a ebullición, durante 5 min, con el fin de desnaturizar la proteína. Así se obtuvieron 50  $\mu$ L de muestra preparada, desnaturizada y lista para ser aplicada en el gel de poliacrilamida [15].

Como estándar se utilizó una mezcla de proteínas preteñidas, de marca BenchMarck™, para un rango de proteínas de 6 a 180 kDa [10]. El peso molecular promedio para las bandas encontradas corresponde a 180, 115, 82, 64, 49, 37, 26 y 19 kDa.

La electroforesis se corrió a voltaje constante de 100 V para el gel concentrador y de 150 V para el gel separador. Se determinó la movilidad electroforética relativa de las proteínas.

Mediante el programa Corel Graphic Suite [4], se dedujeron las movilidades relativas electroforéticas sobre las fotografías de los geles producidos, mediante el montaje de escalas definidas [19]. Se realizó el gráfico del peso molecular del estándar, contra su movilidad electroforética relativa, para determinar el peso molecular de las muestras en un rango entre 10 y 150 kDa.

## 2.7 Estudio del efecto del pH sobre la actividad proteolítica

Se concentró la fracción más activa del eluato de la cromatografía mediante ultracentrifugación, se disolvieron 10  $\mu$ L del concentrado obtenido en 490  $\mu$ L de tampón fosfato de sodio 50 mmol/L a valores de pH de 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 10.5 y 11.5. Luego, se determinó la actividad caseinolítica para cada valor de pH y se graficó la actividad caseinolítica contra el pH y se determinó el pH óptimo.

## 2.8 Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica

La muestra se preparó con la dilución de 40  $\mu$ L de concentrado en 1960  $\mu$ L de tampón fosfato de sodio 50 mmol/L, al valor encontrado de pH óptimo y luego se determinó la actividad caseinolítica, mediante incubación de las muestras y blancos a 18, 20, 30, 37, 45, 50 y 60 °C. Se graficó la actividad caseinolítica contra la temperatura y se determinó la temperatura óptima.

## 2.9 Estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad proteolítica

Se disolvieron 40  $\mu$ L de concentrado enzimático en 1960  $\mu$ L de tampón fosfato de sodio al pH óptimo y se determinó la actividad caseinolítica de la muestra sobre soluciones de caseína a concentraciones de 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 % (p/v), con una incubación a la temperatura óptima. Se graficó la actividad caseinolítica contra la concentración de caseína y a partir de esta gráfica, se hallaron los valores de  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  mediante una regresión con el programa Origin 6.0 [14].

## 2.10 Determinación cualitativa de la presencia de alcaloides en los extractos vegetales

Para la determinación de la presencia de alcaloides en los extractos vegetales, se utilizaron soluciones de ácido pícrico al 1 % (p/v) en etanol (Reactivo 1) y de ácido fosfomolibdico al 1 % (p/v) en agua destilada (Reactivo 2) [21].

El estándar se preparó mediante la dilución de 100  $\mu$ L de un concentrado de nicotina al 99 %, en peso, en 2 mL de agua destilada y se comprobó si ocurría la formación de precipitados al ponerlo en contacto con el Reactivo 1 y con el Reactivo 2.

Luego, se añadieron 100  $\mu$ L de extracto en dos tubos de ensayo, el uno contenía 100  $\mu$ L de Reactivo 1 y, el otro, 100  $\mu$ L de Reactivo 2. En otro tubo se colocaron 200  $\mu$ L de extracto, para comparar las coloraciones generadas en estos tres tubos por acción de los reactivos.

## 3 Resultados y discusión

### 3.1 Efecto de la adición de sustancias antioxidantes en la obtención de los extractos semi-purificados

La Tabla 1 muestra el efecto de los antioxidantes utilizados, a la vez, en la preparación de los extractos crudos y en la resuspensión de los extractos semi-purificados de hierba mora (*Solanum nigrum*), sobre el porcentaje de hidrólisis de caseína.

**Tabla 1.** Porcentaje de hidrólisis de caseína alcanzada por los extractos semi-purificados de hierba mora (*Solanum nigrum*), obtenidos con la adición de antioxidantes

Aditivo	% de hidrólisis
EDTA	0.00 $\pm$ 0.00
Metabisulfito	0.00 $\pm$ 0.00
Ascorbato	0.18 $\pm$ 0.04
Sorbato	0.00 $\pm$ 0.00
Cisteína	0.18 $\pm$ 0.01
$\beta$ -mercaptoetanol	0.35 $\pm$ 0.02
DTE	0.94 $\pm$ 0.01
DTT	0.84 $\pm$ 0.01
Sin aditivo	0.65 $\pm$ 0.08

La presencia de DTE y DTT aumentó la actividad del extracto de hierba mora, respecto del extracto sin aditivo, seguramente porque sus grupos tioles, disminuyen la actividad catalítica de las fenoloxidasas, lo cual evita la formación de compuestos fenólicos oxidados, responsables de la inactivación de muchas enzimas [2].

Cuando se añadió DTE, solamente para la resuspensión del extracto semi-purificado, el porcentaje de hidrólisis de caseína fue de 0.93 %, frente al 0.65 % obtenido sin aditivo y 0.94 % alcanzado en las condiciones indicadas en los resultados expuestos en la Tabla 1.

Adicionalmente, se determinó que al utilizar DTE, solamente para resuspender el precipitado de la semi-purificación habrá un ahorro económico del 51.9 % por cada muestra analizada, frente a la pérdida de 0.01 % en el porcentaje de hidrólisis de caseína. Por tanto, se escogió al DTE como el mejor aditivo, para ser aplicado solo en la resuspensión de las proteínas, para la obtención del

extracto semi-purificado, tanto para la hierba mora (*Solanum nigrum*), como para el higuerón (*Ficus apollinaris*).

### 3.2 Purificación parcial de los extractos crudos de hierba mora y de higuerón

Los resultados que aparecen en la Tabla 2, indican los rendimientos en actividad caseinolítica y en proteína y el grado de purificación de los extractos semi-purificados con respecto a los extractos crudos de hierba mora y de higuerón, alcanzados luego del tratamiento de los extractos crudos con etanol al 96 %, de acuerdo con el método indicado en el acápite 2.2.

**Tabla 2.** Tabla de purificación parcial de los extractos de hierba mora (*Solanum nigrum*) y de higuerón (*Ficus apollinaris*)

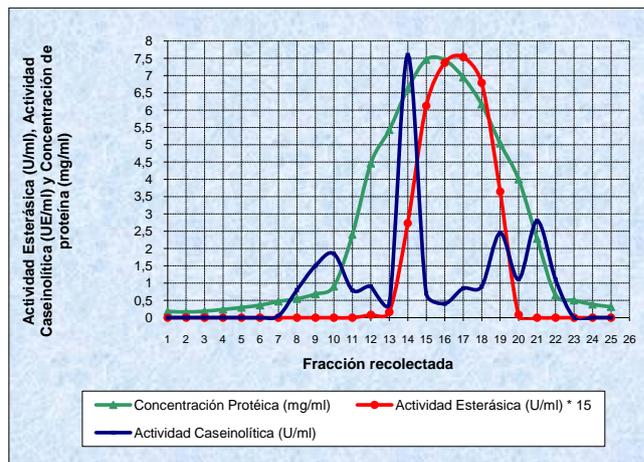
Parámetro evaluado	Hierba mora	Higuerón
Rendimiento en actividad caseinolítica (%)	71.4	86.4
Rendimiento en cantidad de proteína (%)	37.2	78.3
Grado de purificación (veces)	1.93	1.10

Con respecto a los extractos semi-purificados de hierba mora, el porcentaje de rendimiento en cantidad de proteína de 37.2 % y el grado de purificación de 1.93 veces indican que, mediante la precipitación de proteínas con el solvente orgánico, se eliminaron otros compuestos presentes en los extractos crudos.

Con respecto a los extractos semi-purificados de higuerón, la actividad caseinolítica recuperada fue del 86.4 % y el grado de purificación fue de 1.10 veces, un proceso no tan eficiente como el de la hierba mora, por las posibles diferencias estructurales de las proteínas presentes en este extracto.

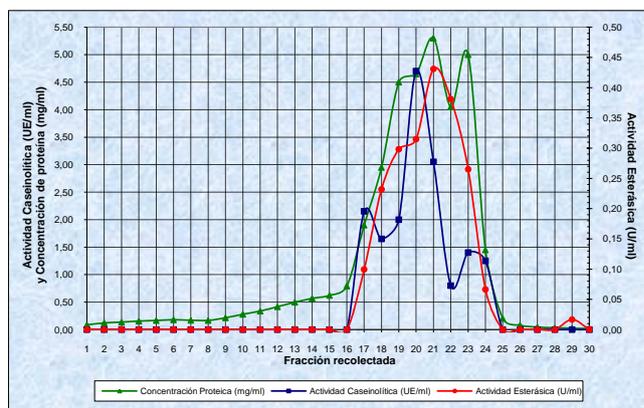
### 3.3 Cromatografía de filtración en gel de los extractos semi-purificados de hierba mora y de higuerón

En la Figura 1 se representa la concentración de proteína, la actividad caseinolítica y la actividad esterásica contra el número de fracción recolectada de la filtración en gel del extracto semi-purificado de hierba mora. Se observa que las fracciones que presentaron mayor actividad esterásica fueron las fracciones 13-19; mientras que, las que presentaron mayor actividad caseinolítica fueron las fracciones 10, 14, 19 y 21.



**Figura 1.** Actividad esterásica (U/mL) y caseinolítica (UE/mL) y concentración de proteína (mg/mL) contra número de fracción recolectada para la cromatografía de filtración en gel, de los extractos semi-purificados obtenidos a partir de hojas de hierba mora

La Figura 2 muestra las curvas obtenidas de concentración de proteína, actividad caseinolítica y actividad esterásica contra el número de fracciones recolectadas de la filtración en gel del extracto semi-purificado de higuerón. El lote, comprendido entre las fracciones 16 y 26, mostró las mayores actividades.



**Figura 2.** Actividad esterásica (U/mL) y caseinolítica (UE/mL) y concentración de proteína (mg/mL) contra el número de fracción recolectada para la filtración en gel de los extractos semi-purificados obtenidos a partir de tallos de higuerón

### 3.4 Evaluación de los procesos de purificación de los extractos semi-purificados de hierba mora y de higuerón

Se realizó un análisis estadístico de muestreo para respaldar la eliminación de las fracciones que presentaron actividades caseinolítica y esterásica prácticamente nulas, sin afectar el porcentaje de significancia de todo el lote [5]. Se encontró que, en el caso de la hierba mora, las fracciones 14-19 y 21 fueron las más activas y concentradas.

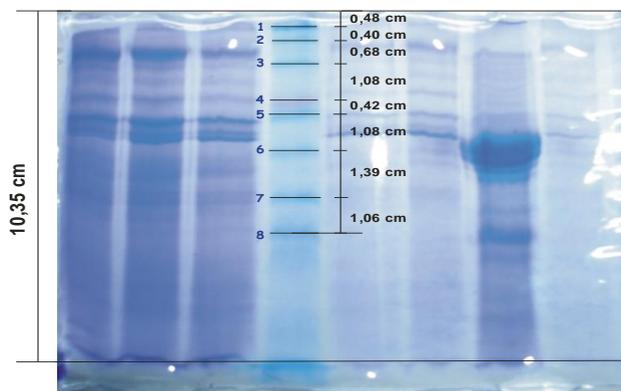
La fracción 14, por presentar la mayor actividad caseinolítica y una elevada actividad esterásica, fue elegida para la realización de la caracterización cinética de las enzimas contenidas en el extracto, al mismo tiempo que sirvieron para determinar el peso molecular, mediante electroforesis.

En el caso del híguerón, se procedió de igual manera y se estableció que las fracciones 19–22 mostraron mayor actividad esterásica; mientras que la 20 y 21, mayor actividad caseinolítica. Las fracciones con más proteína recuperada fueron las fracciones 19–21 y 23.

La fracción 20, por tener una alta concentración de proteína y la mayor actividad caseinolítica, fue escogida para realizar la caracterización cinética. Se escogieron las fracciones 16–23 para la realización de la electroforesis.

### 3.5 Electroforesis de las fracciones más activas de los extractos de hierba mora y de híguerón

En la Figura 3 se muestra el gel de la electroforesis obtenido con el estándar, las fracciones más activas y los extractos semi-purificados de las hojas de hierba mora. En la Figura 4 se presenta la curva de calibración, con las movilidades relativas y el peso molecular de las proteínas del estándar utilizado.



Muestra	15	16	17	ST	19	20	ESP	21
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8

Figura 3. Gel de electroforesis de las fracciones más activas obtenidas de la filtración en gel del extracto de hierba mora, junto con el estándar de pesos moleculares conocidos

Se encontró que el peso molecular de las proteínas, presentes en las fracciones más activas, se hallaba entre 24 y 137 kDa. Se formaron bandas de coloración más intensa, correspondientes a pesos moleculares comprendidos entre 45 y 55 kDa, lo que significaría que dichos pesos moleculares corresponden a las proteínas más concentradas, posiblemente las más activas también.

Para el extracto semi-purificado (ESP) se generaron varias bandas entre 14 y 144 kDa. La banda más intensa está ubicada en un rango de peso molecular entre 34 y 47 kDa. Se conoce que algunas cisteino-proteasas poseen un peso molecular que va de 20 a 50 kDa (Grzonka, 2001). Siendo así, las bandas encontradas revelarían la presencia de este tipo de enzimas.

Se encontró también, en la fracción más activa, una banda de proteína de peso molecular 68 kDa, muy similar en peso a la de la aminopeptidasa P encontrada en el tomate (*Lycopersicon esculentum*), de 72 kDa [8].

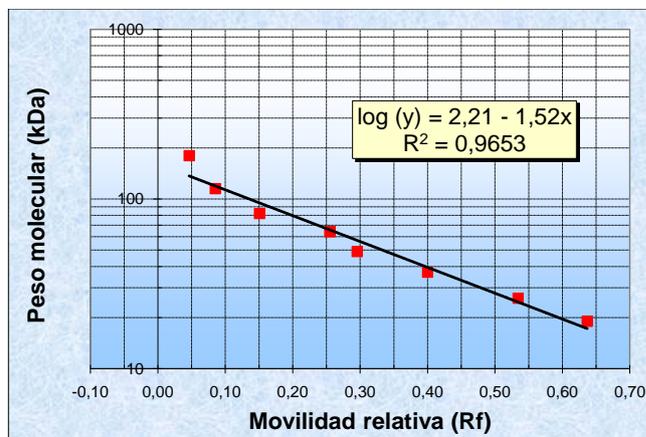
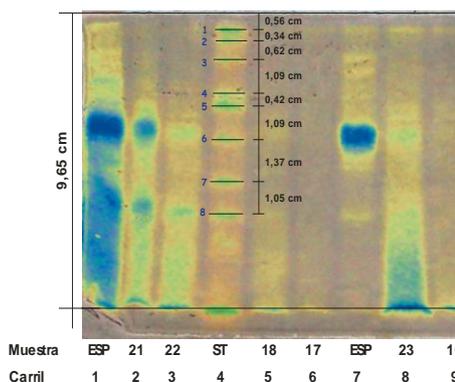


Figura 4. Curva de calibración para la determinación del peso molecular de las enzimas contenidas en los extractos semi-purificados de hierba mora

En el extracto semi-purificado posiblemente existe una glicoproteína, normalmente aislada de la propia hierba mora, que tiene un peso molecular de 150 kDa (Lee y Lim, 2006), ya que se encontró una banda correspondiente a 144 kDa.

Al igual que en el caso de la hierba mora, se midieron los recorridos de las bandas que conformaban el estándar, para la construcción de la curva de calibración para las fracciones activas del híguerón. Se obtuvieron los resultados que aparecen en las Figuras 5 y 6. El peso molecular de las proteínas que se encontraron en las fracciones más activas, estuvo entre 17 y 74 kDa.



Muestra	ESP	21	22	ST	18	17	ESP	23	16
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Figura 5. Recorridos medidos para el estándar en las muestras de híguerón

La fracción 21, la más activa, produjo dos bandas de proteína de gran intensidad, por lo que se puede decir que se encontrarían en mayor concentración dentro de la fracción seleccionada. Los pesos moleculares de dichas bandas corresponderían a 29 y 41–45 kDa, posiblemente las proteínas responsables de la actividad proteolítica encontrada.

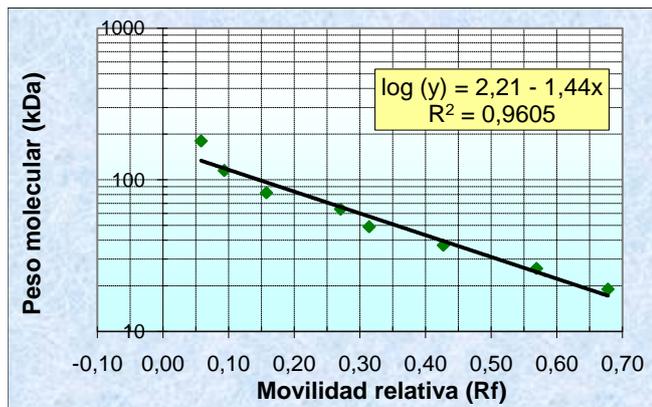


Figura 6. Curva de calibración para la determinación del peso molecular de las enzimas contenidas en las fracciones más activas de higuerón (*Ficus apollinaris*)

El extracto semi-purificado de higuerón produjo varias bandas, entre 17 y 137 kDa de peso molecular. Una banda, aparentemente muy concentrada, aparece entre los 36 y 47 kDa. En los geles se observa que la filtración en gel purificó a las proteínas contenidas en el extracto semi-purificado.

Se conoce que las ficinas son las proteasas de mayor importancia dentro de las plantas del género *Ficus* y que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 25 kDa (Pierce, 2007). Posiblemente dicha proteasa es parte del extracto semi-purificado analizado, ya que el gel mostró una banda de una proteína de 29 kDa.

### 3.6 Caracterización cinética de la actividad caseinolítica de las fracciones más activas de hierba mora y de higuerón

#### 3.6.1 Efecto del pH

Los valores obtenidos para la fracción más activa de hierba mora se representan en la Figura 7.

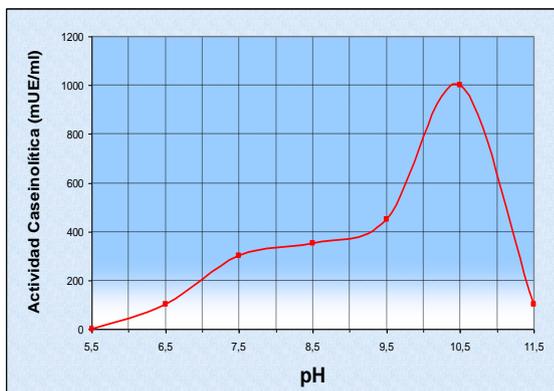


Figura 7. Actividad caseinolítica contra pH para la fracción más activa de hierba mora

Se observa que la fracción más activa de hierba mora presentó mayor actividad caseinolítica a pH 10,5. Este valor de pH se mantuvo como un parámetro constante

para la realización de los siguientes análisis del estudio cinético.

Los resultados obtenidos para la fracción más activa de higuerón aparecen en la Figura 8.

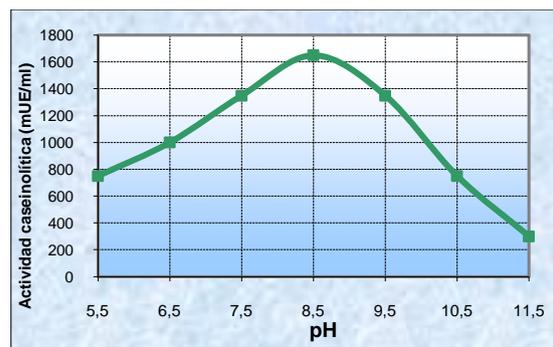


Figura 8. Actividad caseinolítica contra pH para la fracción más activa de higuerón

La actividad caseinolítica presentó un valor máximo a pH 8,5. Se mantuvo ese valor de pH para los estudios cinéticos posteriores de esta fracción.

#### 3.6.2 Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura, sobre la actividad caseinolítica de la fracción más activa de hierba mora, se indica en la Figura 9.

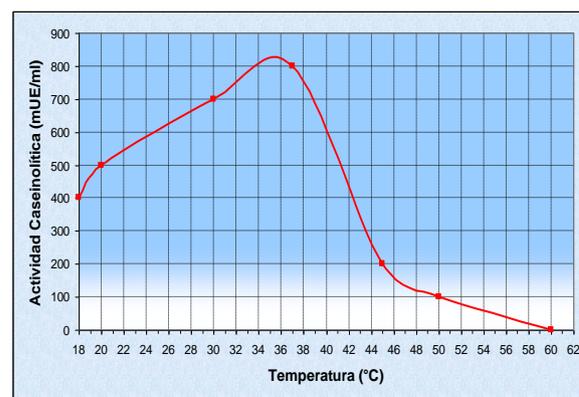
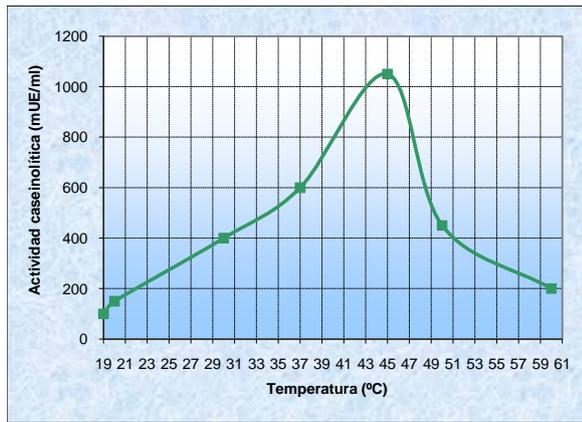


Figura 9. Actividad caseinolítica contra temperatura para la fracción más activa de hierba mora

La curva obtenida mostró una actividad caseinolítica máxima a una temperatura de 37 °C. Dicho valor se conservó constante en el siguiente ensayo cinético.

Los resultados obtenidos para el higuerón se muestran en la Figura 10.



**Figura 10.** Actividad caseinolítica contra temperatura para la fracción más activa de higuerón

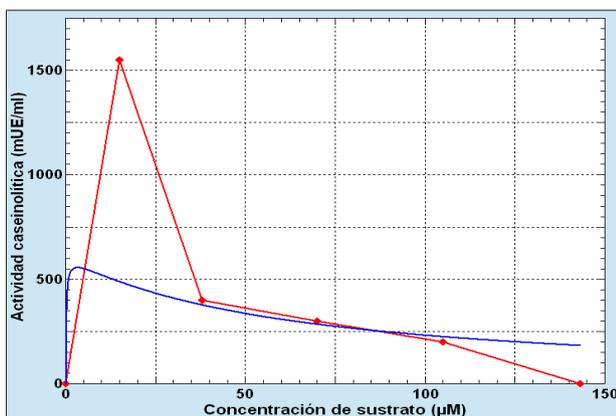
La actividad caseinolítica alcanzó un valor máximo a la temperatura de 45 °C. La temperatura óptima se mantuvo en el desarrollo del estudio cinético siguiente.

### 3.6.3 Efecto de la concentración del sustrato

Los resultados obtenidos para la fracción más activa de hierba mora sugieren que a mayor concentración de sustrato, existe una disminución en la velocidad de la reacción catalítica. Esto haría suponer que puede existir algún grado predominante de inhibición de las enzimas presentes, por exceso de sustrato (Marangoni, 2003).

A una concentración de sustrato de 15  $\mu\text{mol/L}$  la actividad caseinolítica tiene un valor máximo cercano a 1550 mUE /mL; pero, al aumentar la concentración de sustrato, hasta 143  $\mu\text{mol/L}$ , la actividad disminuye paulatinamente, hasta tornarse prácticamente nula [3].

De acuerdo con estas observaciones, para la determinación de los parámetros cinéticos  $K_M$ ,  $K_I$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , se utilizó el programa Corel Graphic Suite [4]. La Figura 11 muestra la curva con los datos experimentales y la curva ajustada al modelo modificado de Michaelis-Menten, para una inhibición por exceso de sustrato.



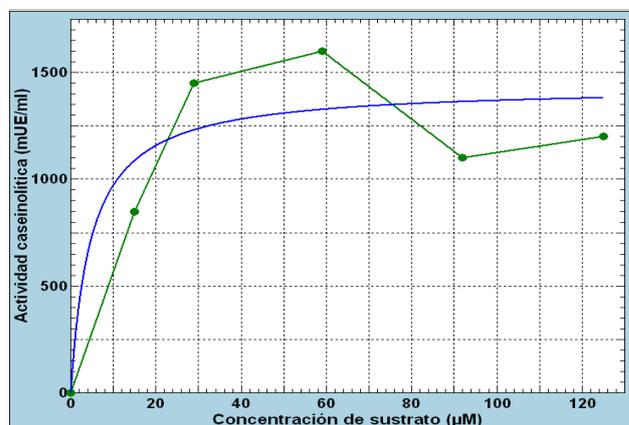
**Figura 11.**  $\diamond$  Datos experimentales medidos;  $\blacksquare$  modelo no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, ajustada, del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad caseinolítica de la fracción más activa de las hojas de hierba mora

Los valores obtenidos de los parámetros cinéticos son  $V_{m\acute{a}x} = 878.7 \text{ mUE/mL}$ ;  $K_M = 31.4 \mu\text{mol/L}$  y  $K_I = 58.5 \mu\text{mol/L}$ . Con el modelo propuesto se encontró un valor de  $r^2 = 0.87$ .

El valor de la constante de formación del complejo enzima-sustrato reactivo ( $K_M$ ) es menor que la constante de formación del complejo enzima-sustrato no reactivo ( $K_I$ ), lo que indica que el aumento de la concentración de sustrato favoreció mayoritariamente la formación de este último complejo.

Por otra parte, los resultados obtenidos para la fracción más activa de higuerón presentaron una tendencia hiperbólica normal, que se ajustó al modelo cinético de Michaelis-Menten. La gráfica que se muestra en la Figura 12 fue realizada en el programa Origin 6.0 [14].

Se encontraron los parámetros  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_M$ , mediante una regresión no lineal, correspondiente a una hipérbola cuadrada ( $r^2 = 0.83$ ).



**Figura 12.**  $\bullet$  Datos experimentales medidos;  $\blacksquare$  Curva ajustada al modelo de Michaelis-Menten del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad caseinolítica de la fracción más activa de tallos de higuerón

Los resultados obtenidos se compararon con los de una investigación similar, realizada con extractos obtenidos y purificados a partir de tallos de piña [20]. Dichos resultados se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Comparación de los valores de  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para la fracción más activa de tallos de higuerón con los valores para tallos de piña (Salas, 2007)

Parámetro	Tallos de piña	Tallos de higuerón
$K_M$ (mmol/L)	0.004	0.005
$V_{m\acute{a}x}$ (UE /mL)	0.250	87.3

A través de la comparación realizada de los valores de  $K_M$ , se evidencia que la afinidad por la caseína que mostraron las enzimas purificadas a partir de los tallos de higuerón, sería un 20% menor que la afinidad que presenta la bromelina, obtenida a partir de los tallos de piña, por el mismo sustrato.

Sin embargo, en cuanto al valor de  $V_{m\acute{a}x}$ , se deduce que a concentraciones altas de caseína, se lograría unas

350 veces más actividad proteolítica con extractos de tallos de higuerón, que con la bromelina extraída de los tallos de la piña.

### 3.7 Determinación cualitativa de la presencia de alcaloides en extractos de hierba mora e higuerón

En muestras que contienen alcaloides, la adición del Reactivo 1 forma un precipitado fino de color amarillo o naranja y la adición del Reactivo 2 forma precipitados de color verde o azul [21].

#### 3.7.1 Alcaloides en el extracto semi-purificado y en la fracción más activa de hierba mora

Al agregar el Reactivo 2 al extracto semi-purificado de hierba mora, se observó la formación de precipitados de coloración azul verdosa intensa y al añadir el Reactivo 1, se detectaron precipitados amarillos intensos. Esto verifica la presencia de alcaloides, a pesar del tratamiento del extracto crudo con etanol al 96 %. Con el concentrado de la fracción más activa también se formaron precipitados de color amarillo pero muy leve, al añadir Reactivo 1 y verde muy tenue con el Reactivo 2, lo que indica que el proceso de purificación cromatográfica por filtración en gel, también, permitió eliminar, en cierto grado, los alcaloides presentes en los extractos iniciales.

#### 3.7.2 Alcaloides en el extracto semi-purificado y concentrado de la fracción más activa de higuerón

Para el caso del extracto semi-purificado de higuerón, el Reactivo 1 y el Reactivo 2 formaron precipitados amarillos y verdes intensos, respectivamente.

Al añadir, los Reactivos 1 y 2 sobre el concentrado de la fracción más activa de higuerón, también se observó la aparición de precipitados amarillos y azules tenues.

Aunque se evidencia la presencia de alcaloides en los extractos semi-purificados y en los concentrados de las fracciones más activas, se pudo apreciar una notable diferencia en la intensidad del color de los precipitados de los extractos antes y después del proceso de purificación.

Se confirma que la cromatografía de filtración en gel y la ultracentrifugación, son procesos que eliminan compuestos por tamaño molecular y entre ellos los alcaloides de las muestras, que podrían conferir toxicidad a los extractos [9],[13].

## 4 Conclusiones

1. A través de la adición de etanol al 96 %, se aisló y purificó parcialmente las proteasas de las hojas de hierba mora y de los tallos de higuerón. Además, se determinaron las condiciones óptimas para el uso de DTE (ditioeritrol) como aditivo conservante de la actividad proteolítica.

2. En esta etapa de purificación se obtuvo un porcentaje de rendimiento del 71.4 % en actividad caseinolítica para las hojas de hierba mora y del 86.4 % para los tallos de higuerón. En estos casos, se logró un grado de purificación de 1.93 y 1.10 veces, respectivamente.
  3. A través de la cromatografía de filtración en gel con los extractos semi-purificados de hierba mora e higuerón, se incrementó la actividad específica de ambas muestras. Además se tuvo un rendimiento en actividad caseinolítica, del 72.9 % para la hierba mora y del 16.4 % para el higuerón.
  4. Mediante la electroforesis de las muestras de hierba mora, se determinó la presencia de proteínas con pesos moleculares entre 14 y 144 kDa, con bandas más concentradas en unos 50 kDa. En cambio, para las muestras de higuerón, los pesos moleculares de las proteínas estuvieron comprendidos entre 17 y 137 kDa, con bandas más concentradas en unos 45 kDa.
  5. Existió mayor actividad caseinolítica en la fracción más activa de la hierba mora a pH 10.5 y 37 °C, mientras que para la fracción más activa de higuerón, las condiciones óptimas fueron pH 8.5 y 45 °C.
  6. La cinética enzimática de la fracción más activa de hierba mora, presentó una probable inhibición por exceso de sustrato, con valores de  $K_M = 31.4 \mu\text{mol/L}$ ,  $K_I = 58.5 \mu\text{mol/L}$  y  $V_{m\acute{a}x} = 878.7 \text{ UE/mL}$ .
  7. La fracción más activa de higuerón presentó un ajuste al Modelo de Michaelis-Menten. Las constantes cinéticas obtenidas fueron  $K_M = 4.9 \mu\text{mol/L}$  y  $V_{m\acute{a}x} = 87.3 \text{ UE/mL}$ .
- Se encontró la presencia de alcaloides, en los extractos semi-purificados y los concentrados de las fracciones más activas de las muestras de hojas de hierba mora y de tallos de higuerón, los cuales, podrían conferir toxicidad a los extractos obtenidos. Sin embargo, se demostró cualitativamente que la cromatografía de filtración en gel es un efectivo proceso de purificación, que elimina dichos compuestos.

### Agradecimiento

Esta investigación se desarrolló gracias al auspicio del FUNDACYT, a través del proyecto EPN-PIC-111-2005.

## Referencias

- [1] Bastidas, K., 2005. *Estudio preliminar de la obtención de la enzima aminoacilasa I a partir de vísceras de cuy, pollo y res*. Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniera Química, E.P.N., Quito.

- [2] Chávez, M., Díaz, J., Pérez, U. y Delfín, J., 1990. *Temas de Enzimología*. Cuba, pp. 51, 52, 229, 230.
- [3] Coperland, R., 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Wiley-VCH, Inc., pp. 266–304.
- [4] Corel Corporation, 2002. *Corel Graphics Suite*. U.S.A.
- [5] González, G., 1985. *Métodos estadísticos y principios de diseño experimental*. Segunda edición, Quito, pp. 95–104, 27–31, 117, 118.
- [6] Gómez, C., 2008. *Identificación de actividad proteolítica en especies vegetales comunes presentes en las provincias de Loja y Pastaza*. Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniero Químico, E.P.N., Quito.
- [7] Grzonka, Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzy-Kowska, R., Lankiewicz, L., Wicz, W., Wiczak, E., Ciarkowski, J., Drabik, P., Janowski, R., Maciej, K., Jaskólski, M. y Grubb, A., 2001. *Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors*. *Acta Biochimica Polonica* 48, pp. 1–20.
- [8] Hauser, F., Strassner, J. y Schaller, A., 2001. *Cloning, expression and characterization of tomato (Lycopersicon esculentum) aminopeptidase P\**. *The Journal of Biological Chemistry*, Institute of Plant Sciences, Swiss Federal Institute of Technology Zürich, Suiza, pp. 1–30.
- [9] IIAP (Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana), 2007. *Oje o Higuierón*. [www.fao.org/AG/agL/agll/rla128/iiap/iiap2/CapituloIII-29.htm](http://www.fao.org/AG/agL/agll/rla128/iiap/iiap2/CapituloIII-29.htm), Perú.
- [10] INVITROGEN, 2006. *BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*. Catálogo No. 10748-010, California, U.S.A.
- [11] Lee, S. y Lim, K., 2005. *Apoptosis induced by glycoprotein (150-kDa) isolated from Solanum nigrum L. is not related to intracellular reactive oxygen species (ROS) in HCT-116 cells*. *Cancer Chemother Pharmacol* 57, pp. 507–516.
- [12] Marangoni, A., 2003. *Enzyme kinetics, a modern approach*. Wiley-Interscience, New Jersey, pp. 47–49, 52–58, 174–191.
- [13] Martínez, V., 2007. *Solanum nigrum L., Hierba mora*. El mundo de las plantas, [www.botanical-online.com/medicinalssolanumcastella.htm](http://www.botanical-online.com/medicinalssolanumcastella.htm), España.
- [14] Microcal™, 1999. Software Origin, versión 6.0. Microcal Software Inc. Northampton, U. S. A.
- [15] MILLIPORE, 2005. *Amicon® Ultra-15, Centrifugal Filter Devices*. Catálogo PR01780, Irlanda.
- [16] Novoa, I., 2005. *Obtención de un sustituto vegetal de la renina para la elaboración de quesos*. Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniera Química, E.P.N., Quito.
- [17] Núñez, D., 2007. *Identificación de proteasas vegetales con posibles aplicaciones industriales o bio-médicas a partir de especies comunes de las provincias de Bolívar y Pichincha*. Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniera Química, E.P.N., Quito.
- [18] Pierce, 2007. *Inmobilized Ficin*. <http://www.piercenet.com/Products>. U.S.A.
- [19] Rajesha, R., Natarajua, A., Gowdaa, C., Freyb, B., Freyb, F. y Vishwanatha, B., 2006. *Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from Symplocos latifolia latex: action on human fibrinogen and fibrin clot*. *Biochimie* 88, Elsevier, India, pp. 1313–1322.
- [20] Salas, P., 2007. *Estudio de un procedimiento de extracción, purificación parcial y caracterización cinética de bromelina obtenida a partir de tallos de piña (Ananas comosus) y análisis de su efectividad en el ablandamiento de las proteínas de la carne de res*. Tesis de Ingeniería en Biotecnología, ESPE, Sangolquí.
- [21] Thacher, H., 1982. *Manual de análisis orgánico cualitativo y cuantitativo*. Segunda edición, Barcelona, pp. 236–237.