



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

Caracterización parcial de la actividad enzimática de la enzima Bromelina mediante un método de diálisis

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LUIS EDUARDO SÁNCHEZ SANTANA**



**CD. MX.**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Sánchez Nieto Sobeida**

**VOCAL:**               **Profesor: Rodríguez Sáenz Ricardo**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Medina Rivero Emilio**

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: Villanueva Martínez Norma Angélica**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Plata Ramos María del Consuelo**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) IPN. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N,  
Col. Casco de Santo Tomas, Del. Miguel Hidalgo, C.P 11340.

## **ASESOR DEL TEMA:**

▪  
**DR. EMILIO MEDINA RIVERO**

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

▪  
**Q.F.B. SAID KAYUM VÁZQUEZ LEYVA**

## **SUSTENTANTE:**

▪  
**LUIS EDUARDO SÁNCHEZ SANTANA**

## Tabla de contenido

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>2</b>
2.1 MÉTODO ANALÍTICO	2
2.1.1 <i>¿Por qué desarrollar un método analítico?</i>	2
2.2 ENZIMAS: GENERALIDADES.	3
2.2.1. <i>¿QUÉ ES UNA ENZIMA?</i>	3
2.2.2. <i>Actividad y especificidad enzimática</i>	4
2.2.3. <i>Tipos de enzimas y sus usos</i>	5
2.3. DESARROLLO ANALÍTICO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	9
2.3.1. <i>Consideraciones generales para desarrollar un método enzimático</i>	10
2.3.2. <i>Influencia del pH</i>	10
2.3.3. <i>Influencia de la temperatura</i>	11
2.3.4. <i>Estabilidad térmica</i>	11
2.3.5. <i>Parámetros cinéticos Michaelis-Menten</i>	12
2.3.6. <i>Ensayos continuos y discontinuos</i>	14
2.3.7. <i>Técnicas de cuantificación</i>	14
2.3.8. <i>Diálisis.</i>	16
2.3.9. <i>Ensayos propuestos para determinar actividad catalítica de bromelina.</i>	16
2.4 APLICACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN LA INDUSTRIA	17
2.4.1. <i>Hidrolizados proteicos como suplementos alimenticios</i>	19
2.4.2. <i>Caso Colagenart®</i>	19
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>20</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
4.1. OBJETIVO GENERAL	20
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	20
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
5.2. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES	21
5.2.1. <i>Curva de calibración de gelatina grado alimenticio</i>	21
5.2.2. <i>Curva de calibración de gelatina grado USP</i>	21

5.2.3. <i>Concentración de la enzima</i>	22
5.3. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE BROMELINA.	23
5.3.1. <i>Condiciones experimentales</i>	25
5.3.2. <i>Cromatografía de exclusión molecular</i>	27
5.4. CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA BROMELINA	27
5.4.1. <i>Determinación de parámetros cinéticos aparentes</i>	27
5.4.2. <i>Efecto del pH en la actividad de proteasa</i>	28
5.4.3. <i>Estabilidad térmica</i>	28
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
6.1 SOLUBILIDAD DE GELATINA	29
6.2 CURVA DE CALIBRACIÓN DE GELATINA COMERCIAL	29
6.3 DISEÑO DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA BROMELINA	30
6.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS APARENTES	39
6.5 DETERMINACIÓN DE PH ÓPTIMO	41
6.6 DETERMINACIÓN DE TERMOESTABILIDAD	42
6.7 COMPARACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO CON OTROS MÉTODOS.	44
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>48</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>54</b>

## Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Clasificación enzimática de seis grupos basados en la reacción química catalizada.</i> .....	6
<i>Tabla 2. Clasificación de proteasas respecto a su mecanismo catalítico y sitio de actividad).</i> .....	7
<i>Tabla 3. Ensayos reportados para determinar actividad proteolítica de bromelina.</i> .	17
<i>Tabla 4. Aplicaciones de proteasas en la industria alimentaria y tecnológica</i> .....	18
<i>Tabla 5. Soluciones amortiguadoras usadas para las curvas de calibración de gelatina grado USP</i> .....	22
<i>Tabla 6. Desarrollo Experimental</i> .....	26
<i>Tabla 7. Concentraciones de sustrato evaluadas para determinar los parámetros cinéticos aparentes.</i> .....	28
<i>Tabla 8. Solubilidad de gelatina</i> .....	29
<i>Tabla 9. Parámetros cinéticos aparentes de enzima bromelina utilizando gelatina como sustrato.</i> .....	41

## Índice de Figuras

<i>Figura 1. Mecanismos proteolíticos. a) Serín-proteasas, b) Cisteín-proteasas, c) aspartil-proteasas y d) metaloproteasas .....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 2. Determinación gráfica de constantes cinéticas <math>K_m</math> y <math>V_{máx}</math>.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 3. Sistema de diálisis.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 4. Curva de calibración de gelatina comercial.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 5. Curva de progreso de la reacción con condición A.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 6. Curvas de progreso de la reacción con condiciones B.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 7. Curvas progreso de la reacción con condiciones C y D.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 8. Cromatogramas de dializado de gelatina.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 9. Curva de calibración gelatina grado USP.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 10. Curvas de progreso de la reacción con condiciones E y F.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 11. Curvas de progreso de la reacción con condiciones G.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 12. Curva cinética de hidrólisis de gelatina por la enzima bromelina a pH 4.5 y 37 °C.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 13. Influencia del pH en la actividad proteolítica de la bromelina.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 14. Estabilidad térmica de bromelina a 37 °C y pH 6.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 15. Diagrama de flujo del método de análisis propuesto para medir la actividad enzimática de la bromelina utilizando gelatina como sustrato.....</i>	<i>46</i>

## Índice de anexos

<i>Anexo 1. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de citratos pH 3.....</i>	<i>54</i>
<i>Anexo 2. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de citratos pH 4.....</i>	<i>54</i>
<i>Anexo 3. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de citratos pH 5.....</i>	<i>55</i>
<i>Anexo 4. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de citratos pH 6.....</i>	<i>55</i>
<i>Anexo 5. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.....</i>	<i>56</i>
<i>Anexo 6. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.....</i>	<i>56</i>
<i>Anexo 7. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.....</i>	<i>57</i>
<i>Anexo 8. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de boratos pH 8.....</i>	<i>57</i>
<i>Anexo 9. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de boratos pH 9.....</i>	<i>58</i>
<i>Anexo 10. Curva de calibración de colágeno en solución amortiguadora de boratos pH 10.....</i>	<i>58</i>

## 1. Resumen

Las proteasas son un subgrupo de las hidrolasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas y péptidos. Su actividad hidrolítica puede ser de endopeptidasas, si actúan sobre los enlaces peptídicos del interior de la cadena polipeptídica o de exopeptidasas si actúan sobre los aminoácidos terminales.

La bromelina, perteneciente a dicho subgrupo, es extraída del tallo o del fruto de la piña y tiene diversos usos en la industria alimentaria, por ejemplo, en la producción de cerveza, queso, ablandadores cárnicos, hidrolizados proteínicos, entre otros.

Dada su importancia en la industria, es necesario desarrollar técnicas analíticas para poder evaluar su actividad sobre un sustrato en particular, tanto por parte de los productores como de los consumidores de la misma. Permitiendo así comprobar la calidad de la enzima como producto final, o como materia prima, en el caso de los productores y consumidores, respectivamente. .

En este proyecto se desarrolló un método basado en la fotometría de absorción ultravioleta para determinar la actividad proteolítica de la enzima bromelina (obtenida del fruto de *Ananas comosus*), el cual supera a otros métodos utilizados en la actualidad al no requerir de sustratos sintéticos o de modificaciones en los productos para poder ser cuantificados.

Con los resultados obtenidos de los experimentos utilizando gelatina como sustrato, se calcularon las constantes cinéticas  $K_m = 0.1618$  mM y  $V_{m\acute{a}x} = 0.0080$  mM/min, el pH de actividad óptima fue de 6.0 y la enzima permaneció con 42% de actividad residual después de 6h de incubación a 37 °C. Dichos parámetros concuerdan con los reportados en otros estudios en los cuales se usaron otras metodologías para la medición de la enzima.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Método analítico**

La química analítica es una rama de la química que se encarga del estudio de la separación, cuantificación e identificación de componentes químicos de materiales naturales o artificiales constituidos por uno o mas compuestos o elementos (analitos). Se divide en dos categorías principales: a) análisis cualitativo, que se encarga de identificar los composición química de la muestra y b) análisis cuantitativo, que se encarga de estimar la cantidad de cierto elemento o compuesto de una sustancia (Ravisankar, Naga-Navya, Pravallika, & Navya-Sri, 2015). Un método analítico se entiende como el conjunto de operaciones y técnicas aplicadas a un análisis de una muestra.

#### **2.1.1 ¿Por qué desarrollar un método analítico?**

Existen diversas necesidades para desarrollar nuevos métodos analíticos, por ejemplo:

- a) Si no existe un método adecuado para identificar y/o cuantificar un analito en particular en la muestra matriz en específico.
- b) Los métodos existentes son muy propensos a errores, artefactos y/o a contaminaciones, o bien, son poco confiables (la exactitud y precisión no son las deseadas)
- c) Los métodos existentes no proporcionan una adecuada sensibilidad o selectividad al analito en las muestras de interés.
- d) El surgimiento de nuevos instrumentos y técnicas que ofrecen la oportunidad de mejorar los métodos existentes.
- e) Disminuir los costos de análisis.
- f) Disminuir tiempos de análisis.
- g) Facilitar el proceso de análisis (Swartz & Krull, 1997).

## 2.2 Enzimas: Generalidades.

### 2.2.1. ¿Qué es una enzima?

Las enzimas son catalizadores naturales, generalmente de naturaleza proteica, las cuales aceleran la velocidad de reacciones químicas en todos los seres vivos, siendo extremadamente eficientes, pudiendo incrementar la tasa de transformación de reacciones espontáneas en factores entre  $10^8$  y  $10^{10}$ , a veces llegando hasta  $10^{12}$  (Menger, 1993).

La palabra enzima fue utilizada por primera vez por el fisiólogo alemán Wilhelm Kühne en 1878 cuando estaba describiendo la habilidad de la levadura de producir alcohol a partir de azúcares, y deriva del griego *έν-* (en) y *ζύμη* (levadura) (Robinson, 2015).

Algunas de las características presentes en todas las enzimas son que:

- 1) Al final de la reacción permanecen inalteradas.
- 2) Requieren muy bajas cantidades de enzima para catalizar la reacción.
- 3) Aumentan la velocidad de reacción pero sin alterar la constante de equilibrio de ésta, en su lugar, disminuyen la energía de activación (García-Bermejo & Silva-García, 2004).

Se conoce como *sustratos* a los reactantes de las reacciones catalizadas por enzimas. Cada enzima es bastante específica en su comportamiento, actuando sobre un sustrato o sustratos en particular para producir un producto o productos particulares.

Muchas enzimas poseen en su estructura un componente no proteico llamado *cofactor* y en ausencia de este carecen de actividad catalítica. En este caso, el componente proteínico sin cofactor es conocido como *apoenzima* y la enzima con cofactor se conoce como *holoenzima*. Los cofactores pueden ser tanto moléculas orgánicas, denominados *coenzimas*, como iones metálicos (Palmer & Bonner, 2007). Los cofactores son necesarios para las apoenzimas, dado que proporcionan

grupos funcionales químicamente reactivos adicionales a aquellos presentes en la cadenas de aminoácidos de las apoenzimas (Stoker, 2015)

### **2.2.2. Actividad y especificidad enzimática**

A lo largo de los años los especialistas han demostrado que sólo una pequeña porción de la estructura enzimática participa en la interacción con el o los sustratos durante la reacción, dicha porción es conocida como *sitio activo*.

Existen dos modelos para explicar la unión de las enzimas a los sustratos, estos son:

#### a) Modelo de llave-cerradura

Este modelo propone que el sitio activo tiene una conformación geométrica fija y rígida, por lo que sólo sustratos con una geometría complementaria pueden unirse a dicho sitio.

#### b) Modelo de ajuste inducido

En este modelo se propone que las enzimas tienen flexibilidad en su conformación, de manera tal que el sitio activo puede modificar su forma y geometría para que su sustrato pueda unírsele (Berg, 2013).

Las fuerzas que atraen al sustrato al sitio activo son interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Por ejemplo, un grupo amino protonado (cargado positivamente) en un sustrato puede ser atraído por un residuo cargado negativamente (como aspartato o glutamato) en el sitio activo (Stoker, 2015).

Las enzimas muestran diferentes niveles de especificidad hacia sustratos. Esta especificidad es determinada por el sitio activo. Algunos sitios activos pueden actuar solamente en un compuesto en particular, mientras que otros pueden actuar en una “familia” de compuestos íntimamente relacionados, los tipos de especificidad enzimática incluyen:

- a) Especificidad absoluta: cuando la enzima es específica para un único sustrato
- b) Especificidad estereoquímica: cuando la enzima es capaz de diferenciar entre estereoisómeros, actuando sólo sobre una de las posibles configuraciones.
- c) Especificidad de grupo: cuando la enzima actúa sólo sobre un grupo funcional, de uno o varios sustratos.
- d) Especificidad de enlace; cuando la enzima actúa sobre un tipo particular de enlace, independientemente de las características estructurales alrededor del enlace (Simes & Brich, 2015).

### **2.2.3. Tipos de enzimas y sus usos**

Durante el siglo XIX no se disponía de una nomenclatura o clasificación sistemática para las enzimas, por lo que el nombre de cada una reflejaba vagamente diversas ideas, como muestra:

- a) Nombres nacidos de la mente del descubridor, por ejemplo: diastasa (separador, por separar dextrinas solubles a partir de almidón insoluble); Zwischenferment (enzima intermedia), Gelbferment (enzima amarilla) y otros que aún se utilizan, como la catalasa, pepsina y tripsina.
- b) Nombres que reflejan el género o especie biológica de procedencia, por ejemplo; ficina, un grupo de enzimas extraídas del género *Ficus*, o la papaína, procedente de la papaya.
- c) Nombres dados por el sustrato atacado y la adición del sufijo –asa, por ejemplo: ureasa, maltasa, tirosinasa (Battaner-Arias, 2013).

En 1961 la Comisión de enzimas (Enzyme Commission) propuso una clasificación de seis grupos basada en la naturaleza de la reacción catalizada (Tabla 1), a su vez cada grupo posee diferentes subgrupos en los cuales se encuentran las diferentes enzimas (International Union of Biochemistry and Molecular Biology & Webb, 1992).

**Tabla 1.** Clasificación enzimática de seis grupos basados en la reacción química catalizada.

<b>Clasificación</b>	<b>Descripción</b>
Oxidoreductasas	Oxidan y reducen sustratos por transferencia de hidrógeno o electrones o por adición de oxígeno
Transferasas	Remueven grupos químicos (distintos del hidrógeno) de un sustrato y lo transfieren a un sustrato aceptor (sin incluir al agua).
Hidrolasas	El agua es el segundo sustrato, participando en la ruptura de enlaces covalentes; por ejemplo, enlaces peptídicos en proteínas, enlaces glicosídicos en carbohidratos, enlaces éster en lípidos y enlaces fosfodiéster en ácidos nucleicos.
Liasas	Remueven grupos de sus sustratos (por un mecanismo diferente de la hidrólisis) para formar dobles enlaces en el producto, o que a la inversa pueden añadir grupos a dobles enlaces.
Isomerasas	Provocan rearrreglo de uno o más grupos en sustratos sin modificar la composición atómica del producto.
Ligasas	Catalizan el enlace covalente de dos moléculas, acoplado a la ruptura de un enlace pirofosfato como en ATP, UTP o CTP*.

\*ATP= Adenosín trifosfato, UTP= Uridina trifosfato y CTP= Citidina trifosfato

### 2.2.3.1. Proteasas

Son un subgrupo de las hidrolasas, catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas y péptidos.

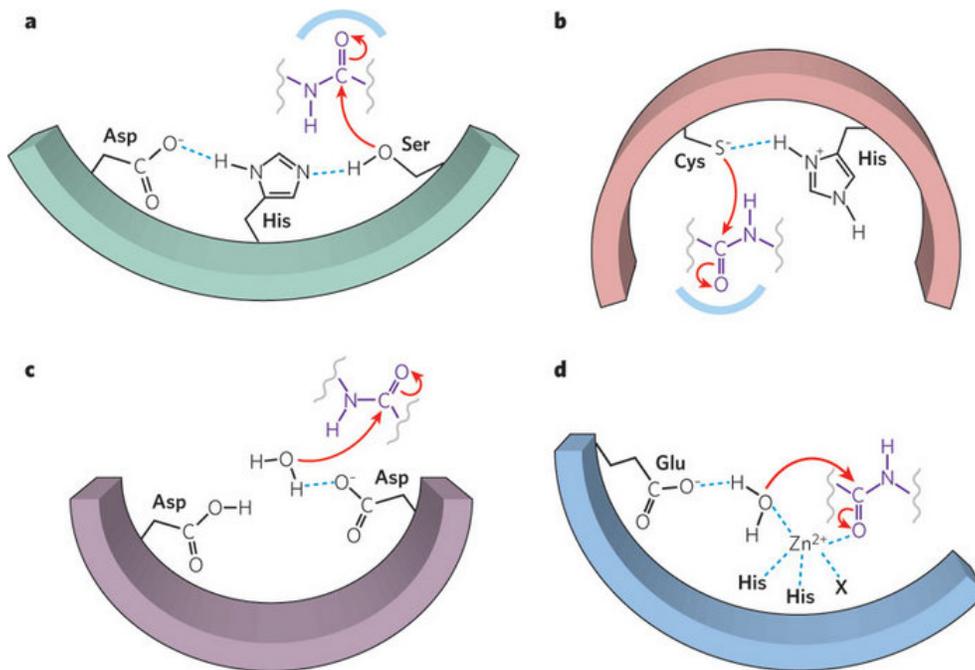
Se encuentran en todos los organismos vivos y son indispensables para la digestión de las proteínas de los alimentos transformándolas en péptidos o aminoácidos. Los aminoácidos son posteriormente utilizados para la síntesis de proteínas específicas para cada organismo (Whitaker, Voragen, & Wong, 2003).

Estas a su vez, se clasifican en endopeptidasas y exopeptidasas dependiendo de los tipos de enlaces peptídicos contra los que son más activas; las endopeptidasas rompen enlaces peptídicos del interior de la cadena polipeptídica, mientras que las exopeptidasas hidrolizan aminoácidos terminales (Hernández-Rodríguez & Sastre-Gallego, 1999).

**Tabla 2.** Clasificación de proteasas respecto a su mecanismo catalítico y sitio de actividad (Pandey, Webb, Soccol, & Larroche, 2006).

Exopeptidasas	Endopeptidasas
Aminopeptidasas	Serín-proteasas
Carboxipeptidasas	Cisteín-proteasas
Proteasas tipo serina	Aspartil-proteasas
Proteasas tipo cisteína	Metaloproteasas
Metaloproteasas	De mecanismo catalítico desconocido

Existe a su vez otro subgrupo de proteasas que se clasifican en función de sus mecanismos catalíticos (Tabla 2), en el caso de las serín- y cisteín-proteasas, el residuo epónimo se empareja usualmente con un grupo que retira protones para promover el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico, en el caso de las aspartil- y metaloproteasas estas activan una molécula de agua que sirve como nucleófilo, en lugar de usar un grupo funcional de la enzima (Fig. 1).



**Figura 1.** Mecanismos proteolíticos. a) Serín-proteasas, b) Cisteín-proteasas, c) aspartil-proteasas y d) metaloproteasas (Erez, Fass, & Bibi, 2009).

### 2.2.3.1.1. Bromelina

Las enzimas proteolíticas de la planta de piña (*Ananas comosus*) han sido conocidas como bromelinas. El nombre fue originalmente aplicado a cualquier proteasa de cualquier planta miembro de la familia *Bromeliaceae* (Heinicke, 1953).

En la actualidad se ha demostrado que la planta de piña contiene al menos cuatro cisteín-proteasas diferentes. Las más abundantes son la bromelina de tallo y la bromelina de fruta, cada una abundante en el componente que les da su nombre, las otras dos endopeptidasas son conocidas como anaina y comosaina y han sido detectadas solo en el tallo (Rowan, Buttle, & Barrett, 1990).

Si bien la bromelina está presente en el tallo, fruta, hojas y cáscara de la piña, únicamente el tallo y la fruta pueden producir grandes cantidades; para su producción industrial se prefiere utilizar el tallo debido a que es más barato que el fruto, ya que este último se comercializa para consumo humano (Nor, Ramli, Tuan, & Illias, 2016).

Para producir bromelina generalmente se procede de la siguiente manera: se muelen fragmentos ya sea del fruto o del tallo (dependiendo del tipo de bromelina que se desee obtener) para obtener como resultado el extracto enzimático crudo, posteriormente este se centrifuga y ultrafiltra para poder obtener la enzima purificada (Bhattacharyya, 2008).

Específicamente hablando de la bromelina de fruta, esta es una proteína de cadena única con un peso molecular de aproximadamente 23 kDa (Maurer, 2001).

### **2.3. Desarrollo analítico para determinar actividad enzimática**

Las enzimas intervienen en prácticamente todas las áreas involucradas en la tecnología de alimentos, por lo que es necesario:

- a) Aprender a caracterizar y utilizar enzimas exógenas para la producción de alimentos.
- b) Aprender a activar o inhibir, dependiendo del alimento, enzimas endógenas; por ejemplo tiaminasas que degradan Vitamina B1.
- c) Aprender a aprovechar la termoestabilidad de las enzimas para asociar su desactivación con tratamientos térmicos y emplearlas como parámetros de calidad, por ejemplo la fosfatasa alcalina presente en la leche es desactivada durante el proceso de pasteurización, por lo que si se detecta actividad residual es un indicador de una pasteurización deficiente.
- d) Aprovechar las enzimas como herramienta analítica (García-Bermejo & Silva-García, 2004; García-Garibay, Quintero-Ramírez, & López-Munguía-Canales, 2004).

La caracterización de enzimas está basada en cuantificar las propiedades clave de la catálisis enzimática, es decir: qué tan rápido procede la reacción en presencia de la enzima (velocidad de la reacción), qué tan bien se une la enzima a un sustrato en específico (especificidad de la enzima) y cuál es la eficiencia total de la catálisis para una reacción química determinada, lo cual se logra generalmente con mediciones de constantes cinéticas en estado estacionario (Copeland, 2001).

Leonor Michaelis y Maud Menten descubrieron en 1913 que la actividad enzimática depende decisivamente de condiciones definidas de temperatura, pH, naturaleza de los iones, concentración del sustrato y fuerza iónica; y por tanto los ensayos enzimáticos solo pueden ser comparados de manera confiable si dichas condiciones son estrictamente consideradas. Las enzimas presentan su actividad máxima en las condiciones óptimas de los factores mencionados, desviaciones de estas condiciones produce una disminución de la actividad dependiendo del grado de cambio, es decir, desviaciones moderadas producen una reducción pequeña de la actividad (Bisswanger, 2014).

### **2.3.1. Consideraciones generales para desarrollar un método enzimático**

Existen factores ajenos a la enzima *per se* que deben ser considerados en el ensayo, como:

- 1) Tiempo de monitoreo de la reacción.
- 2) El analito que se monitorea, si es posible cuantificar la producción de producto o la desaparición del sustrato, es importante considerar la estequiometría de la reacción para los cálculos correspondientes a la determinación de velocidad de la reacción
- 3) El sustrato y el producto deben diferenciarse en alguna propiedad observable para que pueda monitorearse la reacción.
- 4) Posibles factores de interferencia, por ejemplo, soluciones altamente turbias por la naturaleza del sistema pueden interferir en la exactitud de instrumentos y mediciones, mientras que factores como contaminaciones por aire, polvo, suciedad, etc. pueden ser evitadas con un buen manejo de las muestras (Bergmeyer, 1983).

### **2.3.2. Influencia del pH**

La actividad de las enzimas depende estrictamente del pH del medio. Esta dependencia se debe a dos aspectos: a) existen grupos cargados que están

involucrados en los mecanismos catalíticos y su estado de protonación es decisivo para la eficiencia catalítica, es decir el sitio activo y el sitio de unión del sustrato al sitio activo y b) las enzimas son sustancias anfotéricas con cargas positivas y negativas en su superficie y en su sitio activo, las cuales estabilizan la estructura nativa, por lo que condiciones extremas de pH pueden provocar modificaciones irreversibles de las estructuras terciaria o cuaternaria de la enzima (Herrera-Castillán et al., 2014).

Por otra parte, en caso de que los sustratos sufran modificaciones estructurales debidas al cambio de pH, la afinidad de la enzima se podría ver afectada y por ende su actividad, ocasionando cambios en los valores de las constantes cinéticas.

### **2.3.3. Influencia de la temperatura**

Dado que la velocidad y eficiencia de una reacción catalizada enzimáticamente es función de la frecuencia de colisión entre la enzima y el sustrato (o los sustratos), esta aumenta con la temperatura. Generalmente, la tasa de conversión enzimática aumenta al doble con un incremento de 10 °C. Esto es verdadero en un intervalo de 10-40°C. Las enzimas pueden ser activas también a temperaturas relativamente bajas (4 °C). Sobrepasando las temperaturas óptimas, las enzimas pueden ser desnaturalizadas, dicha temperatura es específica para cada enzima. En la industria el intervalo de temperatura óptima para una reacción enzimática específica es aquel al que la enzima es lo suficientemente estable para mantener su actividad durante el tiempo de duración que requiere el proceso en el que está involucrada (Uhlrig, 1998).

### **2.3.4. Estabilidad térmica**

La estabilidad térmica de las enzimas es muy variable. Algunas enzimas pierden su actividad catalítica a bajas temperaturas, mientras que otras resisten, aunque sea por un periodo corto de tiempo, un tratamiento térmico fuerte. En pocos casos la

estabilidad térmica es menor a temperaturas bajas que a temperaturas de rango medio (Berlitz, Grosch, & Schieberle, 2009).

En este sentido se pueden clasificar las enzimas por su resistencia al calor en tres grupos:

- a) Enzimas termolábiles (se desnaturalizan, y por consecuencia pierden su actividad, a temperaturas por debajo de 60 °C durante 30 min)
- b) Enzimas poco termorresistentes (se desnaturalizan a temperaturas por encima de 60 °C durante 30 min)
- c) Enzimas termorresistentes (se desnaturalizan a temperaturas por encima de 90 °C) (Lacasa, 2003).

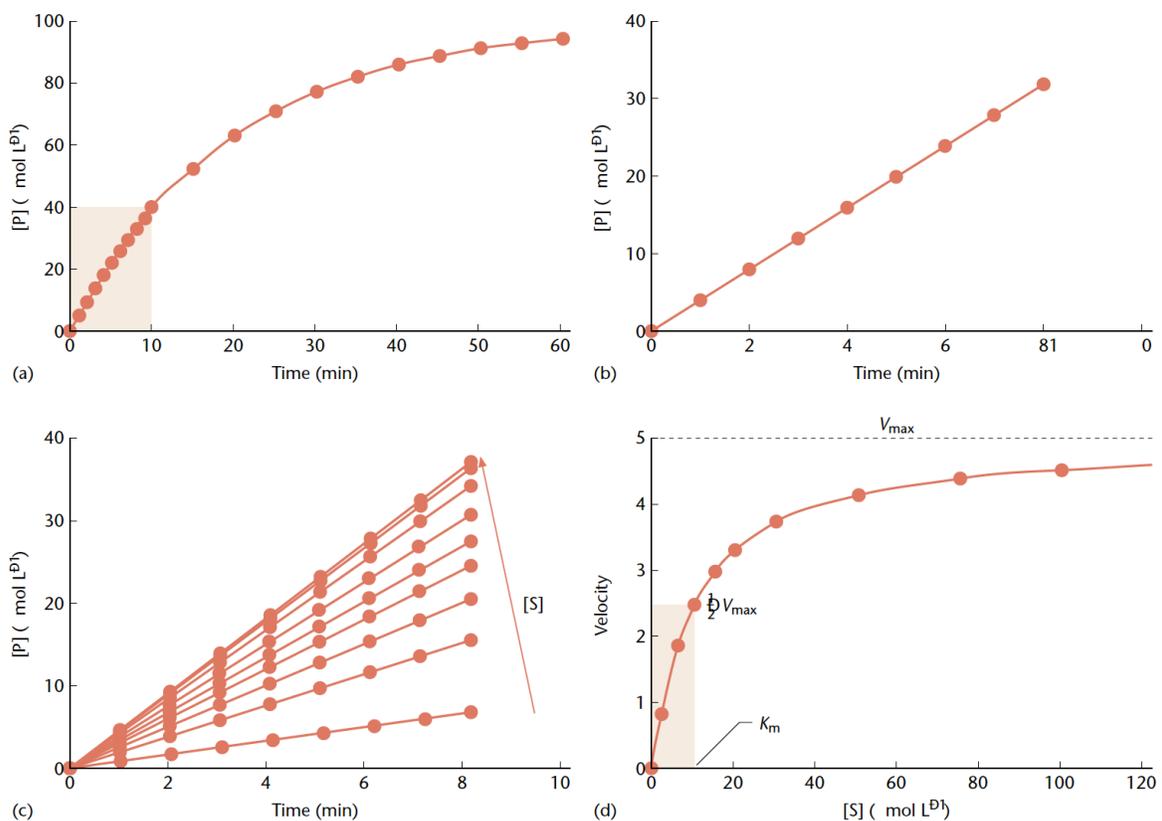
Las enzimas al ser incubadas a altas temperaturas se desnaturalizan en un proceso dependiente de tiempo, el cual usualmente sigue una cinética exponencial de primer orden; solo a bajas y moderadas temperaturas (tomando en cuenta la clasificación anterior) las enzimas pueden ser estables. Dicho comportamiento puede ser demostrado en un diagrama basado en la ecuación de Arrhenius. Algunas veces se observan desviaciones de la linealidad de estos gráficos incluso a rangos de temperatura bajos (estables), debido a transiciones entre diferentes configuraciones activas de la enzima. Por lo cual no se recomienda utilizar la actividad térmica máxima como temperatura de ensayo, en su lugar se debe tomar una temperatura dentro del intervalo de estabilidad. Las temperaturas comúnmente utilizadas para los ensayos son 25, 30 y 37 °C (Bisswanger, 2011).

Un caso particular en cuanto a la disminución de la actividad catalítica se presenta en las enzimas proteolíticas, ya que por su misma naturaleza y mecanismo de acción, estas presentan actividad autodegradativa.

### **2.3.5. Parámetros cinéticos Michaelis-Menten**

Otro de los factores que afectan la velocidad de la reacción es la concentración del sustrato presente [S]. Sin embargo, el estudio de este efecto es complicado, ya que

la [S] cambia durante el transcurso de una reacción *in vitro* a medida que se forma el producto. Con el fin de simplificar dichos experimentos, como se muestra en la Fig. 2, se realiza una aproximación, que consiste en medir la velocidad inicial ( $V_0$ ), a continuación puede explorarse el efecto de la variación de [S] sobre  $V_0$  manteniendo constante la concentración de la enzima, a mayores concentraciones de sustrato  $V_0$  aumenta cada vez menos, hasta llegar a una meseta, conocida como velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ). La concentración de sustrato a la cual se obtiene  $\frac{1}{2}$  de  $V_{m\acute{a}x}$  se le conoce como la constante de Michaelis ( $K_m$ ) (Nelson & Cox, 2009).



**Figura 2.** Determinación gráfica de constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ . La producción de producto a través del tiempo en una reacción catalizada enzimáticamente sigue una cinética de pseudo primer orden (a), disminuyendo conforme el sustrato se va agotando. El área sombreada en (a) mostrada en escala expandida en (b) permite determinar la  $V_0$ , siendo esta la pendiente de la recta, dicha velocidad medida con incrementos de la concentración inicial de sustrato muestra valores similares a concentraciones de sustrato altas (c), al graficar las  $V_0$  como función de la concentración inicial del sustrato (d) se pueden determinar los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  (Copeland, 2001).

Existen otras constantes que pueden obtenerse a partir de dichos experimentos, estas son: la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) o número de recambio, que representa el máximo número de moléculas de sustrato que son convertidas en producto por centro activo y por unidad de tiempo, dicho valor se obtiene al dividir  $V_{m\acute{a}x}$  entre la concentración inicial de la enzima  $[E_0]$ ; y la constante de especificidad ( $k_s$ ), la cual permite comparar el grado de discriminación de una enzima por sustratos diferentes que pueden competir, se obtiene al dividir  $k_{cat}/K_m$  o bien  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  (Bañó, Peretó, Sendra, & Pamblanco, 2007).

### **2.3.6. Ensayos continuos y discontinuos**

En un ensayo continuo, el progreso de la reacción es monitoreado directamente y almacenado. Esto es posible únicamente cuando existen cambios en la concentración, ya sea del producto o del sustrato, que puedan ser monitoreados en tiempo real. En un ensayo discontinuo, o de punto final, la reacción es detenida después de un intervalo de tiempo y el producto es medido con una segunda reacción específica. Para hacer esto se necesita hacer la reacción de igual manera a tiempo cero (Rogers & Gibon, 2009).

### **2.3.7. Técnicas de cuantificación**

#### **2.3.7.1. Métodos espectroscópicos**

##### **2.3.7.1.1. Fotometría de absorción (UV/Vis)**

Es el método espectroscópico más utilizado, permite realizar ensayos continuos y es de costo relativamente bajo, debido a que la mayoría de los laboratorios cuentan con espectrómetros de este tipo. Sin embargo su sensibilidad y selectividad es limitada. Dado que las diferencias químicas entre los sustratos de las enzimas y sus productos generalmente son pequeñas, la mayoría no pueden ser diferenciadas por

esta técnica, pero debido a lo conveniente de su uso, los ensayos son generalmente modificados para hacerlos accesibles a dicha técnica (Cantor & Schimmel, 1980).

#### **2.3.7.1.2. Fotometría de fluorescencia**

Dicha técnica es más sensible comparada con la fotometría UV/Vis, dado que pocas sustancias presentan el fenómeno de emisión de luz (fluoróforos), generalmente son aquellas con estructuras conjugadas, aromáticas o heterocíclicas. (Dewey, 1991).

#### **2.3.7.1.3. Luminometría**

Ésta técnica basada en la reacción de la luciferasa, permite la cuantificación de reacciones dependientes de ATP, al producir luz, esta puede leerse a  $\lambda = 562 \text{ nm}$  (Fan & Wood, 2007).

#### **2.3.7.2. Métodos electroquímicos**

La amperometría es una técnica que consiste en la determinación de corrientes eléctricas con el uso de electrodos recubiertos de enzimas que catalizan reacciones productoras de iones (Kappes & Hauser, 2000).

#### **2.3.7.3. Marcaje con compuestos radiactivos**

Pueden ser utilizados para ensayos con enzimas que escinden nucleósidos trifosfato, como ATP y GTP, marcados con  $^{32}\text{P}$ . Otra aplicación es la liberación de  $\text{CO}_2$ , en la cual el carbono respectivo del sustrato es marcado con  $^{14}\text{C}$  (Bisswanger, 2011).

#### **2.3.7.4. Técnicas diversas**

##### **2.3.7.4.1. Cromatografía**

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) acoplada a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) permite separar al producto del sustrato y por tanto determinar la actividad de la enzima, los ensayos pueden realizarse *offline*, en los cuales la mezcla de la reacción se encuentra antes de la columna; y *online*, en donde la enzima se encuentra inmovilizada en la columna, funcionando esta no solo para separar los componentes, sino como micro- o nano- reactor (Fayad, Morin, & Nehmé, 2017).

#### **2.3.7.4.2. Calorimetría**

Finalmente, el curso de la reacción puede seguirse midiendo la temperatura de la reacción con un calorímetro. Las reacciones pueden ser tanto endotérmicas como exotérmicas y en ambos casos estos cambios de temperatura pueden ser detectados (Bisswanger, 2011).

#### **2.3.8. Diálisis.**

La diálisis es el fenómeno en el cual tiene lugar la difusión fraccionada de diferentes solutos desde un lado a otro de una membrana semipermeable bajo un gradiente de concentración (Brown & Sallee, 1977). Se utiliza como un método de separación principalmente en la clínica, en donde se hace pasar sangre por una membrana, a través de la cual difunden las moléculas pequeñas de productos de residuos metabólicos, y se diluyen en un gran volumen de líquido que se desecha (Harris, 2007).

#### **2.3.9. Ensayos propuestos para determinar actividad catalítica de bromelina.**

En la Tabla 3. se resumen algunos de los ensayos utilizados para determinar la actividad de bromelina. Los sustratos utilizados para el ensayo pueden ser naturales o sintéticos, los primeros pudiendo ser aislados de productos naturales, mientras que los segundos son elaborados con el fin de que la enzima tenga alta afinidad a ellos.

**Tabla 3.** Ensayos reportados para determinar actividad proteolítica de bromelina.

Ensayo	Sustrato	Tipo de ensayo	Técnica de cuantificación	Fuente
Caseína	Natural	Discontinuo	Espectrometría UV	(Balls, Thompson, & Kies, 1941)
Hemoglobina	Natural	Discontinuo	Espectrometría UV	(Murachi & Neurath, 1960)
Gelatina	Natural	Discontinuo	Titulación	(Moodie, 2001)
Z-Arg-Arg-NHMec	Sintético	Discontinuo	Espectrometría de fluorescencia	(Rowan <i>et al.</i> , 1990)
Z-Arg-Arg-NHPhNO <sub>2</sub>	Sintético	Discontinuo	Espectrometría Vis	(Rowan & Buttle, 1994)
Azocoll /Azocaseín	Sintético	Discontinuo	Espectrometría Vis	(Peek, Daniel, Monk, Parker, & Coolbear, 1992)

En los ensayos proteolíticos no solo el sustrato y el producto son de naturaleza proteica, sino también la enzima (en este caso, bromelina). Por lo tanto una medición directa no es viable, ya que la bromelina y el sustrato podrían interferir en la señal generada por el producto si se encuentran en la misma matriz de análisis, por lo cual, los métodos utilizados en la actualidad requieren de sustratos modificados, o bien de métodos que demandan mucho tiempo para aislar el producto y así este poder ser cuantificado.

#### **2.4 Aplicación de las enzimas proteolíticas en la industria**

Las enzimas pueden ser utilizadas en la industria alimentaria como una alternativa eficiente, segura y amigable con el ambiente para el procesamiento de alimentos. En 2017 el mercado industrial de enzimas fue valuado en 6.1 mil millones de dólares y se espera que alcance los 8.5 mil millones para el 2022 (Zhang, He, & Simpson, 2018).

La mayoría de las reacciones enzimáticas industriales son de hidrólisis, pues estas en su mayoría no requieren de cofactores (cuando los requieren son de naturaleza metálica), en comparación con las reacciones de síntesis, las cuales siguen siendo no viables fuera de la célula, ante la dificultad económica de producir y regenerar cofactores (García-Garibay *et al.*, 2004).

Dentro de la industria alimentaria existe una gran variedad de aplicaciones que se les puede dar a las diversas enzimas proteolíticas como se puede ver en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Aplicaciones de proteasas en la industria alimentaria y tecnológica. Tomado de (Bombara *et al.*, 1997; Uhlig, 1998; Whitaker *et al.*, 2003)

Producto o proceso	Uso	Enzimas
Cerveza	Para solubilizar proteínas de granos y así evitar turbidez	Papaína, Quimosina, Ficina
Queso	Para coagular proteínas de la leche y madurar el queso	Quimosina, Tripsina
Ablandadores cárnicos	Para separar parcialmente tejidos conectivos	Papaína, Bromelina y Ficina
Pan y Galletas	Para incrementar la elasticidad del gluten Para aumentar lo crujiente	Enzima neutra de <i>Aspergillus oryzae</i> , Proteasa ácida de <i>Aspergillus usamii</i>
Vinos	Clarificación	Ficina, Papaína
Alimentos para animales	Conversión de residuos en alimentos para animales. Auxiliares digestivos	Papaína, Bromelina y Ficina
Hidrolizados proteínicos	Condimentos como la salsa de soya y tamari. Sopas deshidratadas. Polvos de Gravy. Carnes procesadas. Dietas especiales. Suplementos alimenticios	Papaína, Bromelina y Ficina

#### **2.4.1. Hidrolizados proteicos como suplementos alimenticios**

De acuerdo con la Ley General de Salud, son suplementos alimenticios aquellos productos a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no, de vitaminas o minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir alguno de sus componentes. Las formas farmacéuticas aceptadas para este tipo de producto, son aquellas que se ingieren por vía oral como: cápsulas, emulsiones, suspensiones, jarabes, polvos, soluciones y tabletas, entre otras contempladas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. No se permiten formas propias de otras categorías de productos como: confitería (caramelos, paletas, chicles), parches, solución inyectable, entre otras (Comisión Nacional de Protección Social en Salud, 2018).

#### **2.4.2. Caso Colagenart®**

Colagenart® es un hidrolizado de bajo peso molecular de colágena, que es considerado suplemento alimenticio, se ha reportado que su consumo ayuda a preservar huesos y articulaciones, a diferencia del colágeno, el hidrolizado es altamente soluble en agua. Su producción consta de dos pasos: a) obtención de fracciones solubles mediante catálisis enzimática por la enzima bromelina y b) separación de los fragmentos de bajo peso molecular usando membranas de filtración.

Debido a que dicho producto tiene como intención beneficios en la salud, es necesario que el control de calidad garantice que el proceso se realiza mediante buenas prácticas de manufactura (GMP por sus siglas en inglés).

En la actualidad la calidad del producto final se asegura mediante ensayos de solubilidad y de tamaño de péptidos mediante Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC por sus siglas en inglés). Sin embargo se desea desarrollar un

método que permita predecir la calidad del producto al evaluar la actividad de la enzima bromelina previamente a su exposición con el colágeno, para lo cuál el presente documento pretende ofrecer una solución a dicha necesidad mediante un método de determinación de actividad hidrolítica práctico.

### **3. Hipótesis**

Una membrana de diálisis puede separar los productos formados de la reacción de hidrólisis de gelatina catalizada por bromelina, lo que permitirá que los mismos puedan ser medidos de manera directa por espectrofotometría UV.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Objetivo general**

Desarrollar un método para determinar actividad proteolítica de la enzima bromelina utilizando gelatina como sustrato, de manera tal que pueda funcionar como método alternativo de caracterización enzimática para su uso en la industria alimenticia.

#### **4.2. Objetivos particulares**

- a) Desarrollar un método para la separación de los productos de la reacción de la bromelina.
- b) Determinar los parámetros cinéticos de la enzima bromelina utilizando gelatina como sustrato, en las condiciones utilizadas durante el proceso de fabricación de Colagenart®.
- c) Determinar el pH de actividad óptima de la bromelina utilizando gelatina como sustrato.
- d) Determinar la termoestabilidad de la bromelina a 37 °C.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Determinación del intervalo de solubilidad de la gelatina<sup>1</sup>**

Se prepararon soluciones de gelatina de origen porcino y de grado alimenticio en solución amortiguadora de citratos 10 mM pH 4.5 con las siguientes concentraciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 mg/mL, para que la gelatina solubilizara fue necesario calentar las muestras en baño maría, posteriormente estas se dejaron reposar a temperatura ambiente por 2 h y se identificó la concentración a partir de la cual se observaba gelificación (aquellas que estuvieran sólidas).

### **5.2. Determinación de condiciones experimentales**

#### **5.2.1. Curva de calibración de gelatina grado alimenticio<sup>2</sup>**

Partiendo de la concentración de 5 mg/mL se realizaron diluciones seriadas 1:1 hasta llegar a la concentración de 0.0195 mg/mL, se utilizó solución amortiguadora de citratos 10 mM pH 4.5 como medio de dilución y blanco. Las muestras se leyeron a  $\lambda=280$  nm en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA) y se analizaron con el software Gen5. Se realizó triplicado de la curva.

#### **5.2.2. Curva de calibración de gelatina grado USP<sup>2</sup>**

Utilizando solución amortiguadora de citratos 10 mM pH 4.5 como medio de dilución y blanco se realizó la curva partiendo de la concentración de 10 mg/mL de gelatina y con diluciones seriadas 1:1 hasta llegar a la concentración de 0.0097 mg/mL. Las muestras se leyeron a  $\lambda=214$  nm en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA) y se analizaron con el software Gen5, la curva se realizó por triplicado.

---

<sup>1</sup> En el presente documento se utilizará de manera indistinta el término colágeno y gelatina.

<sup>2</sup> Por cuestiones de privacidad la institución en la que se llevó a cabo la investigación se reserva el derecho de mencionar las marcas de gelatina utilizadas.

Con el fin de evaluar la influencia del pH en la actividad de la bromelina sobre la gelatina como sustrato, se realizaron curvas de calibración con gelatina en diferentes medios, el procedimiento fue el siguiente: partiendo de una concentración de gelatina 4 mg/mL se realizó una dilución para obtener una concentración de gelatina de 0.125 mg/mL y posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:1 hasta llegar a la concentración de gelatina de 0.0039 mg/mL, se utilizó la solución amortiguadora correspondiente a una concentración 10 mM, como medio de dilución y blanco, ver Tabla 5. Las muestras se leyeron a  $\lambda=214$  nm en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA) y se analizaron con el software Gen5, las curvas se realizaron por triplicado.

**Tabla 5.** Soluciones amortiguadoras usadas para las curvas de calibración de gelatina grado USP

Solución amortiguadora	pH
Citratos (J.T. Baker, México)	3.0
	4.0
	4.5
	5.0
	6.0
Fosfatos (J.T. Baker, México)	6.0
	7.0
	8.0
Boratos (Sigma-Aldrich, Francia)	8.0
	9.0
	10.0

### 5.2.3. Concentración de la enzima

La enzima Bromelina fue proporcionada por la UDIBI, obtenida a partir de la fruta de *Ananas comosus* y purificada por un método de ultrafiltración.

Se determinó la concentración de la enzima leyendo su absorbancia a  $\lambda=280$  nm en un espectrofotómetro EPOCH utilizando solución amortiguadora de fosfatos 10mM como blanco.

### **5.3. Optimización de la metodología para la determinación de la actividad de bromelina.**

Se prepararon las siguientes soluciones:

#### a) Soluciones amortiguadoras

Se prepararon las soluciones amortiguadoras con las sales y valores de pH mencionados en la Tabla 5 a una concentración de 10 mM.

#### b) Soluciones de gelatina

Se prepararon 4 soluciones stock de gelatina grado alimenticio a una concentración de 20 mg/mL en solución amortiguadora de citratos [10 mM] pH 4.5.

En el caso de la gelatina grado USP, se prepararon de igual manera 4 soluciones stock a una concentración de 20 mg/mL en este caso en cada uno de los buffers indicados en la Tabla 5.

#### c) Dilución de soluciones stock de gelatina grado alimenticio

Partiendo de las soluciones stock de gelatina grado alimenticio 20 mg/mL en solución amortiguadora de citratos [10 mM] pH 4.5 y utilizando la solución amortiguadora como medio de dilución, se prepararon soluciones con las concentraciones de 10 mg/mL.

#### d) Dilución de soluciones stock de gelatina grado USP

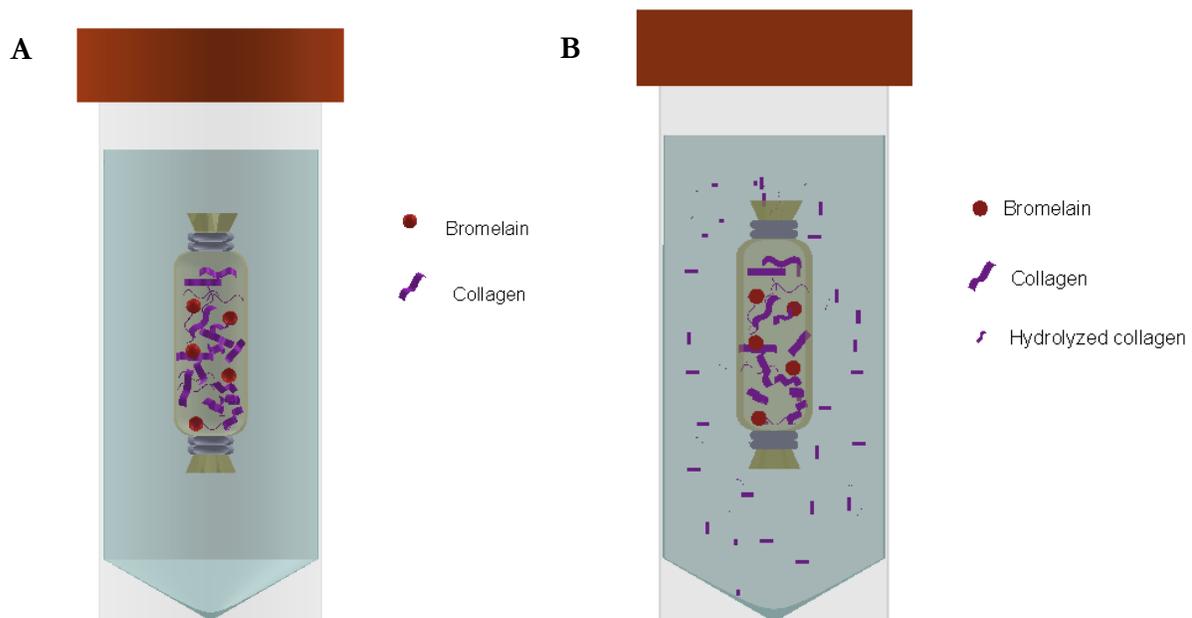
Partiendo de las soluciones stock de gelatina grado USP 20 mg/mL en solución amortiguadora de citratos [10 mM] pH 4.5 y utilizando la solución amortiguadora como medio de dilución, se prepararon soluciones con las concentraciones de 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3.0 mg/mL, 4.0 mg/mL, 6.0 mg/mL, 8.0 mg/mL y 10 mg/mL.

#### e) Dilución de soluciones stock de gelatina grado USP

Partiendo de las soluciones stock de gelatina grado USP 20 mg/mL en las diferentes soluciones amortiguadoras [10 mM] y utilizando la solución amortiguadora como medio de dilución, se prepararon soluciones con la

concentración de 4.0 mg/mL con cada uno de los buffers de la Tabla 5, con excepción del buffer de citratos pH 4.5.

En la Figura 3 se muestra de manera gráfica un sistema de diálisis utilizado para medir la actividad de la enzima bromelina.



**Figura 3. Sistema de diálisis.** Se muestra al interior de la membrana el sustrato (colágeno) en morado y la enzima (bromelina) en rojo y al exterior la solución amortiguadora. La figura A ejemplifica el sistema a tiempo 0, mientras que la figura B muestra el sistema minutos después de iniciado el análisis, en cuyo caso el hidrolizado de colágeno (figuras pequeñas de color morado) se encuentra en la solución amortiguadora fuera de la membrana.

Para optimizar el método de determinación de la velocidad de hidrólisis de la gelatina por la enzima bromelina se siguieron los siguientes pasos en común (Para conocer las condiciones exactas de cada ensayo véase la Tabla 6):

1. En el espectrofotómetro EPOCH medir la absorbancia de la solución amortiguadora a utilizar y marcarla como blanco.

2. Cortar e hidratar con agua la membrana de diálisis (CelluSep; peso molecular de corte: 12-14 kDa, Membrane filtration products, EE.UU.)
3. Cerrar por un extremo la membrana de diálisis.
4. Añadir la solución amortiguadora deseada en la que se realizará la diálisis en un tubo falcon de 50 mL.
5. Colocar la solución de sustrato dentro de la membrana de diálisis.
6. Añadir la enzima dentro de la membrana de diálisis. En el caso de los experimentos control, añadir en su lugar el volumen de solución amortiguadora equivalente al añadido de enzima.
7. Cerrar la membrana de diálisis.
8. Introducir la membrana en el medio del punto 3, comenzar a medir el tiempo de la reacción y tomar una alícuota de 200  $\mu$ L del medio.
9. Medir la absorbancia de la alícuota en el espectrofotómetro EPOCH.
10. Regresar la alícuota medida al sistema de diálisis
11. Incubar el sistema de reacción.
12. Tomar una alícuota del medio de reacción después de ocurrido el tiempo correspondiente al intervalo de muestreo deseado.
13. Repetir pasos 9 y 10 hasta que se concluya con el tiempo total de análisis.

### **5.3.1. Condiciones experimentales**

Modificando las variables mencionadas en la Tabla 6 se determinó la metodología para poder realizar la caracterización de la enzima bromelina.

**Tabla 6. Desarrollo Experimental.** En la primera columna se muestran las variables que fueron modificadas para establecer las condiciones del experimento, en las columnas posteriores se muestran los valores que tuvieron dichas variables.

Variable	Valor						
	Gelatina grado alimenticio				Gelatina grado USP		
Sustrato	A	B	C	D	E	F	G
Identificación de condición	A	B	C	D	E	F	G
Proporción de volumen enzima:sustrato <sup>3</sup>	1:2000	1:2000	1:100	1:10	1:100	1:100	1:100
Proporción de volumen medio de reacción:solución amortiguadora <sup>4</sup>	5:8	5:8	5:8	5:8	1:5	1:5	1:5
Agitación (rpm)	200	225	225	225	Sin agitación	225	225
Temperatura (°C)	37	37	37	37	25	37	37
Intervalo de muestreo (min)	10	5	5	5	5	5	5
Tiempo total de muestreo (min)	110	70	70	70	70	70	30
Longitud de onda, $\lambda$ (nm)	280	280	280	280	214	214	214
Concentración sustrato	10 mg/mL						

<sup>3</sup> Una proporción 1:2000 corresponde por ejemplo a 2.5  $\mu$ L en 5000  $\mu$ L, 1:100 a 50  $\mu$ L en 4950  $\mu$ L y 1:10 a 500  $\mu$ L en 4500  $\mu$ L, la concentración de la enzima previa a su adición es la misma en todos los casos (0.0102 mM).

<sup>4</sup> Una proporción 5:8 corresponde por ejemplo a 5 mL en 8 mL y 1:5 a 5 mL en 25 mL.

### **5.3.2. Cromatografía de exclusión molecular**

Los dializados obtenidos de los ensayos con condiciones C y D se evaluaron en cromatografía de ultra alta resolución (Acquity UPLC, Waters) , con una columna de exclusión por tamaño ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column, 125Å, 1.7  $\mu$ m, 4.6 mm X 150 mm, 1K - 80K, 1/pkg, se inyectaron 10  $\mu$ L de muestra utilizando solución amortiguadora de fosfatos 50 mM y NaCl 150 mM pH 6.8 como medio de elución a 30 °C, un tiempo de elución de 12 min., velocidad de flujo de 0.4 mL/min y detección UV a  $\lambda$ = 280 y 214 nm.

## **5.4. Caracterización de la enzima bromelina**

### **5.4.1. Determinación de parámetros cinéticos aparentes**

Se obtuvieron los valores de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y velocidad máxima de reacción ( $V_{m\acute{a}x}$ ) al graficar los datos de actividad enzimática a pH 4.5, a 37 °C, como función de la concentración del sustrato (gelatina), ver Tabla 7. Las lecturas se realizaron a  $\lambda$ = 214 nm cada 5 min en el espectrofotómetro EPOCH; la proporción de volumen medio de reacción:solución amortiguadora fue de 1:5, la proporción de volumen enzima:sustrato fue de 1:100 (concentración final de enzima= 0.00102 mM) y el tiempo total de muestreo fue de 30 min.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para el manejo de los datos, se restaron los valores del control a los valores de los ensayos con enzima; de igual manera, se multiplicó el valor de  $V_0$  por el factor de dilución.

El modelo fue ajustado con la herramienta Solver de Excel.

**Tabla 7.** Concentraciones de sustrato evaluadas para determinar los parámetros cinéticos aparentes.

Concentración de gelatina (mg/mL)	Proporción de bromelina:gelatina
0.5	1:100
1.0	
2.0	
2.5	
3.0	
4.0	
6.0	
8.0	
10.0	

#### 5.4.2. Efecto del pH en la actividad de proteasa

Se determinó la influencia del pH en la actividad enzimática de la bromelina (proporción enzima-sustrato 1:100 y de volumen medio de reacción:solución amortiguadora 1:5) con gelatina (4 mg/mL) como sustrato al realizar ensayos con tres soluciones amortiguadoras diferentes, los cuales fueron:

- Solución amortiguadora de citratos 10 mM para intervalo de pH de 3.0-6.0
- Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM para intervalo de pH de 6.0-8.0
- Solución amortiguadora de boratos 10 mM para intervalo de pH de 8.0-10.0

Las lecturas se realizaron a  $\lambda = 214$  nm en el espectrofotómetro EPOCH.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

La actividad enzimática relativa se graficó contra el pH.

#### 5.4.3. Estabilidad térmica

Se incubó a la enzima a pH 6 en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a 37 °C por 6 h, tomando alícuotas cada hora y congelando estas a -70 °C para su posterior análisis, utilizando en los sistemas de diálisis las siguientes condiciones: solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6, gelatina (4 mg/mL) como sustrato proporción enzima-sustrato 1:100 y proporción de volumen medio de reacción:solución amortiguadora 1:5.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

La actividad enzimática relativa se graficó contra el tiempo.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Solubilidad de gelatina

El método desarrollado se basó en el proceso de diálisis, para la obtención de los productos de la hidrólisis de gelatina, dado que el método requiere que los componentes se encuentren solubles, se determinó la concentración mínima en la que se observa gelificación, los resultados se muestran en la Tabla 8 , e indican que a una concentración superior a los 14 mg/mL de gelatina, ésta gelificaba, por lo cual para estandarizar las condiciones del método se buscó trabajar con una concentración cercana a la concentración de gelificación, la cual fue 10 mg/mL. A nivel industrial se llega a utilizar concentraciones de hasta 24 mg/mL al calentar la solución.

**Tabla 8. Solubilidad de gelatina.** Evaluada en solución amortiguadora de citratos pH 4.5 y a temperatura ambiente (25 °C), la gelificación se evaluó por inspección visual al agitar los tubos con las preparaciones, la baja movilidad implicaba que las muestras habían gelificado.

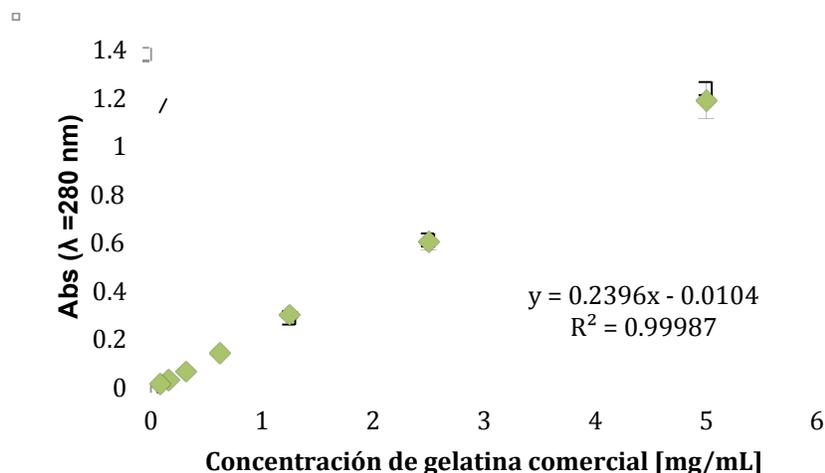
Concentración de gelatina (mg/mL)	2	4	6	8	10	12	14	16
Gelificación	No						Sí	

### 6.2 Curva de calibración de gelatina comercial

En la curva de calibración mostrada en la Fig. 4 aparece como concentración más baja de gelatina 0.0781 mg/mL, la cual corresponde a  $0.008 \pm 0.004$  unidades de absorbancia, las concentraciones de 0.0391 y 0.0195 mg/mL de gelatina no se pudieron cuantificar, ya que presentaron valores negativos de absorbancia, por su parte el valor más alto de concentración de gelatina corresponde a 5 mg/mL

correspondiente a  $1.2 \pm 0.069$  unidades de absorbancia, presentándose un comportamiento lineal entre la concentración de gelatina y la absorbancia en un intervalo de 0.0781 a 5 mg/mL de gelatina.

En relación a esto, el valor de  $R^2 > 0.99$  nos confirma que existe una relación directamente proporcional entre las variables y por lo tanto la curva puede ser utilizada para calcular las concentraciones de gelatina de las muestras experimentales.



**Figura 4. Curva de calibración de gelatina comercial.** La concentración de gelatina medida fue de 0.0781 mg/mL a 5 mg/mL, se utilizó solución amortiguadora de citratos 10 mM, pH 4.5 como medio de dilución y blanco. Los valores graficados corresponden al promedio de una serie de triplicados.

### 6.3 Diseño del método de cuantificación de la actividad de la enzima bromelina

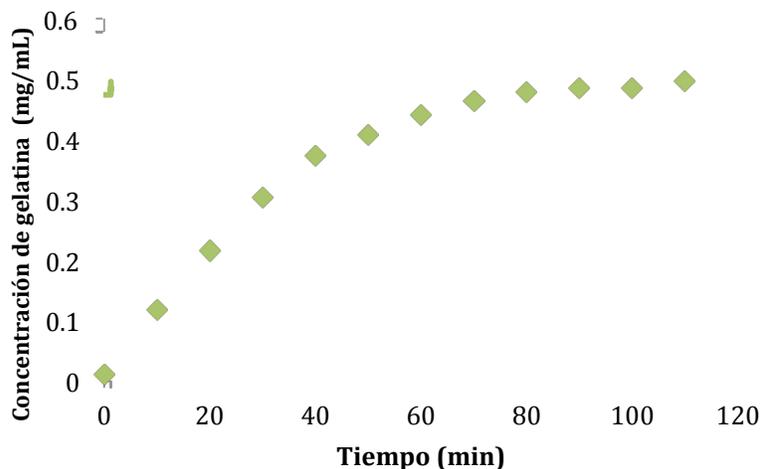
Para desarrollar el método de cuantificación, se partió de la idea de que la actividad proteolítica de la enzima bromelina genera productos de menor tamaño que el sustrato sobre el que actúa, por ejemplo, la gelatina, por lo tanto, si hay una barrera que permita separar los productos del sustrato y la enzima, entonces, los productos podrían ser cuantificados mediante espectrofotometría UV.

Como alternativas se pensaron dos opciones: en primer lugar separar los productos por HPLC-SEC, sin embargo Fayad et al. (2017) resumieron algunas de las

metodologías desarrolladas utilizando estos equipos, además laboratorios pequeños pueden carecer de los mismos debido a su alto costo; la segunda alternativa fue una membrana de diálisis con el tamaño de poro lo suficientemente pequeño para impedir que tanto la enzima como el sustrato la atravesen, pero a la vez lo suficientemente grande como para que los productos formados puedan atravesarla, metodología de la cual actualmente no se encuentran datos reportados con este fin y que además resulta muy asequible, y por lo tanto se optó por esta última opción.

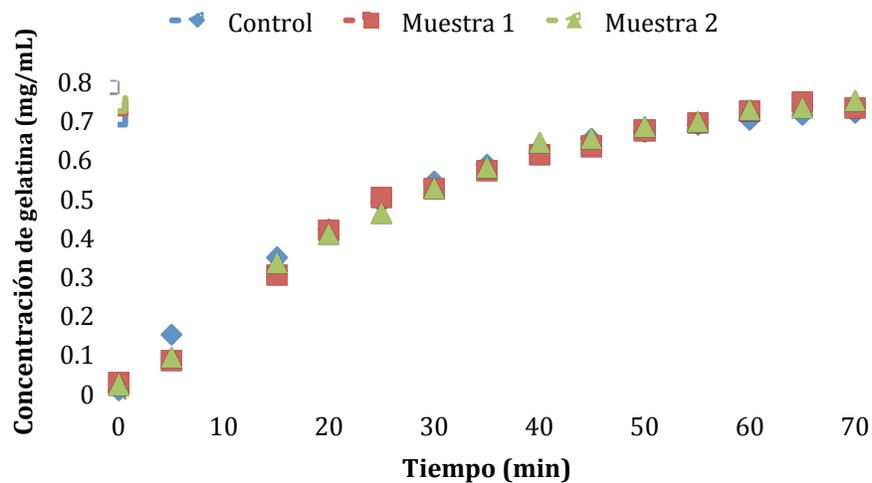
Por otra parte, debido a la facilidad para obtener la bromelina de fruta se optó por utilizarla en lugar de la bromelina de tallo.

El primer ensayo realizado con la gelatina comercial permitió determinar el tiempo total de muestreo, ya que como se muestra en la Fig. 5, después de 70 minutos de monitoreo de la reacción para la condición A el sistema de diálisis había llegado al equilibrio, lo cual es evidente al presentarse valores constantes de la concentración de hidrolizado de gelatina. Con el fin de determinar este valor de tiempo, el intervalo de muestreo fue de 10 min., pero con el fin de monitorear de mejor manera la reacción se decidió realizar los experimentos futuros con intervalos de tiempo de 5 min. La curva obtenida demostró que la reacción podía ser monitoreada conforme a lo planeado, es decir, sin un procesamiento adicional de la muestra para su medición.



**Figura 5. Curva de progreso de la reacción con condición A.** La condición A corresponde a una proporción de volumen de enzima-sustrato 1:2000, proporción de volumen de medio de reacción:solución amortiguadora 5:8, agitación a 200 rpm y 37 °C, el análisis fue continuo con mediciones cada 10 min. a  $\lambda = 280$  nm.

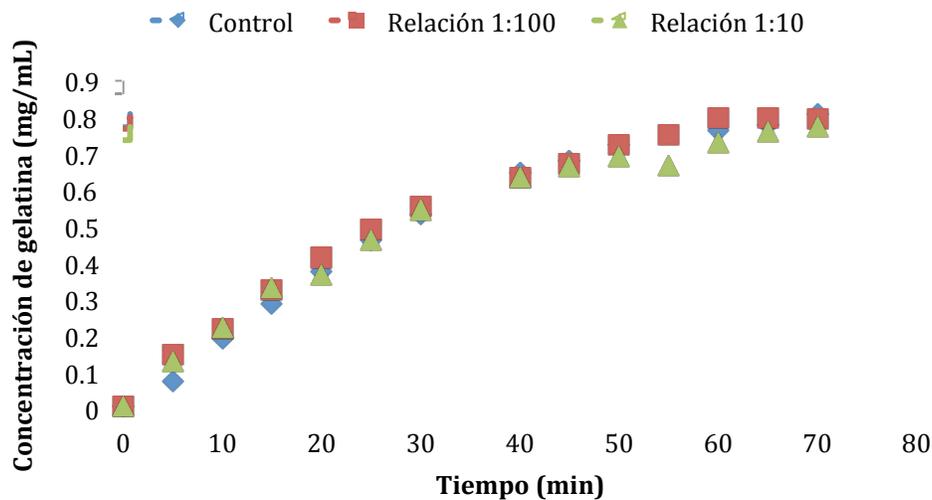
Con base en este resultado se realizó otra prueba, esta vez con un control sin enzima y dos muestras, como se observa en la Fig. 6, no hubo diferencia entre la curva control y aquellas con enzima. Dado a que los experimentos se realizaron bajo las mismas condiciones, se pensó que la concentración de la enzima era muy baja puesto que se había puesto una relación de 1:2000 de enzima:sustrato y por ello no se observaba diferencia alguna entre el control y la reacción catalizada enzimáticamente. Si bien en un punto las concentraciones de producto o sustrato en la solución amortiguadora podrían ser iguales para el control y las muestras con enzima (en el caso de que las moléculas del sustrato fueran de peso molecular menor al tamaño de corte de la membrana), se esperaba que al menos en los tiempos iniciales se pudiera observar una diferencia clara, que denotara la actividad de la enzima, por lo cual se optó por aumentar la cantidad de enzima utilizada.



**Figura 6. Curvas de progreso de la reacción con condiciones B.** La condición B corresponde a una proporción de volumen de enzima-sustrato 1:2000, proporción de volumen de medio de reacción:solución amortiguadora 5:8, agitación a 225 rpm y 37 °C, el análisis fue continuo con mediciones cada 5 min. a  $\lambda = 280$  nm.

El rango de tamaño de poro de la membrana usado era de 12-14 kDa y el rango de peso molecular reportado de la gelatina va de los 15 a los 100 kDa, por lo que se esperaba que la gelatina se mantuviera dentro de la membrana de diálisis (Benjakul & Kittiphattanabawon, 2018). La cantidad de gelatina detectada aún sin el uso de la enzima, véase Fig. 7, permite sugerir que la gelatina comercial tenga probablemente un peso molecular menor al reportado ocasionando que esta se encuentre en la solución exterior a la membrana de diálisis.

Entonces se tenía un problema con dicho sustrato, pues no permitía detectar la actividad de la bromelina, ya que el blanco impedía una adecuada comparación de la señal ocasionada por analitos permeados en comparación con las muestras tratadas con la enzima, por otra parte, la fuga del sustrato del interior de la membrana dejaba a la enzima sin molécula sobre la cual actuar.



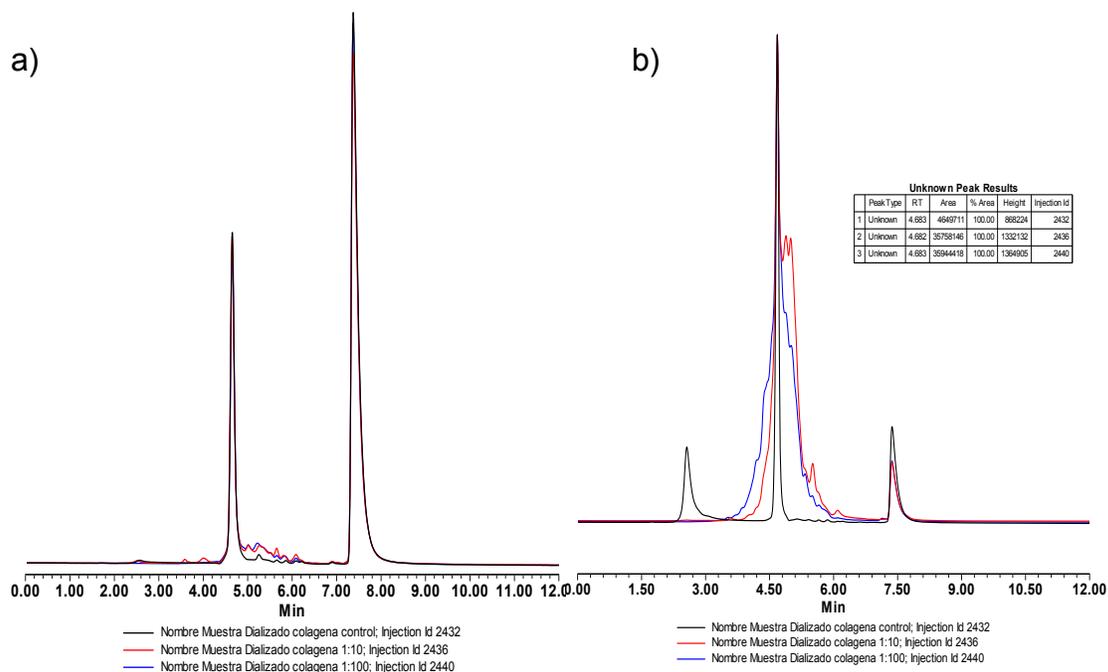
**Figura 7. Curvas progreso de la reacción con condiciones C y D.** La condición D corresponde a una proporción de volumen de enzima-sustrato 1:100, mientras que la condición E corresponde a una proporción 1:10, ambos con proporción de volumen de medio de reacción:solución amortiguadora 5:8, agitación a 225 rpm y 37 °C y el análisis fue continuo con mediciones cada 5 min. a  $\lambda = 280$  nm.

Como método alternativo de medición y con el fin de asegurar que la enzima estuviera realmente activa, el dializado fue sometido a una cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) acoplada a cromatografía de exclusión por tamaño, la cual se representa en la Fig. 8, la lectura a 280 nm muestra dos picos, los cuales no muestran diferencia significativa entre el control y las muestras tratadas, dado a que se analizó el contenido interno de la membrana, es posible que la señal de colágeno/ gelatina haya sido opacada por la presencia de la enzima bromelina en el caso de las muestras sometidas a catálisis.

Es sabido que la cantidad de proteína presente en una solución es cuantificable a 280 nm por un espectrómetro, esto se debe a la presencia de los aminoácidos tirosina, triptófano y en menor medida a la fenilalanina y a los puentes disulfuro (Aitken & Learmonth, 2002). Sin embargo, la molécula de colágeno es rica en prolina, glicina y alanina, pero deficiente en los aminoácidos que absorben a 280 nm, teniendo un total de 3 residuos de tirosina, 0 de triptófano y 14 de fenilalanina por cada 1000 residuos presentes en la molécula (Szpak, 2011).

Debido a lo anterior, se esperaría que la señal obtenida a 280 nm no proporcione el dato más preciso de la concentración real de la molécula de colágeno, por lo que se ha reportado que cuando se tienen concentraciones bajas, el intervalo de longitud de onda óptimo para leer las muestras de colágeno es de 202 a 220 nm, lo cual es usado para determinar enlaces peptídicos, mientras que a concentraciones altas se observan comportamientos fuera de la linealidad y es preciso medir a 280 nm (Na, 1988).

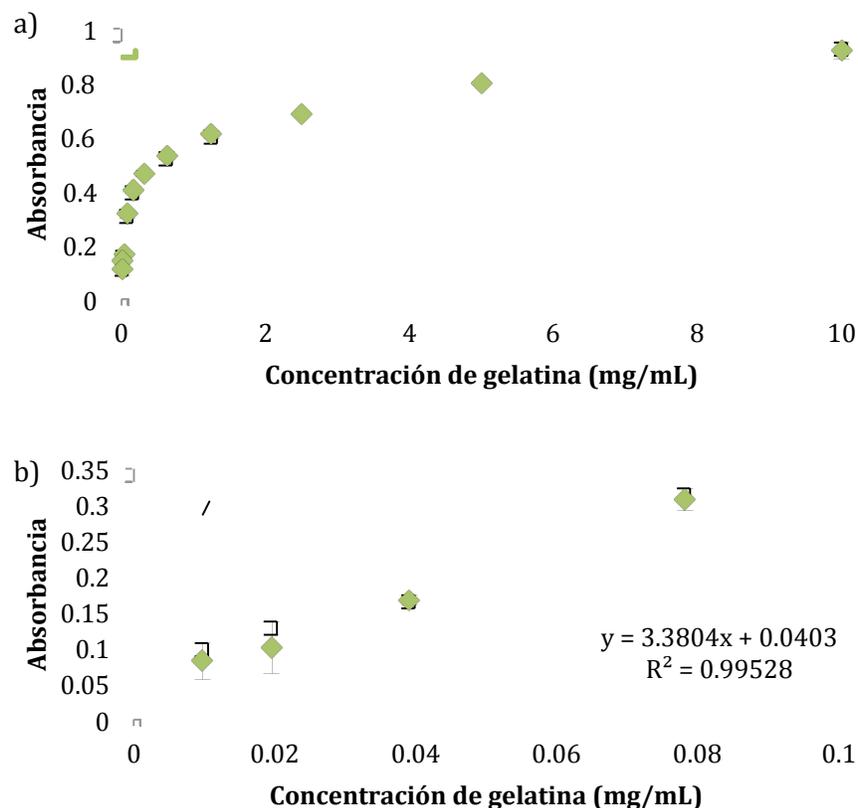
Las lecturas de las muestras con enzima a 214 nm, véase Fig. 8b líneas roja y azul, en las cuáles se observa en primer lugar, la eliminación del pico a los 2.5 min perteneciente a las moléculas de alto peso molecular en las muestras tratadas con ambas concentraciones de enzima, por su parte el pico a los 4.5 min para dichas muestras no se encuentra totalmente resuelto, siendo el de la muestra con proporción 1:10 (curva roja) enzima sustrato el que presenta moléculas de menor tamaño molecular como era de esperarse. Como en un análisis de actividad enzimática se busca utilizar la menor cantidad de enzima posible o una relación de la enzima con el sustrato en la que la concentración de sustrato sea alta, se decidió que la proporción 1:100 era suficiente para observar la actividad de la bromelina, esto es, modificación en la resolución del pico a los 4.5 min como se mencionó anteriormente. Con estos datos se concluyó de igual manera que la alta cantidad de moléculas de bajo peso molecular de la gelatina comercial impedía un monitoreo adecuado de la reacción, por lo que se optó por utilizar gelatina grado USP.



**Figura 8. Cromatogramas de dializado de gelatina.** a) Se muestra el cromatograma resultante al leer la muestras a  $\lambda = 280$  nm, mientras que b) corresponde a la lectura a  $\lambda = 214$  nm. En ambos cromatogramas la curva negra corresponde al control, la roja a la proporción 1:10 bromelina:gelatina y la azul a la proporción 1:100.

Por otra parte, el volumen de la solución amortiguadora en el sistema de diálisis era considerablemente bajo y por ello el sistema lograba llegar al equilibrio muy pronto, de manera tal que se optó por aumentar dicho volumen en los ensayos consecuentes.

Como se observa en la Fig. 9a y como Na lo reportó en 1988, a concentraciones altas de gelatina, esta presenta un comportamiento no lineal en relación a concentración de gelatina y absorbancia en su lectura a 214 nm, sin embargo como se muestra en la Fig. 9b a concentraciones bajas, su comportamiento es lineal y esto se confirma con el valor de  $R^2 > 0.99$ , por lo cual se utilizó el valor de la pendiente y de la ordenada al origen para calcular las concentraciones de las muestras utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos.

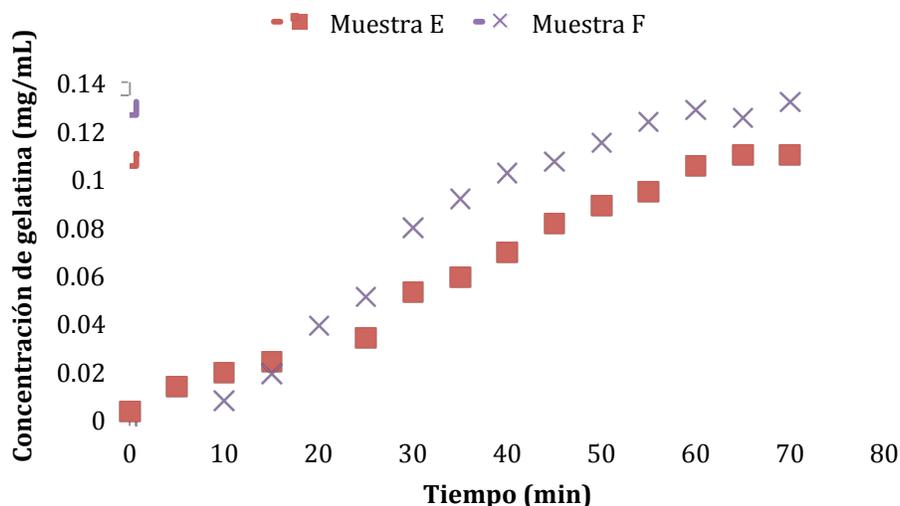


**Figura 9. Curva de calibración gelatina grado USP.** En la curva superior a) se muestra los valores obtenidos en el intervalo de 0.0097 a 10 mg/mL, mientras que en la curva b) se muestra el intervalo de 0.0097 a 0.0781mg/mL. Ambas curvas se llevaron a cabo en solución amortiguadora de citratos 10 mM pH 4.5, las muestras se leyeron a  $\lambda = 214$  nm y los resultados corresponden al promedio de triplicados.

Con el fin de determinar la influencia de la agitación y la temperatura del medio de reacción se probaron las condiciones E y F, como se ve en la Fig. 10, dichos factores aumentan la permeabilidad del producto, es decir, su paso a través de la membrana de diálisis, las condiciones fueron evaluadas de esa manera para determinar si el ensayo era mejor realizarlo con ayuda de un equipo de incubación (condición F) o a condiciones ambiente y con la agitación del medio antes de tomar la muestra a medir (condición E), ya que la respuesta con la condición F logró una mayor cantidad de producto fuera de la membrana en menor tiempo se optó por incubar las muestras como parte de la metodología.

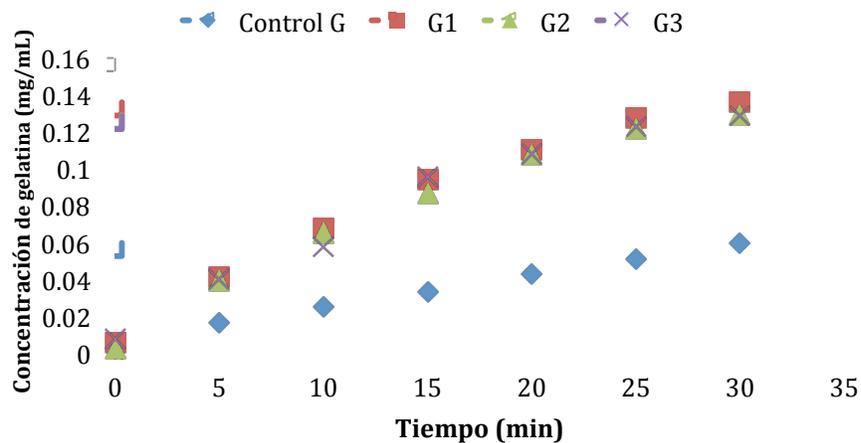
Por otra parte, dado a que a posterior a los 30 minutos de monitoreo, los valores de absorbancia se encontraban por encima del límite superior de linealidad obtenido de

la curva de calibración (valores no mostrados), se decidió monitorear la reacción hasta los 30 min.



**Figura 10. Curvas de progreso de la reacción con condiciones E y F.** La condición E carece de agitación y se evaluó a 25 °C mientras que la condición F tuvo agitación a 225 rpm y 37 °C, ambas corresponden a una proporción volumen enzima:sustrato 1:100, proporción volumen de medio de reacción:solución amortiguadora 1:5 y el análisis fue continuo con mediciones cada 5 min. a  $\lambda = 214$  nm.

En la Fig. 11 se puede apreciar que el control tuvo lecturas de proteína permeada menores a las que se observaron con las muestras que contenían a la enzima, por lo que con dichas condiciones fue factible observar la actividad proteolítica de la bromelina. Como se mencionó en la metodología, la presencia de partículas de bajo peso molecular fue considerada para el tratamiento de los datos y en los ensayos consecuentes los valores obtenidos de la curva control fueron restados a los valores obtenidos de las muestras experimentales.



**Figura 11. Curvas de progreso de la reacción con condiciones G.** Para la condición G la agitación fue a 225 rpm, incubación a 37 °C, proporción volumen enzima:sustrato 1:100, proporción volumen de medio de reacción:solución amortiguadora 1:5 y el análisis fue continuo con mediciones cada 5 min. a  $\lambda = 214$  nm. Las curvas G1 a G3 representan triplicados.

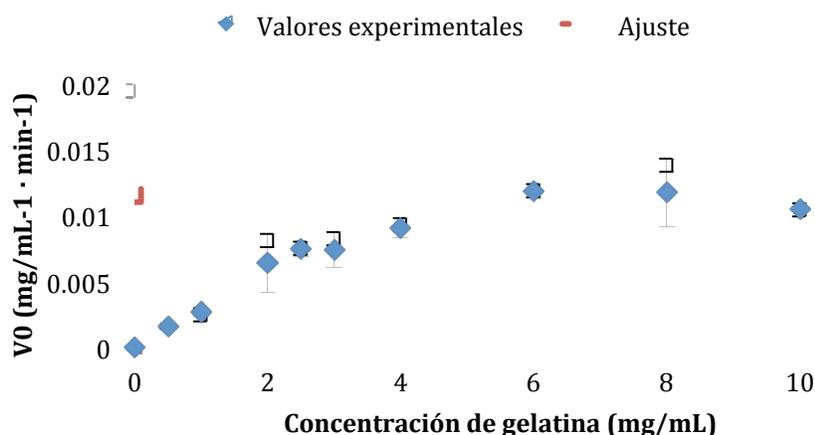
#### 6.4 Determinación de parámetros cinéticos aparentes

Se calcularon los parámetros cinéticos de la bromelina a partir de los resultados expuestos en la Fig. 12 (curva de Michaelis-Menten), donde se puede ver que a partir de la concentración de bromelina de 6 mg/mL, la enzima alcanza la saturación.

Se obtuvieron los valores mostrados en la Tabla 9 considerando un peso molecular de la gelatina de 20 kDa y 0.00102 mM como concentración de la enzima al inicio del ensayo. Adicionalmente los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  se pueden también representar como 3.236 mg/mL y 0.016 mg/(mL•min), respectivamente.

En la actualidad el método más usado para medir la actividad de enzimas proteolíticas usando gelatina como sustrato es el propuesto por Enzyme Development Corporation, el cual está basado en la valoración volumétrica del nitrógeno amino libre producido durante la reacción de hidrólisis. Para reportar los resultados de la  $V_{m\acute{a}x}$  se recomienda utilizar las unidades de digestión de gelatina

(GDU, por sus siglas en inglés), en donde 1 GDU= la cantidad de enzima que puede liberar, después de 20 minutos de digestión a 45 °C, 1 mg de nitrógeno amino de una solución estándar de gelatina a pH 4.5 o 5.5 (Moodie, 2001).



**Figura 12. Curva cinética de hidrólisis de gelatina por la enzima bromelina a pH 4.5 y 37 °C.** Las demás condiciones del ensayo corresponden a las establecidas previamente en el método, es decir, agitación a 225 rpm, proporción volumen enzima:sustrato 1:100, proporción volumen de medio de reacción:solución amortiguadora 1:5, el análisis fue continuo con mediciones cada 5 min. a  $\lambda = 214$  nm. Se utilizó un intervalo de concentración de gelatina de 0.5 a 10 mg/mL, los puntos negros representan los valores empíricos, mientras que los grises los valores del modelo ajustado, cada valor representa el promedio de una serie de triplicados.

Un estudio realizado por Kadiri (2016) utilizando el método antes mencionado y bromelina de tallo de *Billbergia pyramidalis* (Sims) Lindl reportó el valor de  $K_m = 13.07$  mg/mL (0.6535 mM, considerando 20 kDa como peso molecular de la gelatina) y  $V_{m\acute{a}x} = 71.94$  U/mg/min; mientras que un estudio utilizando el extracto crudo de bromelina de fruta de *Ananas comosus* realizado por Kaur (2014) reportó el valor de  $K_m = 28.6$  mM y  $V_{m\acute{a}x} = 3333.3$  GDU/g (Kadiri, 2016; Kaur et al., 2015).

El valor de  $K_m$  obtenido fue mucho menor a los reportados por el método de GDU, sin embargo los resultados de ambos investigadores son incluso muy diferentes entre sí, lo cual puede deberse a la diferencia entre el grado de la gelatina utilizado, (no se reporta en ambos casos), a la fuente de obtención de la enzima y a su

concentración. Hasta la fecha no se puede hacer una comparación correcta de los resultados de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  entre los experimentos reportados, ya que difieren tanto en las condiciones en las que se llevaron a cabo, como en la forma de reportar los resultados (por ejemplo, para la  $V_{m\acute{a}x}$  se utilizan GDU/g, U/mg/min, mM/min o mg/[mL\*min]).

Con el fin de obtener una comparación óptima de los parámetros, se piensa evaluar en un futuro nuestra enzima con el método de GDU y RMN como métodos ortogonales.

Es importante recalcar que los valores obtenidos son aparentes, ya que no se realizaron en las condiciones óptimas de actividad de la enzima, lo cuál se debe a que se buscaba obtener dichos parámetros en las condiciones en las que se encuentra la enzima para la producción de Colagenart®.

**Tabla 9.** Parámetros cinéticos aparentes de enzima bromelina utilizando gelatina como sustrato.

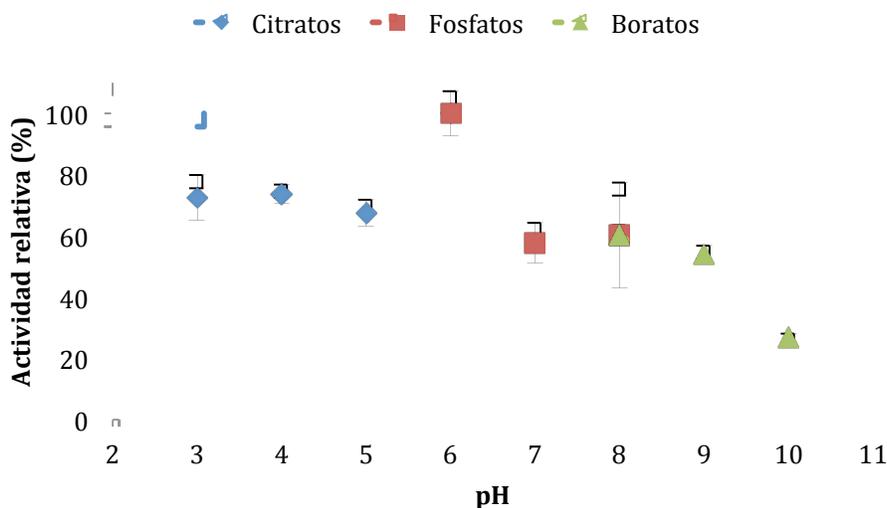
Parámetro cinético aparente	Valor obtenido
$K_m$ (mM)	0.1618
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/min)	0.0080
$K_{cat}$ (mM sustrato/mM enzima · min)	7.84
$K_s$ ( $V_{m\acute{a}x}/K_m$ ) ( $\text{min}^{-1}$ )	0.0493

## 6.5 Determinación de pH óptimo

Como es bien sabido, el intervalo de amortiguamiento de las sales es equivalente al valor de su  $pK_a \pm 1$ , algunas de ellas presentan diferentes estados de protonación, por lo que tienen más de un  $pK_a$ , y por lo tanto pueden amortiguar soluciones en intervalos más amplios, sin embargo ninguna sal amortigua dentro de toda el intervalo de la escala de pH y por ello es necesario utilizar diferentes sales (Bisswanger, 2014).

En la Fig. 13 se muestran los resultados obtenidos al someter a la enzima a diferentes condiciones de pH y con diferentes pares iónicos como sistemas

amortiguadores, en ella se observa que la actividad óptima se da a pH 6, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, ya que utilizando azocaseína y el sustrato sintético CBZ-Lys-ONp se reporta el mismo valor de pH, mientras que con otros sustratos el intervalo de actividad óptima va de 5.5 a 8 (Alves et al., 2014; Corzo et al., 2012; Ha et al., 2012).



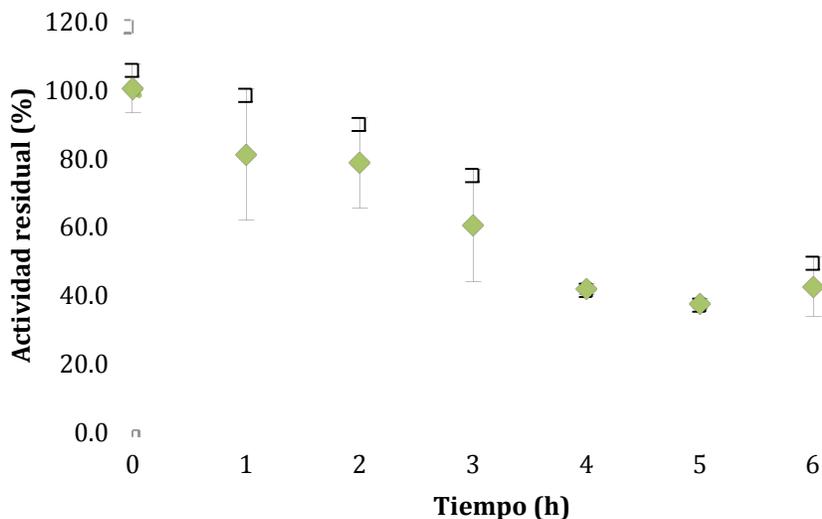
**Figura 13. Influencia del pH en la actividad proteolítica de la bromelina.** Los ensayos se realizaron a 37 °C y utilizando gelatina como sustrato. Las demás condiciones del ensayo corresponden a las establecidas previamente en el método, es decir, agitación a 225 rpm, proporción volumen enzima:sustrato 1:100, proporción volumen de medio de reacción:solución amortiguadora 1:5, el análisis fue continuo con mediciones cada 5 min. a  $\lambda = 214$  nm. De izquierda a derecha las soluciones amortiguadoras utilizadas fueron citratos, fosfatos y boratos todos con concentración 10 mM. Cada valor representa el promedio de una serie de triplicados.

### 6.6 Determinación de termoestabilidad

Es importante considerar la actividad autocatalítica que presentan las enzimas proteolíticas, en nuestro caso se evaluó que la enzima se mantuviera activa en un intervalo mayor al utilizado para los ensayos, en un estudio realizado por Amid en el 2011 se obtuvo una pérdida total de la actividad enzimática después de incubar la enzima a 30 y 45 °C por 90 min y pH 4.6, por su parte Anwar *et al.* menciona que la

enzima bromelina a pH 7 y 60°C pierde gradualmente su actividad hasta llegar al 18% de actividad residual después de 3 h de incubación, mientras que llega a 29% a 50 °C, Bhattacharya reporta 22% de actividad residual después de 30 días de almacenamiento a 30 °C (Amid *et al.*, 2011; Anwar *et al.*, 2007; Bhattacharya & Bhattacharyya, 2009).

En la Fig. 14 se muestra que después de 6 h de incubación se mantiene 42% de actividad residual en las muestras, disminuyendo la velocidad de degradación después de las 4h.



**Figura 14. Estabilidad térmica de bromelina a 37 °C y pH 6.** Actividad enzimática residual de la bromelina después de incubarla por 6 h a 37 °C sin agitación, los ensayos de actividad se realizaron con las condiciones del ensayo corresponden a las establecidas previamente en el método, es decir, agitación a 225 rpm, proporción volumen enzima:sustrato 1:100, proporción volumen de medio de reacción:solución amortiguadora 1:5, el análisis fue continuo con mediciones cada 5 min. a  $\lambda = 214$  nm. Cada valor representa el promedio de una serie de triplicados.

## 6.7 Comparación del método desarrollado con otros métodos.

Existen diversos métodos reportados en la literatura para medir la actividad proteolítica en colágeno, sin embargo estos requieren de un largo tiempo de análisis, el cual va de las 3 a las 18 h. La ventaja de dichos métodos es que la mayoría utiliza colágenos nativos, lo cual genera resultados que se asemejan más a los obtenidos cuando la enzima se utiliza en una muestra que contenga ese tipo de sustrato, por ejemplo, la carne (Komsa-Penkova, Rashap, & Yomtova, 1997).

Adicionalmente la cuantificación de producto formado es laboriosa, ya que en la mayoría de los casos requiere de pasos de separación como centrifugación y el uso de colorantes ya sea utilizando desde un inicio sustratos marcados o bien, sometiendo el sobrenadante de la muestra centrifugada a reacciones coloridas, por ejemplo con ninhidrina, de tal manera que puedan ser detectables por métodos espectroscópicos (Wanderley *et al.*, 2017). Un caso particular es el uso de sustratos marcados radiactivamente ya sea con tritio o con  $^{14}\text{C}$  (Birkedal-Hansen *et al.*, 1985; Eeckhout, Delaissé, & Vaes, 1986).

Algunos métodos, hoy día en desuso requieren de material que no es común encontrar en un laboratorio de ciencia básica, como lo es el viscosímetro de Ubbelohde (Daboor, 2010).

En cuanto al método de GDU, a pesar de no requerir de materiales caros o poco comunes en un laboratorio, al hacer uso de varias etapas para poder medir la cantidad de nitrógeno amino libre, puede resultar muy laborioso y poco conveniente como método de rutina (Moodie, 2001).

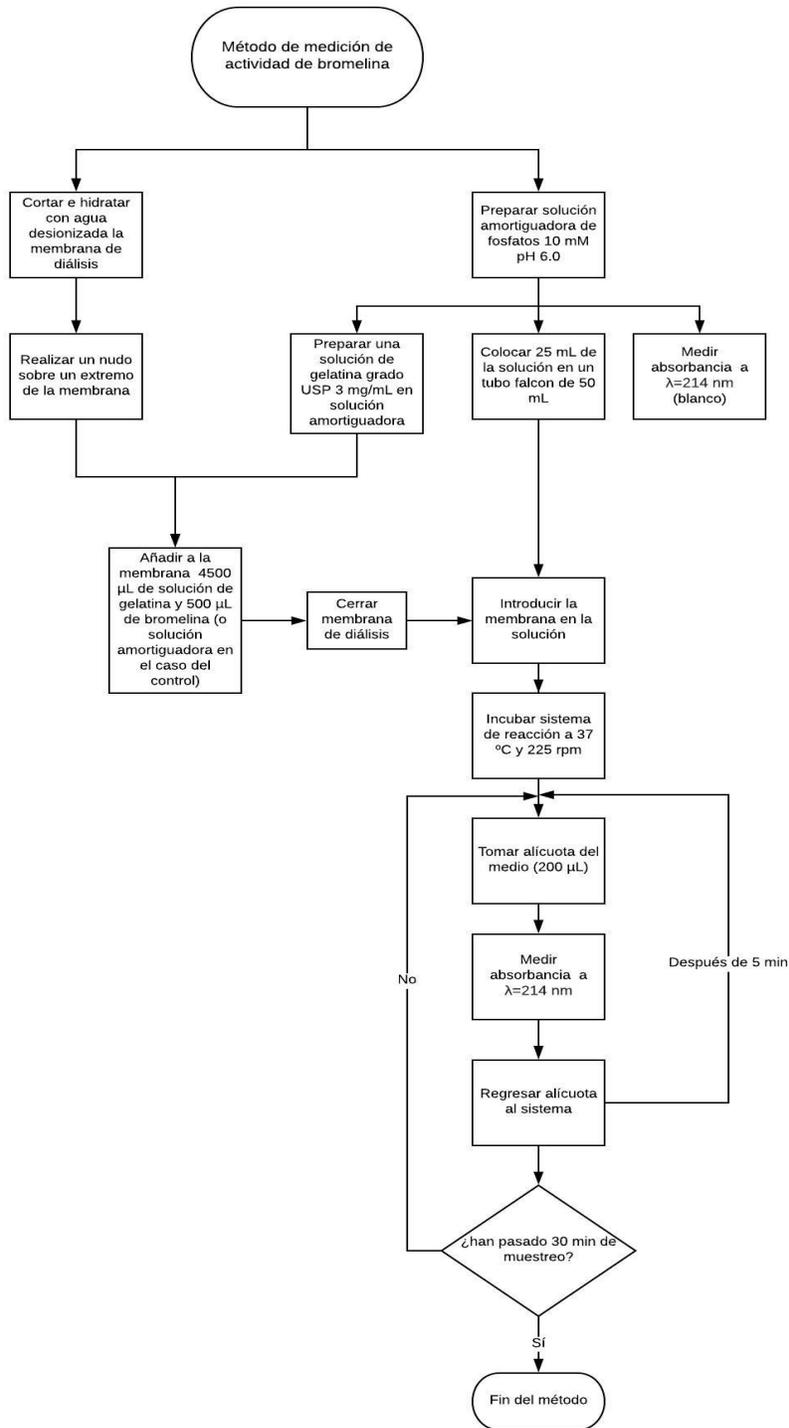
Por lo que se puede decir que el método desarrollado presenta las siguientes ventajas:

- 1) El sustrato no requiere estar marcado

- 2) No se requiere de un tratamiento químico adicional de la muestra previo a ser leída en el espectrómetro
- 3) El estudio puede desarrollarse de manera continua o discontinua, en el segundo caso es recomendable utilizar el valor de absorbancia a los 30 min. después de haber iniciado el ensayo.
- 4) El tiempo de ensayo es corto en comparación a las otras técnicas mencionadas.
- 5) Baja complejidad en el tratamiento de la muestra.

En la Fig. 15 se muestra la metodología final propuesta, debido al principio del método (separación por tamaño de partícula), se esperaría que fuera viable para evaluar la actividad de otras enzimas proteolíticas y otros sustratos.

Se observan desviaciones estándar grandes en algunas condiciones probadas, esto puede deberse a que el control de la temperatura con la incubadora utilizada no es el óptimo, ya que existen métodos más efectivos para transmitir el calor que por convección del aire, por ejemplo en baño maría, el cuál tiene una tasa de penetración más rápida (Buck, Hickey, & Rosenau, 1979). Es importante considerar esto como una limitante del proyecto, ya que era el equipo con el que se contaba para poder tener control de ambos parámetros, velocidad de agitación y temperatura, en un futuro podría utilizarse un equipo como el ThermoMixer® que presenta un mejor control de temperatura.



**Figura 15. Diagrama de flujo del método de análisis propuesto para medir la actividad enzimática de la bromelina utilizando gelatina como sustrato.**

## 7. Conclusiones

- Se logró desarrollar un método analítico para determinar la actividad proteolítica de la enzima bromelina utilizando gelatina como sustrato.
- Mediante el método desarrollado se logró realizar una caracterización parcial de la enzima bromelina.
- Las condiciones finales del método desarrollado corresponden a una proporción de volumen enzima:sustrato 1:100; una proporción de volumen medio de reacción: solución amortiguadora 1:5; una velocidad de agitación de 225 rpm; temperatura de 37 °C; intervalo de muestreo de 5 min durante 30 min. y lecturas de las muestras a  $\lambda = 214$  nm.
- Los fragmentos de gelatina dializados son cuantificables por espectrometría UV con  $\lambda = 214$  nm en un intervalo lineal solo a concentraciones bajas, a concentraciones superiores se obtienen lecturas con comportamiento exponencial.
- La enzima bromelina mostró actividad óptima a pH 6 y una actividad residual de 42% después de incubarse 6h a 37 °C en buffer de fosfatos 10 mM.

## 8. Referencias

- Aitken, A., & Learmonth, M. P. (2002). Protein Determination by UV Absorption. In *Protein Protocols Handbook, The* (pp. 3–6). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:3>
- Alves, T., Rocha, I., Maria, G., Aoyama, H., Garrard, I., & Tambourgi, E. B. (2014). Extraction and Preliminary Characterization of Bromelain from Curaua ( *Ananas erectifolius* L . B . SMITH ) Purple and White. *Chemical Engineering Transactions*, 37, 769–774. <https://doi.org/10.3303/CET1437129>
- Amid, A., Ismail, N. A., Yusof, F., & Salleh, H. M. (2011). Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain from *Ananas comosus*. *Process Biochemistry*, 46(12), 2232–2239. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.018>
- Anwar, T., Ahmad, B., & Younus, H. (2007). Cross-linked stem bromelain: A more stabilized active preparation. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25(6), 453–458. <https://doi.org/10.1080/10242420701568575>
- Balls, A. K., Thompson, R. R., & Kies, M. W. (1941). Bromelain - Properties and commercial production. *Ind. Eng. Chem*, 33, 950.
- Bañó, C., Peretó, J., Sendra, R., & Pamblanco, M. (2007). *Fundamentos de bioquímica*. (U. de València, Ed.). España.
- Battaner-Arias, E. (2013). *Compendio de enzimología*. España: Ediciones Universidad de Salamanca.
- Benjakul, S., & Kittiphattanabawon, P. (2018). Gelatin. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21588-6>
- Berg, J. M. (2013). *Bioquímica* (7th ed.). España: Reverté.
- Bergmeyer, H. U. (1983). *Methods of Enzymatic Analysis* (3rd editio). Weinheim, Germany: Verlag Chemie.
- Berlitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Springer.
- Bhattacharya, R., & Bhattacharyya, D. (2009). PRESERVATION OF NATURAL STABILITY OF FRUIT “BROMELAIN” FROM ANANAS COMOSUS (PINEAPPLE). *Journal of Food Biochemistry*, 33(1), 1–19.

<https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2008.00194.x>

- Bhattacharyya, B. (2008). Bromelain: an overview. *Nat Prod Radiance*, 7, 359–363.
- Birkedal-Hansen, H., Taylor, R. E., Bhowan, A. S., Katz, J., Lin, H. Y., & Wells, B. R. (1985). Cleavage of bovine skin type III collagen by proteolytic enzymes. Relative resistance of the fibrillar form. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(30), 16411–16417. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905816>
- Bisswanger, H. (2011). *Practical Enzymology. Biocatalysis* (2nd ed.). Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213020914000068>
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1–6), 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Bombara, N., Añón, C. M., & Pilosof, A. M. R. (1997). Functional properties of protease modified wheat flours. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie*, 30, 441–447.
- Brown, G. H., & Sallee, E. M. (1977). *Química Cuantitativa*. Barcelona: Reverté.
- Buck, E. M., Hickey, A. M., & Rosenau, J. (1979). LOW-TEMPERATURE AIR OVEN VS A WATER BATH FOR THE PREPARATION OF RARE BEEF. *Journal of Food Science*, 44(6), 1602–1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb09099.x>
- Cantor, C. R., & Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical Chemistry*. New York: W. H. Freeman.
- Comisión Nacional de Protección Social en Salud, H. Ley General de Salud (2018). Mexico.
- Copeland, R. A. (2001). Enzymology Methods. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002702>
- Corzo, C. A., Waliszewski, K. N., & Welte-Chanes, J. (2012). Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food Chemistry*, 133(3), 631–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.119>
- Daboor. (2010). Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(4), 239–263.

<https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2010.239.263>

- Dewey, T. G. (1991). *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum.
- Eeckhout, Y., Delaissé, J. M., & Vaes, G. (1986). Direct extraction and assay of bone tissue collagenase and its relation to parathyroid-hormone-induced bone resorption. *Biochemical Journal*, 239(3), 793–796.  
<https://doi.org/10.1042/bj2390793>
- Erez, E., Fass, D., & Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, 459, 371–378.
- Fan, F., & Wood, K. V. (2007). Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 5(1), 127–136.  
<https://doi.org/10.1089/adt.2006.053>
- Fayad, S., Morin, P., & Nehmé, R. (2017). Use of chromatographic and electrophoretic tools for assaying elastase, collagenase, hyaluronidase, and tyrosinase activity. *Journal of Chromatography A*, 1529, 1–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.003>
- García-Bermejo, M. J., & Silva-García, M. del C. (2004). *Manual del técnico superior de laboratorio de análisis clínico*. España: Editorial Mad.
- García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R., & López-Munguía-Canales, A. (Eds.). (2004). *Biotecnología alimentaria*. México: Editorial Limusa.
- Ha, M., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A., & Hopkins, D. L. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*, 134(1), 95–105.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.071>
- Harris, D. C. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo* (3ª Ed.). España: Editorial Reverté.
- Heinicke, R. M. (1953). Complementary enzyme actions in the clotting of milk. *Science*, 118, 753.
- Hernández-Rodríguez, M., & Sastre-Gallego, A. (1999). *Tratado de nutrición*. Madrid: Díaz de Santos.
- Herrera-Castillán, E., Ramos Álvarez, M. del P., & Viana-Arribas, M. M. (2014).

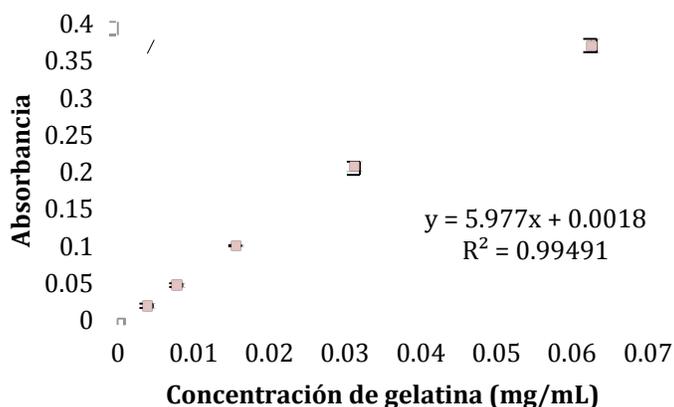
- Bioquímica básica: Base molecular de los procesos fisiológicos*. España: Elsevier.
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology, N. C., & Webb, E. C. (1992). *Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press.
- Kadiri, D. D. (2016). *Studies on isolation and characterization of bromelain like cysteine protease from billbergia pyramidalis sims lindl and evaluation of its antiproliferative and anti obesity activities*. GITAM University. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10603/175950>
- Kappes, T., & Hauser, P. C. (2000). Recen developments in electrochemical detection methods for capillary electrophoresis. *Electroanalysis*, 12, 165–170.
- Kaur, T., Kaur, A., & Grewal, R. K. (2015). Kinetics studies with fruit bromelain (Ananas comosus) in the presence of cysteine and divalent ions. *J Food Sci Technol.*, 52, 5954–5960. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1639-5>
- Komsa-Penkova, R. S., Rashap, R. K., & Yomtova, V. M. (1997). Advantages of orange-labelled collagen and gelatine as substrates for rapid collagenase activity measurement. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 34(3), 237–249. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(97\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(97)00016-X)
- Lacasa, A. (2003). *Ciencia de la leche. Principios de la técnica lechera* (4th ed.). España: Reverté.
- Maurer, H. R. (2001). Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(9), 1234–1245. <https://doi.org/10.1007/PL00000936>
- Menger, F. M. (1993). Enzyme reactivity from an organic perspective. *Accounts of Chemical Research*, 26, 206–212.
- Moodie, P. (2001). *Gelatin digestion unit analytical method*. New York.
- Murachi, T., & Neurath, H. (1960). Fractionation and Specificity Studies on Stem Bromelain. *J. of Biology Chemistry*, 235, 99–107.
- Na, G. C. (1988). UV Spectroscopic Characterization of Type I Collagen. *Collagen*

- and Related Research*, 8(4), 315–330. [https://doi.org/10.1016/S0174-173X\(88\)80003-7](https://doi.org/10.1016/S0174-173X(88)80003-7)
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Lehninger. Principios de bioquímica*. (Quinta edi). Ediciones Omega.
- Nor, A., Ramli, M., Tuan, N., & Illias, R. (2016). Bromelain: from production to commercialisation. *J Sci Food Agric*, 97(September), 1386–1395. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8122>
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2007). *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry* (Second edi). USA: Woodhead Publishing Limited.
- Peek, K., Daniel, R. M., Monk, C., Parker, L., & Coolbear, T. (1992). Purification and characterization of a thermostable proteinase isolated from *Thermos* sp. Rt 41 A. *Eur. J. Biochem.*, 207, 1035–1044.
- Ravisankar, P., Naga-Navya, C., Pravallika, D., & Navya-Sri, D. (2015). A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5(10), 07-19.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays In Biochemistry*, 59, 1 LP-41. Retrieved from <http://essays.biochemistry.org/content/59/1.abstract>
- Rogers, A., & Gibon, Y. (2009). Enzyme Kinetics: Theory and Practice. In J. Schwender (Ed.), *Plant Metabolic Networks* (pp. 71–103). New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-78745-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78745-9_4)
- Rowan, A. D., & Buttle, D. J. (1994). Pineapple cysteine endopeptidases. *Methods. Enzymol.*, 244, 555–568.
- Rowan, A. D., Buttle, D. J., & Barrett, A. J. (1990). The cysteine proteinases of pineapple plant. *Biochem*, 266, 869.
- Simes, L. E., & Brich, T. (2015). *Bioquímica orientada al análisis químico*. Argentina: Jorge Sarmiento editor.
- Stoker, H. S. (2015). *General, Organic, and Biological Chemistry* (7th ed.). USA: Cengage Learning, Inc.
- Swartz, M. E., & Krull, I. S. (1997). *Analytical Method Development and Validation*. New York: Marcel Dekker.

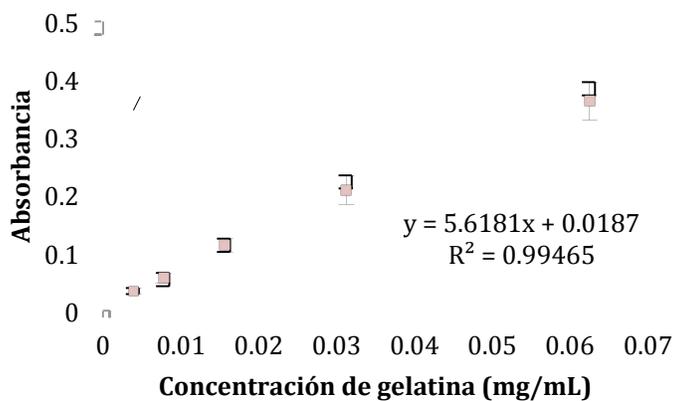
- Szpak, P. (2011). Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *Journal of Archaeological Science*, 38(12), 3358–3372. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.07.022>
- Uhlig, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. (E. M. Linsmaier-Bednar, Ed.). USA: John Wiley & Sons.
- Wanderley, M. C. de A., Neto, J. M. W. D., Filho, J. L. de L., Lima, C. de A., Teixeira, J. A. C., & Porto, A. L. F. (2017). Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.001>
- Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., & Wong, D. W. S. (Eds.). (2003). *Handbook of food enzymology. Handbook of Food Enzymology*. USA: Marcel Dekker. <https://doi.org/10.1201/9780203910450.ch5>
- Zhang, Y., He, S., & Simpson, B. K. (2018). Enzymes in food bioprocessing — novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current Opinion in Food Science*, 19, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.007>

## 8. Anexos

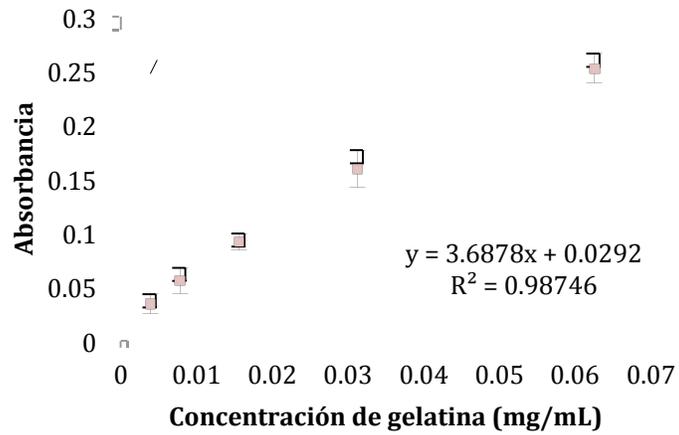
Las curvas de calibración que se presentan a continuación se realizaron utilizando gelatina grado USP, solución amortiguadora 10 mM y las lecturas de absorbancia se realizaron a  $\lambda = 214$  nm.



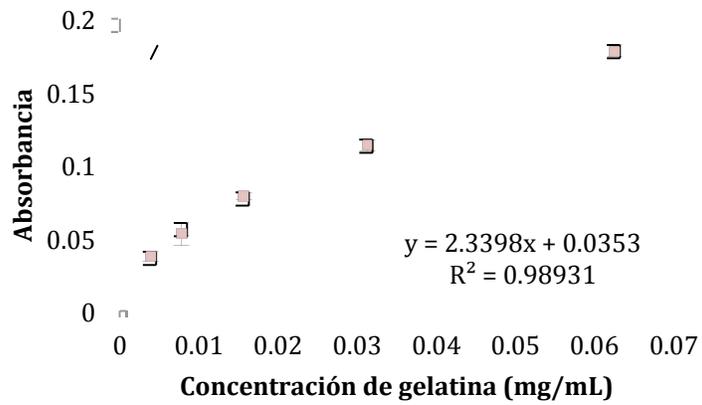
### Anexo 1. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de citratos pH 3



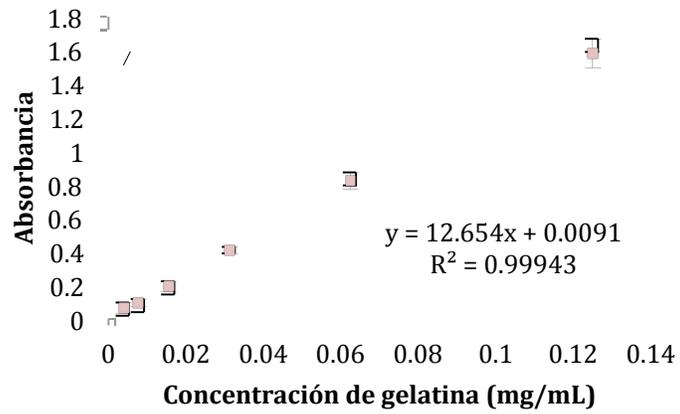
### Anexo 2. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de citratos pH 4



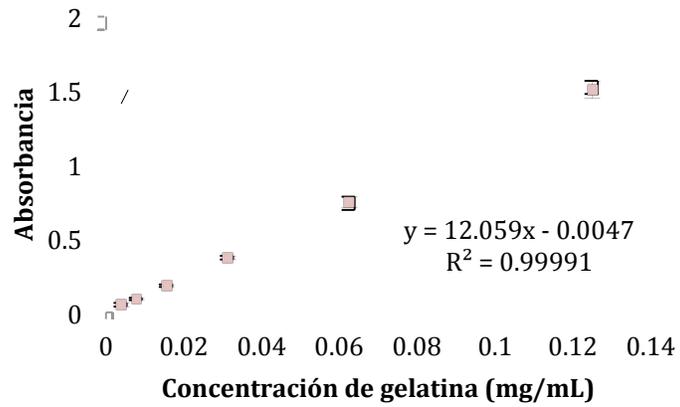
**Anexo 3. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de citratos pH 5**



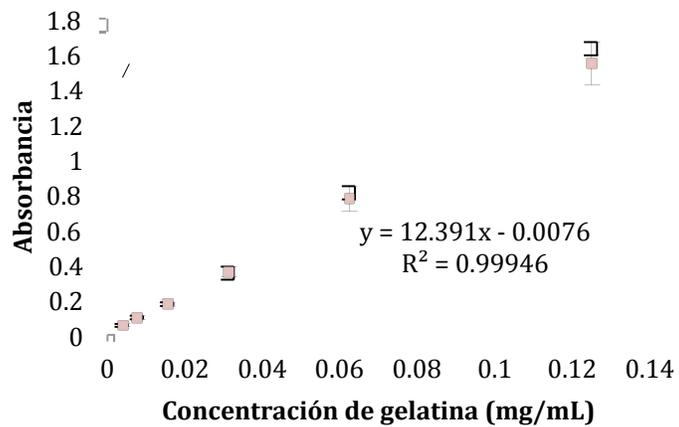
**Anexo 4. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de citratos pH 6**



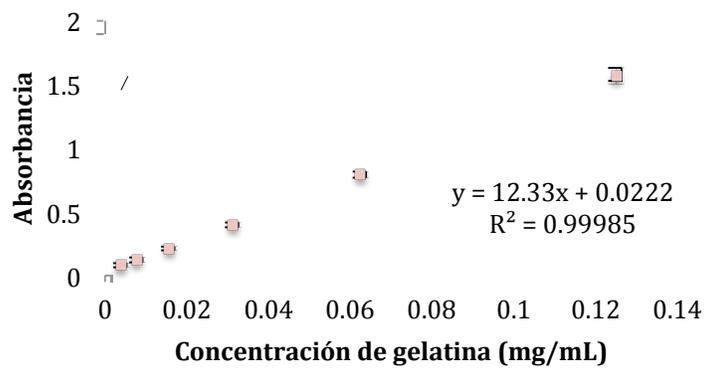
**Anexo 5. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de fosfatos pH 6**



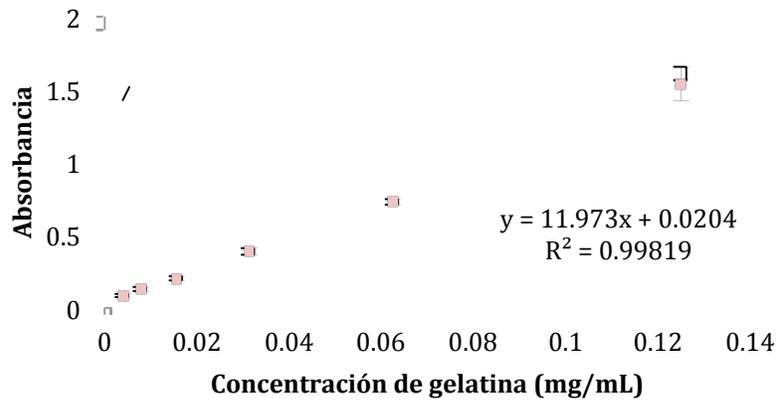
**Anexo 6. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7**



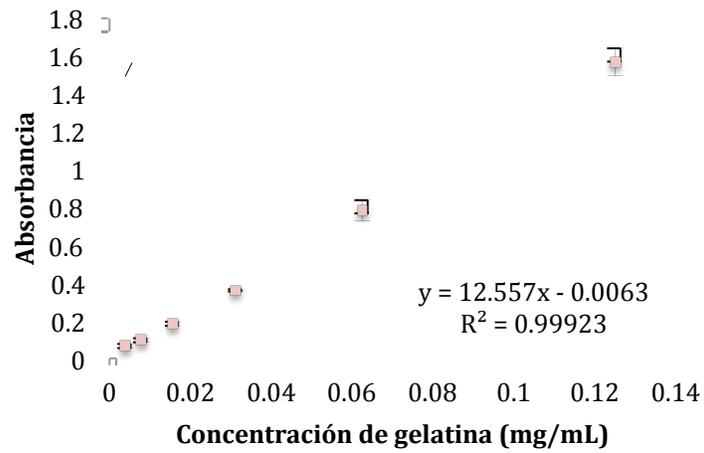
**Anexo 7. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de fosfatos pH 8**



**Anexo 8. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de boratos pH 8**



**Anexo 9. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de boratos pH 9**



**Anexo 10. Curva de calibración de gelatina en solución amortiguadora de boratos pH 10**