XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
León, Guanajuato 23 al 28 de junio 2019
Resumen de Trabajos Libres

INFLUENCIA DEL PH EN LA ACTIVIDAD DE PECTINASAS Y SU RELEVANCIA EN LA CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE REACCIÓN.

Héctor Adiel Flores Nestor, Carlos Eduardo Gómez Sánchez, Paulina Ingelmo Díaz, Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Toluca, 50110, adiel.flores@tec.mx.

Palabras clave: pectinasa, pH, diprótico.

Introducción. En los últimos años, las enzimas se han ido posicionando en muchas industrias debido a su enorme potencial e impacto en distintos procesos. Esta industria está estimada a llegar a los 6.30 billones de dólares para el 2020 (1). Entre todas las enzimas, las pectinasas han tenido un gran impacto dentro de la industria de los jugos, textil, papel, avícola, extracción de aceite, tratamiento de aguas residuales, entre otras (2). La caracterización de la influencia de factores como el pH ha sido tema de muchos trabajos. Sin embargo, existe poca información hasta el momento, de un intento claro para modelar esta influencia, por lo que la información que se obtiene es superficial y no permite conocer otros aspectos del mecanismo de reacción de la enzima.
Este trabajo busca proponer un modelo diprótico simple que permita obtener, de manera cuantitativa, y usando un software de algebra computacional, los valores del pka de los aminoácidos involucrados en la catálisis de una pectinasa.

Metodología. Una pectinasa comercial (Sigma-Aldrich Cat. 17389) fue resuspendida hasta una concentración adecuada y su actividad fue evaluada a distintos valores de pH. El ensayo contenía 0.5 mL de pectina 1% (p/v) y 0.4 mL del buffer apropiado 100mM y 0.1 mL de la dilución de enzima. Las muestras fueron incubadas a 50°C durante 10 minutos. La cantidad de azúcar liberada fue cuantificada mediante el Método de Miller (3). Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un µmol de ácido galacturónico en un minuto, bajo las condiciones estándar.

Resultados. Los resultados experimentales de la actividad enzimática a distintos valores de pH, así como el ajuste contra la ecuación del modelo diprótico (mostrado en la **Figura 1.b)**, se muestran en la **Figura 2**. Los valores del pKa de los aminoácidos catalíticos fueron 4.73 y 6.95, que corresponden a los pKa del Ac. Aspártico y la Histidina, respectivamente. Ambos aminoácidos están reportados como parte de los residuos activos (4). La variación entre el pKa teórico y el pKa obtenido se

a)

$$\begin{array}{c} EH_2 \\ \updownarrow \\ H \\ + \\ EH + S \rightleftharpoons EHS \rightarrow EH + P \\ \updownarrow \\ E + H \end{array}$$

b)

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]_0}{K_S(1 + 10^{pka_1 - pH} + 10^{pH - pKa_2}) + [S]_0}$$

Fig. 1. Modelo diprótico de influencia del pH.a) Modelo simple diprótico sobre la influencia del pH en la actividad enzimática. Sólo la combinación correcta es capaz de unirse al sustrato y ser catalíticamente activa. b) Ecuación obtenida a partir del modelo simple.

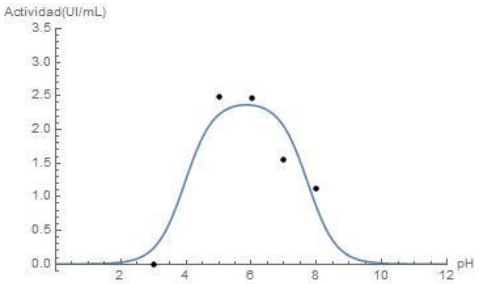

Fig. 2. Dependencia de la actividad enzimática con el pH. Gráfico que representa el ajuste no lineal del modelo diprótico a los datos experimentales.

puede deber a que, en el microambiente cercano al sitio activo, existe una gran presencia de aminoácidos ácidos, lo que eleva el pKa calculado en el trabajo. Tradicionalmente, se han utilizado métodos gráficos usando inspección visual para el cálculo de los pKa de los aminoácidos relevantes para la catálisis enzimática. Sin embargo, estos métodos, al hacer uso de transformaciones sobre los datos experimentales y depender del usuario, suelen verse altamente influenciados por la calidad de los datos. Además, estos métodos pueden sufrir de desplazamientos si algunas consideraciones no se cumplen (5). El modelo propuesto, haciendo uso de herramientas computacionales, puede evitar estos obstáculos, arrojando resultados más confiables, incluso ante datos experimentales con dispersiones significativas.

Conclusiones. Este modelo permite obtener información cuantitativa a partir del ensayo de la influencia del pH en la actividad enzimática. El uso de este modelo, y las herramientas computacionales actuales, permiten identificar residuos de aminoácidos fundamentales en la catálisis, así como el microambiente que debe rodearlos, sobre todo si se busca modificar enzimas para hacerlas más eficientes para distintas aplicaciones.

Bibliografía.

(1) MaketsandMarkets (2016). Obtenido de: http://www.rnrmarketresearch.com/industrial-enzymes-market-by-types-carbohydrase-protease-lipase-applications-food-beverages-cleaning-agents-bio-fuel-animal-feed-geography-global-trends-forecasts-to-2018-market-report.html Accesado el 10 de febrero de 2019.
(2) Bhardwaj, V, Degrassi, G, & Bhardwaj, R K (2017). *IRJET*, 4(08): 829-836.
(3) Miller, G L (1959). *Anal Chem*, 31(3): 426-428.
(4) Carvalho, HAS et. al. (2013). *Fungal Genet Biol*, 60: 110-121.
(5) Dixon, H. B. (1973). *Biochem. J*, 131(1), 149-154.