

# SISTEMA DE MICELAS INVERSAS AOT/OCTANO PARA LA OBTENCION DEL DIMERO $\alpha$ -QUIMOTRIPSINA-PEROXIDASA, Y EL ESTUDIO DE ESTE EN SOLUCION ACUOSA.

Consuelo de J. Cortés Penagos\*, Vianey C. Calderón Arreola  
Departamento de Investigación, Escuela de Químico-Farmacobiología,  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,  
Tzintzuntzan No.143, Col. Matamoros, Morelia, Michoacán, México.  
Fax (43) 14 21 52, \*[ccpenagos@yahoo.com](mailto:ccpenagos@yahoo.com)

**Palabras claves:** micelas inversas,  $\alpha$ -quimotripsina, polimerización de enzimas.

**Introducción.** Una propiedad importante de  $\alpha$ -quimotripsina en solución es su capacidad de dimerización [1, 2]. El centro lectino de la enzima le confiere propiedades de formar estructuras poliméricas. [3]. En el sistema de micelas inversas, se han obtenido dímeros de  $\alpha$ -quimotripsina nativa con glicoproteínas (artificiales y naturales).

El objeto del trabajo: obtener el dímero  $\alpha$ -quimotripsina-peroxidasa (formado en el sistema micelar AOT/octano, liberación de la matriz micelar y subsecuente determinación de actividad enzimática).

**Metodología.** El dímero de  $\alpha$ -quimotripsina - peroxidasa se obtuvo en el sistema micelar formado de la siguiente manera: 10 ml de una solución 0.1M de AOT/octano agregando solución buffer TRIS-HCl 0.1M (pH=8.5) y 50  $\mu$ l de solución correspondiente de enzima para obtener un  $W_o= 16$ . La concentración de  $\alpha$ -quimotripsina fue de 11  $\mu$ M y una relación 1:1 con peroxidasa. El método de precipitación con acetona empleado en el permite obtener el preparado proteico en forma de "polvo" y soluble en agua, además de estar libre de solvente y sustancia tensoactiva [4]

La verificación y purificación del dímero se realizó por cromatografía de filtración en gel (Sephacril S-100 (HR) y su caracterización por electrofesis en condiciones desnaturalizantes. La medición de actividad proteolítica se realizó utilizando como sustrato ATEE por el método de pH-state con pH 8.0.

**Resultados y discusión.** En la Figura 1. Se aprecian dos picos, el primero corresponde a un PM de 68kDa y el segundo a 25kDa. Se corroboró la presencia de actividad enzimática de quimotripsina en ambos. El segundo pico, corresponde a la enzima nativa y el primero, al dímero formado. La electrofesis en condiciones desnaturalizantes de la fracción primera, corrobora la presencia en el primer pico de dos componentes proteicos cuyo peso molecular corresponde a  $\alpha$ -quimotripsina y peroxidasa (bajo condiciones desnaturalizantes, el dímero se disocia en sus respectivos componentes). La actividad enzimática de  $\alpha$ -quimotripsina del complejo resulta 30 veces menor que la actividad enzimática de la enzima nativa,

esto puede explicarse por el cambio de propiedades de la quimotripsina, como la disminución en la cantidad de forma nativa (concentración de centros activos) en el preparado enzimático.

Abs  
 $10^{-2}$ ,  
280  
nm

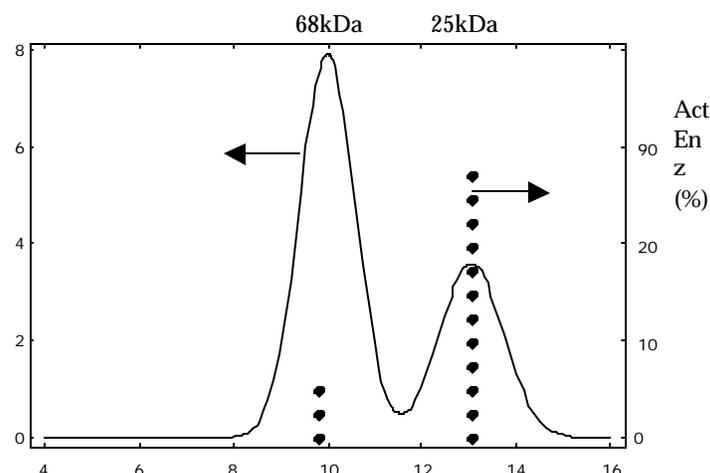


Figura 1. Cromatograma de los componentes proteicos, extraídos del sistema micelar, conteniendo  $\alpha$ -quimotripsina y peroxidasa

**Conclusiones.** En este trabajo se pudo aislar del sistema micelar un complejo (dímero) no covalente de  $\alpha$ -quimotripsina con peroxidasa. Se comprobó que el dímero es capaz de sobrevivir al proceso de aislamiento y a la ausencia de la matriz micelar. El dímero se supone compacto, ya que no se destruye aún bajo las drásticas condiciones a las que se somete para su aislamiento (precipitación con acetona) y fraccionamiento por cromatografía en columna. Presentando el dímero obtenido actividad enzimática para  $\alpha$ -quimotripsina

## Bibliografía.

1. Gorbunoff M.J., Fosmire G., Timasheff S.N. Low pH dimerization of chymotrypsin in solution.// Biochemistry 1978, 17(19), 4055-65.
2. Neet K. E., Sackrisson K. M., Aislie G. R., Barritt L. C. Conformational changes and association of chemically

modified chymotrypsins.// Arch. Biochem. Biophys. 1974, 160, 569-76.

3. Rariy R.V., Klyachko N.L., Borisova E.A., Cortés P.C.J., Levashov A.V. (1995) *Biochem. and Mol.Biol.Inter.*, 36 (1): 31-37.

4. Rariy R.V. Descubrimiento del centro específico para azúcares en la molécula de  $\alpha$ -quimotripsina y su influencia en las propiedades regulatorias de la enzima en el sistema de micelas inversas. Tesis Doctoral, Facultad de Química, Universidad Estatal de Moscú, "M.V. Lomonosov", 1996.