

**Introducción:** Se han obtenido resultados satisfactorios para lograr la síntesis de péptidos de Lys y Trp con papaína libre en medio acuoso, sin embargo existe una contaminación por la presencia de la enzima y esta no puede ser reusada. La inmovilización enzimática sería una solución a este problema. Este trabajo presenta la inmovilización de papaína sobre un soporte inerte para la síntesis de dichos péptidos basándose en la capacidad de papaína para formar enlaces peptídicos en condiciones específicas de reacción.

**Metodología:** Se inmovilizó papaína por enlace covalente sobre amberlita a pHs 3-7. Las reacciones se efectuaron a temperatura ambiente. Se estudio la cantidad de proteína inmovilizada sobre el soporte a concentraciones de 0-160 mg enzima/ g de soporte. El seguimiento de la inmovilización se realizó por la medición de proteína presente en los sobrenadantes a 595 nm utilizando el reactivo de Bradford. La reacción de síntesis se practicó en medio acuoso amortiguado con fosfatos. Se incubó la reacción en viales de vidrio a 37°C por 24 horas y se tomaron muestras cada 30 minutos. Se evaluó el efecto del pH, de concentración de sustrato y la concentración de enzima. El contenido de Lys fue determinado por el método de Villegas (1976) y el Trp de acuerdo a Opienska-Blauth (1963):

**Resultados y discusión:** Se encontró que las mejores condiciones de inmovilización fueron a pH 4, con un tiempo máximo de inmovilización de 8 horas. El efecto del pH afectó el rendimiento de la formación de péptidos debido al acoplamiento con el aminoácido esterificado al formar el complejo enzima: sustrato y en la reacción de aminólisis causada por el nucleófilo que desata el complejo enzima: sustrato y permite la formación del péptido. Así, para Trp se obtuvo su máxima conversión a pH 7 y para Lys a pH 9. Se observó que el incremento en la concentración de sustrato es reflejado en una alta conversión del mismo. Esto se debió al aumento de la aminólisis con respecto a la hidrólisis provocada por el agua en el medio. El efecto de la concentración de enzima fue similar para los sistemas utilizados. Los parámetros cinéticos calculados por el modelo de Michaelis

Menten para la actividad de la oligomerización de los péptidos confirman la afinidad que posee la papaína por el triptófano. (Figura 1 y 2) Figura 1. Estimación de  $K_m$  y  $V_{max}$  de papaína inmovilizada sobre oligómeros de Lisina

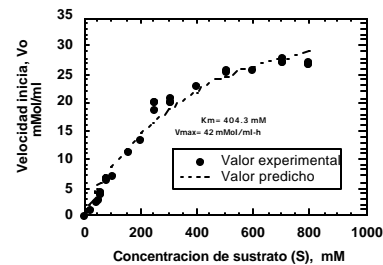
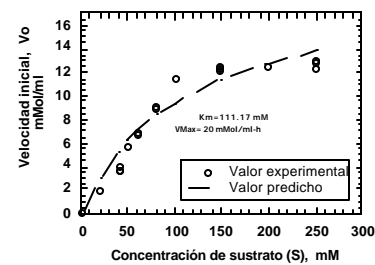


Figura 2. Estimación de  $K_m$  y  $V_{max}$  de papaína inmovilizada sobre oligómeros de Triptófano

**Conclusiones:** A pH 4 se logró inmovilizar 62 mg de proteína por gramo de soporte. Los



mejores niveles de síntesis se observaron a pH 7 para Trp y 9 para Lys con una relación e:s 10:100. El Trp requirió bajas concentraciones de sustrato (100mM) para alcanzar los máximos niveles de rendimiento, no así Lys que necesitó de 800 mM para lograr sus más altos rendimientos. El efecto de la concentración de enzima fue similar en ambos sistemas.

#### Bibliografía:

Opienska-Blauth, J., M. Chareziński, et al. (1963). "A New Rapid Method of Determining Tryptophan." *Anal. Biochem.* **6**: 69-76.  
Villegas, E. (1977). El Sistema Integral para la Selección Química del Maíz de Alta Calidad Proteínica. *Maíz de Alta Calidad Proteínica*. CIMMYT-PURDUE. México D.F., LIMUSA: 357-364.