

METODO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD TIROSINASICA DE ALGUNOS FRUTOS: UNA PRACTICA DE ENZIMOLOGIA

*Por Jalro Quijano Tobón (1)
Gabriel Jaime Arango Acosta (2)*

INTRODUCCION

Frecuentemente se consideran las enzimas como "materiales exóticos obtenidos de fuentes exóticas". En parte esto ha sido cierto, pues la mayoría de las enzimas son extraídas de órganos animales mediante complicados procesos de separación y purificación, lo que dificulta enormemente el desarrollo de una práctica de laboratorio cuyo objetivo sea el ilustrar la cinética enzimática con la determinación de los correspondientes parámetros (K_M , V_M , K_I).

Es conocido que cuando las papas, manzanas, bananas y otras frutas se parten les aparece un color café. Este fenómeno es llamado "empardeamiento"

El conocimiento de la naturaleza enzimática de un tipo de empardeamiento de ciertas frutas se debe a Lindet (Lindet 1895) quien lo observó en 1895. No obstante lo anterior, Onslow (1920) observó que el oscurecimiento enzimático de los tejidos vegetales en el aire se debía a la presencia de derivados del O-hidroxifenol, tales como el catecol, el ácido caféico y algunos ésteres del ácido hidroxigálico con el caféico, tales como el ácido clorogénico que está ampliamente distribuido en muchos frutos y sobre todo en papas.

A las enzimas productoras de empardeamiento se les han dado diferentes nombres: fenolasa, polifenolasa y polifenoloxidasa. Este grupo de enzimas contiene cobre y comprende varias fenolasas. (Joslyn, Ponting 1951):

- a) **Tirosinasa:** Es una monofenoloxidasas que cataliza la conversión de tirosina de Dopa-quinona la cual después se oxida.
- b) **Catecolasa:** Es una polifenoloxidasas que cataliza la oxidación del catecol y otros compuestos fenólicos análogos.
- c) **Laccasa:** Cataliza la oxidación del laccol, sustancia fenólica encontrada en el látex japonés (Kertesz 1933).
- d) **Ascorbinasa:** Cataliza la oxidación de ácido ascórbico (Vitamina C) a dehidroascórbico.

Hay otro grupo de enzimas oxidantes encontrado prácticamente en todos los tejidos vegetales (peroxidasa, catalasa y citocromos), pero parece que no intervienen en el empardeamiento enzimático (Braverman 1967, Joslyn y Ponting 1951).

El presente trabajo se basa en la reacción siguiente catalizada por tirosinasa (E.C.1,14,18,1:0— difenol: 2 óxido reductasa). (Mahler y Cordes 1965), (Fig.1).

MATERIALES Y METODOS

Reactivos usados:

- Solución fosfato 0.1 M pH 7.2
- Solución fosfato 0.1 M pH 6.0

(1) Profesor del Departamento de Química de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(2) Profesor de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

- Solución dopa 0.03 M en buffer.
- Fosfato pH 6.0 (Ledopa: una droga antiparkinsoniana-Lepetit) 4 mg/ml. Se disuelve el contenido de una cápsula en la cantidad de buffer fosfato pH 6.0 que corresponda a 4 mg/ml, se filtra y se rotula el filtrado como sustrato 0.03 M.
- Solución de NaCN 5.10^{-4} M.
- Frutas varias.
- Arena lavada con ácido.
- Lienzo o pañuelo limpio
- Mortero.
- Fotocolorímetro.
- Hielo picado.

PROCEDIMIENTO

Se utilizaron algunos frutos que mostraron empardeamiento enzimático y cuyas actividades están ilustradas en la Tabla I. Para el trabajo de cinética enzimática se usó la tirosinasa de *Pyrus malus* L. (manzana), por tener una actividad promedio entre las estudiadas. Es de anotar, que cualquier fruto con actividad tirosinásica puede ser usada para la práctica. (Friedman y Daron 1977).

Extracción de la enzima (Friedman y Daron 1977).

Entre 10 y 15 gramos de la fruta se colocan en un mortero pre-enfriado y se mezclan con 30 ml de 0.1 M fosfato pH 7.2. Se agregan unos pocos gramos de arena lavada con ácido y con la mano del mortero se tritura la fruta. Se filtra con un lienzo y se centrifuga por cinco minutos a 1500 rpm. La solución sobrenadante se decanta y se coloca en un baño de hielo. Se rotula como "extracto enzimático".

Ensayo enzimática

La enzima se ensaya colorimétricamente midiendo la velocidad de conversión del 3,4 dihidroxifenil alanina (Dopa) a Dopa-Chrome. (Friedman y Daron 1977, Horowitz 1953).

El ensayo se lleva a cabo colocando entre 0,5-1,0 ml del extracto enzimático en una cubeta colorimétrica completando el volumen a 4,0 ml con 0.1 M de buffer a pH 6.0. La reacción se inicia agregando 1.0 ml de la solución de sustrato (0.03 M de Ledopa). Debe tenerse un blanco que contenga la misma cantidad de enzima M de buffer fosfato pH 6.0 y 1.0 ml de agua destilada en lugar del sustrato.

Se lee absorbancia a 420 n.m. inmediatamente después de agregar el sustrato y luego cada minuto, por un lapso de 10 minutos. La actividad enzimática se mide tomando la diferencia entre las lecturas inicial y final divididas por el intervalo de tiempo. Esta actividad también puede ser determinada de la pendiente del gráfico absorbancia vs. tiempo, según la Tabla II (Fig.2).

Como variante de la práctica se puede analizar el comportamiento de la enzima después de inactivarla con calentamiento y con un inhibidor, de la siguiente forma:

En otros dos tubos, se agrega entre 0.5-1.0 ml del extracto enzimático y se completa a 4.0 ml con buffer pH 6.0. Se calienta uno de ellos por 10 minutos en baño de agua hirviendo y al otro se le agrega un cristal de NaCN, se deja enfriar el primero para proceder a agregar 1.0 ml del sustrato a cada tubo y se lee la absorbancia vs. tiempo como en los casos anteriores, según la Tabla II.

Determinación de las constantes de Michaelis Menten por el método LINEA WEAVER Y BURKE.

Con base en los resultados obtenidos en la actividad enzimática, se calculan las concentraciones adecuadas de enzima y sustrato a usar en el experimento. Por ejemplo:

Si la actividad en manzana es 0,0250 (Abs/min/gr frutas), es conveniente utilizar para 1 ml de extracto enzimático, concentraciones de sustrato entre 0,5 mM y 2.5 mM en cubeta.

Se realizan los mismos experimentos anteriores, pero en presencia de NaCN 0.1 mM en cubeta, según la Tabla III.

Las velocidades iniciales se obtienen como pendiente del gráfico absorbancia vs. tiempo para cada Si (Fig.2). Según Tabla III.

Se grafica $1/V_i$ Vs. $1/S_i$ a $I=0$ y a $I=10^{-4}$ M con base en la Tabla III; con el fin de determinar los parámetros correspondientes a la cinética enzimática de acuerdo a la figura 3, según resultados de la Tabla IV.

RESULTADOS

TABLA I.

ACTIVIDAD TIROSINÁSICA DE ALGUNOS FRUTOS

Fruto	Actividad/ G de Frutos
<i>Persea americana</i> miller (Aguacate)	1.24×10^{-2}
<i>Solanum quitense</i> HBK (Lulo)	1.57×10^{-2}
<i>Annona muricata</i> L. (Guanábana)	1.80×10^{-2}
<i>Pyrus malus</i> L. (Manzana)	3.02×10^{-3}
<i>Prunus persica</i> (Durazno)	8.66×10^{-3}
<i>Ailbertia hexosgina</i> Krst. (Pera)	4.17×10^{-4}
<i>Vitis vinifera</i> L. (Uva)	5.25×10^{-4}
<i>Psidium guajaba</i> L. (Guayaba)	2.08×10^{-5}
<i>Prunus hortulana</i> bailey (Ciruela)	2.86×10^{-5}
<i>Physalis peruviana</i> L. (Uchuva)	5.56×10^{-5}

TABLA II MEDIDA DE ABSORBANCIA CON EL TIEMPO PARA LA ENZIMA ACTIVADA Y DESACTIVADA PARA UNA SI

Tiempo	$\lambda = 420 \text{ nm}$ Absorbancia	Tubo calentado Absorbancia	Tubo con NaCN Absorbancia
1/2 minuto	0.010	00	00
1 minuto	0.013	00	00
2 minutos	0.025	00	00
3 minutos	0.040	00	00
5 minutos	0.065	00	00
6 minutos	0.072	00	00
10 minutos	0.075	00	00

TABLA III CALCULOS DE LAS VELOCIDADES INICIALES PARA DIFERENTES VALORES DE SI

$S_i \times 10^3 \text{ M}$	$1/S_i \frac{\text{lit}}{\text{mol}}$	V_i		$1/V_i$	
		$I = 0$	$I = 10^{-4} \text{ M}$	$I = 0$	$I = 10^{-4} \text{ M}$
6	167	7.1	3.0	141	333
9	111	10	4.3	100	233
12	83	13	5.3	77	189
15	67	15	6.2	67	161
18	56	17	7.4	59	135

TABLA IV RESULTADOS DE LOS PARAMETROS CORRESPONDIENTES A LA CINETICA ENZIMATICA

Parámetro	Resultado según Gráfico II
Clase de inhibidor	No competitivo
KM	$4 \times 10^{-2} \text{ M}$
VM	$5 \times 10^{-2} \frac{\text{Abs}}{\text{Min}}$
KI	$9 \times 10^{-3} \text{ M}$

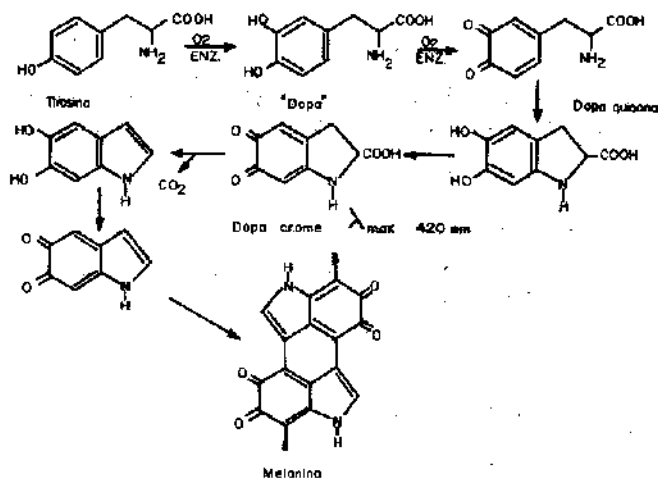


Figura 1.
Este melaninismo está presente en el interior de algunas frutas y como la enzima dopa-β-monooxigenasa es soluble, la pigmentación que ocurre a la parte exterior de esta fruta no está expuesta al aire.

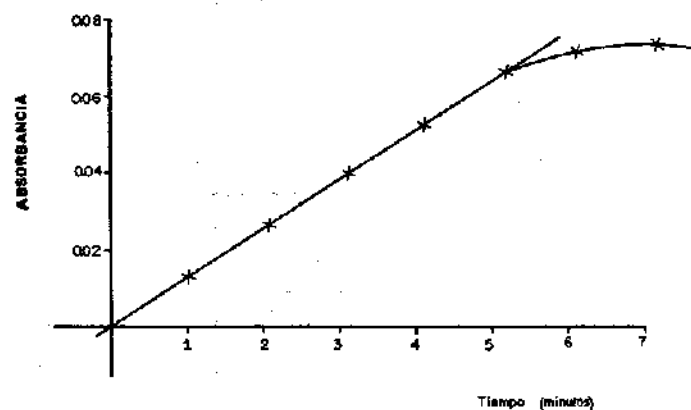


Figura 2.
Absorbancia vs. tiempo.

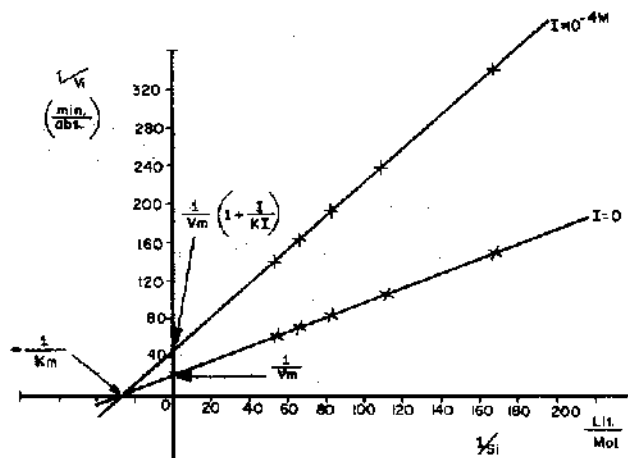


Figura 3.
Linha Wever y Burck.

BIBLIOGRAFIA

Boyer, R.F. 1977. *Journal of Chem. Ed.* 54, 585.

Braverman, J.B.S. 1967. *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos*. Ed. Omega S.A. España.

Friedman, M. R. & H. H. Daron. 1977. *Journal of Chem. Ed.* 54, 256.

Horowitz, N.H. & M. Fling. 1953. *Genetics*, 38, 360.

Joslyn, M. A. & D. Ponting. 1951. Enzyme-catalyzed oxidative Browning of fruit products. *Advance in Food Research*. 3.1.

Kertesz, Z.I. 1933. The Oxidase System of a Non-browning yellow peach. *N. Y. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.* 216

Lindet, M. 1895. Sur L'oxidation du tannin de la pomme á cidre, *Compt. Rend.* 120, 370.

Mhler, H. R. * E. H. Cordes. 1965. *Biological Chemistry* Ed. Harper & Row Cap. 16.

Onslow, M.W. 1920. Oxidizing enzymes III the oxidizing enzymes of some common fruit. *Biochem. Journal.* 14, 541.