

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE
PEPSINA PROVENIENTES DE SEMILLAS DE AMARANTO,
ARVEJA, CHOCHO, FRÉJOL, QUINUA O SANGORACHE,
MEDIANTE UN SISTEMA DE PURIFICACIÓN QUE EMPLEE
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROINDUSTRIAL**

DEYSI ESTEFANÍA TACO JARRÍN

(deysi.taco@epn.edu.ec)

DIRECTOR: ING. PATRICIO CASTILLO DOMÍNGUEZ, Ph.D.

(patricio.castillo@epn.edu.ec)

Quito, febrero 2018

© Escuela Politécnica Nacional (2018)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Deysi Estefanía Taco Jarrín, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

Deysi Estefanía Taco Jarrín

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Deysi Estefanía Taco Jarrín, bajo mi supervisión.

Ing. Patricio Castillo Domínguez, Ph.D.
DIRECTOR DEL PROYECTO

AUSPICIO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del proyecto PIS 15-15, "Diseño de un sistema de purificación basado en la afinidad de inhibidores de papaína, pepsina o carboxipeptidasa A, provenientes de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache", que se ejecutó en el Departamento de ciencias nucleares.

AGRADECIMIENTOS

Al culminar esta etapa de mi vida, quiero agradecer en primer lugar a Dios por haberme dado los padres que tengo, por llenarme de paciencia y sabiduría para cumplir con este objetivo.

A mis padres, por enseñarme valores y por cuidar de mí en todo momento, gracias papis por darme la oportunidad de realizarme como profesional. Sin duda esta es la recompensa a su esfuerzo diario. Gracias por creer en mí y darme todos los medios para alcanzar mis sueños.

A mis hermanos, Gabby y Eddy quienes siempre han confiado en mis capacidades y que me han alentado durante toda mi carrera. Ustedes han sido y serán siempre un gran respaldo para mí. Gabby, hermanuki, gracias por siempre alentarme a seguir adelante y por haberme dado un gran y lindo motivo para alcanzar esta meta y muchas otras, mi amado sobrino, Sebastián.

A mi novio, Jona, mi príncipe hermoso, siempre te estaré agradecida por toda la felicidad que le das a mi vida. Gracias por tu apoyo incondicional, por tu confianza y por tu amor sincero. Gracias por pertenecer a mi vida y sobre todo por tu ayuda en momentos difíciles. Por acompañarme en mis triunfos y sobre todo mil gracias por escucharme, aconsejarme y por secar mis lágrimas. Te Amo.

A mi director de tesis, Ing. Patricio Castillo, quién más allá de compartir sus conocimientos científicos me ha brindado su amistad incondicional. Gracias Doc. por haberme dado la oportunidad de ser su tesista y por siempre estar pendiente de mí.

A todas las personas que conforman el Departamento de Ciencias Nucleares, han sido tan buenas personas conmigo, les agradezco de todo corazón la amistad que me ofrecieron desde el día en que ingresé al departamento.

Al Inge Mauricio Mosquera, quien siempre estuvo pendiente de mí como amigo y

como profesional, muchas gracias inge por haber sido un buen amigo y ayudarme siempre en lo que ha podido hacerlo.

A Cristian Bernal, quien en calidad de pasante contribuyó al desarrollo de mi tesis. Muchas gracias Cris por tu apoyo y por tu amistad. A Cris Castro, Mablesita y Alexander por haber sido un buen equipo, por haber vivido y compartido lindas experiencias en el DCN.

A mis amigos y amigas, les agradezco infinitamente todo el tiempo compartido. Gracias por las sonrisas y los ánimos, de cada uno de ustedes me llevó una experiencia grata de esta universidad, gracias a mis muñes: Tannya, Vania y Jenny por haber sido tan buenas amigas durante nuestra carrera.

De manera especial, quiero agradecerles Vania y Sonia por haber sido partícipes de muchos momentos alegres y por escucharme siempre cuando más lo necesito. Gracias por sus consejos y por sus ánimos en todo momento, aunque no las vea seguido siempre serán mis mejores amigas. Gracias por tanto tiempo juntas.

Gracias a toda mi familia por haber compartido esta y muchas otras alegrías junto a mí. Gracias a mis tíos queridos Mónica, Elsa y Patricio, quienes siempre han estado pendientes de mi bienestar. Gracias por sus consejos y por confiar en mis capacidades desde que era niña. Mil gracias tíos.

Finalmente, quiero agradecer a todos los profesores que fueron parte de mi formación profesional, pues gracias a ellos soy lo que soy ahora. ¡Muchas gracias!

*Porque mis sueños son sus sueños, con mucho
cariño para mis padres Sara y Fabián.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
GLOSARIO	ix
NOMENCLATURA	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	xiii
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Proteasas	1
1.1.1 Generalidades	1
1.1.2 Clasificación	1
1.1.3 Pepsina	3
1.2 Inmovilización de enzimas	4
1.2.1 Generalidades	4
1.2.2 Selección del soporte de inmovilización	5
1.2.3 Tipos de inmovilización	5
1.3 Inhibición de proteasas	8
1.3.1 Familias de inhibidores proteolíticos	8
1.3.2 Tipos de inhibición	10
1.4 Purificación de inhibidores de proteasas	11
1.4.1 Ultrafiltración por exclusión de tamaño	11
1.4.2 Tratamiento calórico	11
1.4.3 Precipitación de proteínas por sulfato de amonio	12
1.4.4 Cromatografía de afinidad	12
1.5 Caracterización de inhibidores proteolíticos	14
1.5.1 Caracterización cinética	14
1.5.2 Caracterización molecular	19
2 PARTE EXPERIMENTAL	21
2.1 Materiales, equipos y reactivos	21
2.1.1 Materiales	21

2.1.2	Equipos	21
2.1.3	Reactivos	22
2.2	Selección de los extractos con mayor actividad inhibidora específica a partir de las semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache	23
2.2.1	Obtención de extractos acuosos de semillas seleccionadas de amaranto (<i>Amaranthus caudatus L.</i>), arveja (<i>Pisum sativum L.</i>), chocho (<i>Pisum sativum L.</i>), fréjol (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>), quinua (<i>Chenopodium quinoa willd</i>) y sangorache (<i>Amaranthus hybridus L.</i>)	23
2.2.2	Selección de los extractos acuosos con mayor actividad inhibidora frente a pepsina	24
2.3	Purificación parcial del extracto con mayor actividad inhibidora específica sobre pepsina	26
2.4	Selección del valor de pH de inmovilización de pepsina en DEAE-Sepharosa CL-6B	26
2.5	Purificación selectiva mediante cromatografía de afinidad de la fracción inhibidora purificada parcialmente	28
2.5.1	Preparación de la columna de afinidad	28
2.5.2	Diseño de un sistema de purificación del inhibidor más activo de pepsina presente en los extractos acuosos	29
2.6	Caracterización cinética y molecular del inhibidor más activo de pepsina	29
2.6.1	Caracterización cinética	29
2.6.2	Caracterización molecular	30
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1	Selección de los extractos con mayor actividad inhibidora específica obtenidos a partir de las semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache	31
3.2	Purificación parcial del extracto con mayor actividad inhibidora específica sobre pepsina	33
3.3	Selección del valor de pH de inmovilización de pepsina en DEAE-Sepharosa CL-6B	39
3.4	Purificación selectiva mediante cromatografía de afinidad de la fracción inhibidora purificada parcialmente	44
3.4.1	Cromatografía de afinidad	44
3.4.2	Diseño del sistema de purificación más activo sobre pepsina	48

3.5	Caracterización cinética y molecular del inhibidor más activo de pepsina	51
3.5.1	Caracterización cinética	51
3.5.2	Caracterización molecular	55
4	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
4.1.	Conclusiones	61
4.2.	Recomendaciones	61
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	ANEXOS	78

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Comparación de los métodos de inmovilización por enlace covalente y por adsorción	8
Tabla 3.1.	Cantidad de grasa removida en cada una de las harinas	31
Tabla 3.2.	Concentración de proteína presente en los extractos acuosos	32
Tabla 3.3.	Actividad enzimática (AE), actividad inhibidora (AI) y actividad inhibidora específica (AIE) presente en cada uno de los extractos acuosos	33
Tabla 3.4.	Resultados de [P], de la AI y de la AIE para el proceso de purificación parcial mediante ultrafiltración centrífuga	34
Tabla 3.5.	Resultados de la [P], de la AI y de la AIE para el proceso de purificación parcial mediante tratamiento calórico (TC)	35
Tabla 3.6.	Resultados obtenidos de [P], de AI y de AIE para el proceso de purificación parcial mediante precipitación salina (PS)	37
Tabla 3.7.	Resultados de EI_t (mg), AEI_t (U) y $RAFI_t$ (U) de la pepsina inmovilizada en la matriz DEAE-Sepharosa CL-6B	40
Tabla 3.8.	Análisis de varianza para la EI_t para cada inmovilización	41
Tabla 3.9.	Análisis de varianza para la $RAFI_t$ de cada inmovilización	42
Tabla 3.10.	Etapas de purificación realizadas al permeado de quinua	49
Tabla 3.11.	Etapas de purificación realizadas al retenido de quinua	50
Tabla 3.12.	Actividad proteolítica de pepsina a diferentes concentraciones de pepsina	52
Tabla 3.13.	Parámetros cinéticos de la pepsina en ausencia y en presencia del Lote P y del Lote R	54
Tabla 3.14.	Resultados de la K_i para el permeado y para el retenido	58
Tabla AII.1.	Concentración de proteína, volumen y masa del filtrado y lavados en la inmovilización a pH 2,0	87
Tabla AIV.1.	Concentración de proteína, AI, AIE y GP de las fracciones más activas del retenido del extracto de quinua	94

Tabla AIV.2. Concentración de proteína, AI, AIE y GP de las fracciones más activas del permeado del extracto de quinua	95
Tabla AV.1. Actividad proteolítica de pepsina en ausencia del inhibidor y en presencia del Lote P, medidas a diferentes concentraciones de caseína	96
Tabla AVI.1. Soluciones utilizadas en la electroforesis realizada para la caracterización molecular del inhibidor presente en el extracto acuoso de quinua	100
Tabla AVI.2. Composición de los geles separador y concentrador utilizados en la electroforesis para caracterizar los extractos acuosos	101

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1.	Inmovilización de enzimas. (A) Adsorción; B) Unión covalente; (C) Atrapamiento	6
Figura 1.2.	Cromatografía de afinidad	13
Figura 1.3.	Representación gráfica de la cinética de Michaelis-Menten	15
Figura 1.4.	Cinética hiperbólica	16
Figura 1.5.	Linealización de la ecuación de Michaelis-Menten, de acuerdo con el método de Lineweaver-Burk	17
Figura 1.6.	Gráfico de los dobles recíprocos propuesto por Lineweaver y Burk a) Inhibición competitiva; b) inhibición acompetitiva y c) Inhibición no competitiva	19
Figura 3.1.	Gráfico de Medias del GP obtenido con el permeado y con el retenido del extracto acuoso de quinua	38
Figura 3.2.	Concentración de proteína vs tiempo a diferentes pH de inmovilización de pepsina en la matriz DEAE-Sepharosa CL-6B	39
Figura 3.3.	Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para la cantidad de EI en DEAE-Sepharosa CL-6B	42
Figura 3.4.	Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para las unidades totales de RAF presentes en el preparado inmovilizado	43
Figura 3.5.	Concentración de proteína versus el número de fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del permeado del extracto acuoso de quinua	45
Figura 3.6.	Gráfico de la actividad inhibidora versus el número de fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del permeado del extracto acuoso de quinua	46
Figura 3.7.	Concentración de proteína versus el número de fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del retenido del extracto acuoso de quinua	47
Figura 3.8.	Gráfico de la actividad inhibidora versus el número de fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del retenido del extracto acuoso de quinua	48

Figura 3.9.	Diseño del sistema de purificación para los inhibidores presentes en el extracto acuoso de quinua	51
Figura 3.10.	Actividad enzimática de pepsina, lote inhibidor del retenido y lote inhibidor del permeado versus caseína a diferentes concentraciones	52
Figura 3.11.	Gráfico de los dobles recíprocos para el Lote R, para el Lote P y para la pepsina sin inhibidor	53
Figura 3.12.	Electroforesis SDS-PAGE para el extracto acuoso de quinua	56
Figura 3.13.	Electroforesis SDS-PAGE para los lotes inhibidores con su respectiva movilidad relativa	57
Figura 3.14.	Curva de calibración de movilidad relativa de las bandas generadas en el estándar	58
Figura 3.15.	Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para la Ki del retenido y del permeado del extracto de quinua	59
Figura AI.1.	Esquema del proceso para la medición de actividad proteolítica	79
Figura AI.2.	Esquema del proceso de desengrasado de harinas	80
Figura AI.3.	Esquema del proceso de inmovilización de pepsina	82
Figura AI.4.	Esquema del proceso de obtención de extractos acuosos a partir de semillas seleccionadas	83
Figura AI.5.	Cromatografía de afinidad para purificación del extracto de quinua	84
Figura AV.1.	Linealización del modelo Michaelis-Menten para la pepsina con y sin inhibidor.	97

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I	
Diagramas de flujo de procesos realizados	79
ANEXO II	
Ejemplo de cálculo del valor total y porcentaje de enzima inmovilizada, de actividad de enzima inmovilizada, de retención de actividad funcional y de actividad proteolítica específica	85
ANEXO III	
Ejemplo de cálculo de la actividad inhibidora (AI), actividad inhibidora específica (AIE) y grado de purificación (GP)	91
ANEXO IV	
Fracciones más activas presentes en la cromatografía de afinidad con sus respectivas mediciones de [P], AI, AIE y GP	94
ANEXO V	
Ejemplos de cálculos para la determinación de los parámetros cinéticos del inhibidor purificado	96
ANEXO VI	
Preparación de los geles y soluciones utilizadas en la electroforesis	100

GLOSARIO

Cromatografía: es una técnica que se aplica para separar biomoléculas, ya sea por interacción específica, por cargas netas superficiales, por carácter hidrofóbico o por tamaños moleculares (Ritchie, 2012, p. 1).

DEAE-Sepharosa 6B-CL: es un intercambiador aniónico que designa a la dietil amino etil como (DEAE). Se une al gel Sepharosa CL-6B mediante enlaces éter para darle el intercambio iónico deseable (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2006, pp. 1-2).

Enlace iónico: es el enlace químico que se forma por transferencia de electrones (Burns, 2003, p. 215).

Ligando: puede ser una molécula o el sustrato que se une de manera específica a una proteína (Lodish et al., 2005, p. 92).

Pepstatina: es un inhibidor de aspártico proteasas que inhibe enzimas como la pepsina y la catepsina D (Takahashi, 1995, p. 497).

Punto isoeléctrico: es aquel pH en el cual las proteínas poseen una carga neta nula. Como consecuencia de ello, las proteínas precipitan debido a que su solubilidad es mínima (Martínez y Grajera, 2008, p. 376; Serpa, Hicanpié y Álvarez, 2014, p. 30).

NOMENCLATURA

A	Absorbancia
AE	Actividad enzimática o actividad proteolítica
AEE	Actividad enzimática específica
AI	Actividad inhibidora
AIE	Actividad inhibidora específica
DEAE	Dietil amino etil
DO	Densidad óptica
GP	Grado de purificación
IP	Inhibidores proteolíticos
Ki	Constante de inhibición
Km	Constante de Michaelis–Menten
PE	Pepsina
PM	Peso molecular
U	Unidad de actividad enzimática
V_{máx}	Velocidad máxima
%AEI	Porcentaje de actividad de enzima inmovilizada
%EI	Porcentaje de enzima inmovilizada
%RCP	Porcentaje de rendimiento de cantidad de proteína
%RAI	Porcentaje de rendimiento de actividad inhibidora
%RAF	Porcentaje de retención de actividad funcional
[P]	Concentración de proteína
[S]	Concentración de sustrato
CL–6B	Reticulado de agarosa al 6 %

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la obtención de inhibidores de pepsina a partir de semillas certificadas de amaranto (*Amaranthus caudatus* L., var. I-Alegría), arveja (*Pisium sativum*, var. I.-432-Lojanita), chocho (*Lupinus mutabilis*, var. I-450-Andino), fréjol (*Phaseolus vulgaris*, var. I-481-Rojo del valle), quinua (*Chenopodium quinoa*, var. I-Tunkehuano) o sangorache (*Amaranthus hybridus* L.).

En una primera etapa, se obtuvieron las harinas mediante la molienda de cada semilla y se desengrasaron con 1-propanol. A partir de las harinas desengrasadas, se obtuvieron los extractos acuosos para cada una de ellas y se determinó el extracto con mayor actividad inhibidora sobre pepsina, mediante la medición de actividad proteolítica con caseína, como sustrato, en presencia y ausencia del extracto.

El extracto de quinua presentó la mayor actividad inhibidora específica, con un valor de 9,67 U/mg. Posteriormente, el extracto se purificó de manera parcial mediante diferentes técnicas que implicaron: ultrafiltración para la separación de proteínas por pesos moleculares, tratamiento calórico para la desnaturalización de las proteínas menos estables y uso de sulfato de amonio para lograr la precipitación diferenciada de proteínas.

A continuación, se realizó la purificación de los inhibidores, tanto del retenido como del permeado de la ultrafiltración de 10 kDa, mediante cromatografía de afinidad. Para ello, se inmovilizó pepsina por intercambio iónico en una matriz aniónica (DEAE-Sepharosa CL-6B). Con un diseño experimental completamente al azar, se evaluaron 4 valores de pH (2,0; 2,2; 3,0 y 4,0). El pH óptimo para lograr esta inmovilización fue de 2,0. A este valor de pH se obtuvo una RAF de 728 U totales y de EI de 24,72 mg, que equivalen a 39,14 % y 57,92 %; respectivamente.

Se diseñó un solo sistema de purificación para el retenido y para el permeado del extracto de quinua. El diseño contó con una etapa de purificación de ultrafiltración, a 10 kDa; tratamiento calórico a 60 °C, durante 30 min; y, precipitación salina con

sulfato de amonio en un rango de saturación entre 40 y 70%. Se lograron grados de purificación de 1,06; 1,95 y 2,44 veces, respectivamente para el retenido, mientras que para el permeado se obtuvieron grados de purificación de 1,07; 1,48 y 2,39 veces, respectivamente.

Posteriormente, en la cromatografía de afinidad se logró un GP de 13,65 veces para el permeado y 13,72 veces para el retenido. Se juntaron las fracciones con mayor AI y se procedió a caracterizar cinética y molecularmente. Se determinó que los inhibidores encontrados en las fracciones del retenido y del permeado de quinua correspondían a un mismo inhibidor no competitivo con una K_i promedio de $0,091 \pm 0,005 \mu\text{M}$ con un peso molecular aproximado de 9,5 kDa.

INTRODUCCIÓN

Los inhibidores proteolíticos de plantas (IPP) son moléculas proteicas de bajo peso molecular, que se encuentran en las semillas y partes aéreas de cereales y leguminosas. Los IPP actúan como defensa de las plantas ante ciertas plagas. Es por ello que sirven como método alternativo para el tratamiento y control de enfermedades y plagas. Los IPP pueden constituirse en factores antinutricionales, ya que son capaces de alterar algunas funciones fisiológicas, como la digestión. Al afectar la actividad de las enzimas responsables de estas funciones, por ejemplo en los insectos, pueden controlar plagas, que a nivel mundial son el problema de muchos agricultores. Por su aplicación específica, son ampliamente utilizados en biotecnología, agricultura y medicina. (García, 2014, pp. 2-5; Ryan, 1990, pp. 427- 429).

La aplicación de IPP evitará o reducirá el uso de pesticidas sintéticos, que son tóxicos para la salud del ser humano y para la conservación del ambiente (Rocha y García, 2008, pp. 50-56).

Para las distintas aplicaciones biotecnológicas se requieren IPP con un alto grado de pureza y que mantengan la mayor parte de su actividad biológica (Fan y Wu, 2005, pp. 275-280). Una alternativa empleada para obtener inhibidores proteolíticos puros es la cromatografía de afinidad (Werner, 2008, p. 107). La cromatografía de afinidad requiere matrices enzima-inhibidor específicas, sintetizadas a partir de polímeros insolubles, como la agarosa (sepharosa), que puede unirse covalentemente o no con las enzimas (Rodríguez, Perdomo y Perera, 2012, p. 4).

Existen enzimas con pI bajos, como la pepsina, que no pueden adherirse a este tipo de polímeros mediante enlace covalente entre sus grupos aminos y los grupos carbonilos de la sepharosa (Salazar, Lizardi, Ramírez, García y Ezquerra, 2014, p. 132). Si surge la necesidad de inmovilizar pepsina en sepharosa de una manera alternativa, se puede emplear el intercambio aniónico para fijar la enzima y lograr su inmovilización, con un alto grado de retención de su actividad funcional (Arroyo, 1998, p. 33).

De esta manera, se podrán obtener y caracterizar inhibidores purificados de pepsina, provenientes de semillas del Ecuador, mediante un sistema de purificación que involucre cromatografía de afinidad y permita aportar al conocimiento de las aspártico proteasas, enzimas que no han sido estudiadas en gran escala; pero que han incrementado su interés debido a que la proteasa del VIH se encuentra dentro de esta familia (Rege, Ambaye y Chowdhary, 2014, pp. 178-180).

Para cumplir con el propósito global de esta investigación, se establecieron los siguientes objetivos específicos: seleccionar los extractos parcialmente purificados de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache con mayor actividad inhibidora específica sobre pepsina; determinar el valor de pH de inmovilización que permita obtener una alta cantidad de pepsina inmovilizada con la mayor actividad funcional, en la matriz preparada; purificar selectivamente los extractos inhibidores seleccionados, mediante cromatografía de afinidad en una matriz de pepsina-DEAE-Sepharosa CL-6B y caracterizar cinética y molecularmente la fracción inhibidora purificada que presente la mayor actividad inhibidora específica sobre pepsina

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 PROTEASAS

Las enzimas proteolíticas, denominadas también proteasas, son aquellas encargadas de catalizar la degradación de las proteínas, mediante la hidrólisis de sus enlaces peptídicos (Errasti, 2013, p. 9). Además, son las responsables de varias funciones, que van desde la biosíntesis hasta la degradación de las mismas (Hernández, Carvajal, Márquez y Chávez, 2004, p. 95).

1.2 GENERALIDADES

Las enzimas son cada vez más utilizadas a escala industrial, debido a que ayudan a catalizar una gran cantidad de procesos, con ventajas que no pueden ofrecer los catalizadores no biológicos, como la elevada actividad catalítica y especificidad de sustrato que presentan; además, son muy activas a condiciones moderadas de temperatura ambiente y presión atmosférica (Arroyo, 1998, p. 1).

1.3 CLASIFICACIÓN

Las enzimas pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan. Dentro de esta clasificación se tiene a las oxidoreductasas, que catalizan reacciones de óxido-reducción; las transferasas, que se involucran en la transferencia de grupos funcionales; las hidrolasas, que ocasionan la ruptura de enlaces C-O, C-N, O-P y C-S; las liasas, que catalizan reacciones en las cuales se rompen enlaces C-O, C-C y C-N en ausencia de agua, con pérdida de grupos funcionales y formación de dobles enlaces; las isomerasas; que catalizan reacciones de isomerización; y, las ligasas, que permiten la formación de enlaces en presencia de moléculas de ATP (Garrido, Teijón, Blanco, Villaverde, Mendoza y Ramírez, 2006, pp. 193-197).

De acuerdo con el tipo de hidrólisis de las proteínas, las peptidasas se clasifican

como exopeptidasas y endopeptidasas. Las endopeptidasas rompen las uniones entre aminoácidos internos de la cadena; mientras que, las exopeptidasas son aquellas que separan aminoácidos terminales en las cadenas de aminoácidos (Hill, Wyse y Anderson, 2004, p. 32). Entre las endopeptidasas se tiene a la pepsina y entre las exopeptidasas, a la carboxipeptidasa A (Martínez y Gragera, 2008, p. 606; Unglaub, Ober, Garrison, Silverthorn y Johnson, 2007, p. 695).

Según el mecanismo catalítico que poseen, las enzimas proteolíticas se clasifican en cuatro grupos principales que son las serino proteasas, las cisteíno proteasas, las metalo proteasas y las aspártico proteasas. Sin embargo, actualmente se han descrito dos grupos más de enzimas proteolíticas que son las proteasas glutámicas y las treonino proteasas (Fullana, 2014, p. 10).

Las serino proteasas se caracterizan por tener dentro de su sitio activo un residuo de Ser, responsable del mecanismo catalítico de este tipo de enzimas. Las serino proteasas están involucradas en varios procesos biológicos como la digestión y la coagulación de la sangre. Dentro de este grupo, se encuentran la tripsina y la quimotripsina (Fullana, 2014, p. 11; Di Cera, 2009, p. 510).

Las cisteíno proteasas poseen en su centro catalítico un residuo de Cys, (Jordan, Galindo, Ceña y González, 2000, p. 333). Este tipo de proteasas son responsables de la hidrólisis de proteínas como la hemoglobina; de la invasión de células sanguíneas y del procesamiento de proteínas. Al desempeñar varias funciones, se relacionan con la generación de enfermedades cardiovasculares y del cáncer. Dentro de este grupo se encuentra la papaína (Sjöberg y Shi, 2011, pp. 143-144; Verma, Dixit y Pandey, 2016, p. 1).

Dentro de las metalo proteasas se tienen endo y exo enzimas. Dependen de metales divalentes, como el Zn^{+2} , para llevar a cabo su acción (Pascual, Moreno, Ros y Vargas, 2015, p. 86). Son producidas por varios tipos celulares como el músculo liso. Un ejemplo de exopeptidasa es la carboxipeptidasa A (Coronato, Laguens y Girolamo, 2012, p. 496; Rodríguez, Orbe y Páramo, 2007, p. 960), dependiente del zinc, que se encuentra en su centro activo para activar una molécula de agua, que

ataca al grupo carbonilo del enlace peptídico (Berg, Tymoczko y Stryer, 2007, p. 253).

Las aspártico proteasas poseen en su centro activo dos residuos de ácido aspártico. Este centro activo propicia una etapa de protonación. Además, estos dos residuos actúan sobre enlaces peptídicos que enlazan residuos de gran tamaño o aromáticos (Pascual et al., 2015, p. 86). Los residuos Asp, crean enlaces en una molécula de agua, que actúa como puente. Es por ello que su mecanismo catalítico es de tipo ácido-base. Las aspártico proteasas se caracterizan por ser activas a valores de pH ácidos y por ser inhibidas por pepstatinas (Tramontin, 2014, p. 11; Voet y Voet, 2006, pp. 555-556). Son enzimas encargadas de varios procesos fisiológicos como la digestión de proteínas, pero también son las responsables de algunas enfermedades como las úlceras gastrointestinales. Dentro de las principales aspártico-proteasas se encuentran la pepsina, la gastrina y la renina (Vizoso, Vázquez, Martín, Lamelas, Rodríguez y Alonso, 2002, pp. 123-124).

Las proteasas glutámicas poseen un centro catalítico dual, que contiene un residuo de ácido glutámico y otro de glutamina. Por otro lado, las treonino proteasas poseen en su centro activo una triada de residuos de treonina, ácido glutámico o aspártico y lisina (Pascual et al., 2015, p. 86).

1.4 PEPSINA

La pepsina (3.4.23.1), PE, es una enzima proteolítica que forma parte de la mucosa gástrica. Es una de las tres principales enzimas proteolíticas del sistema digestivo, las otras dos son la quimosina, también denominada renina, y la tripsina. Tiene como función degradar las proteínas que se encuentran en los alimentos. Su forma inactiva se denomina pepsinógeno (Campos y Sancho, 2003, p. 89).

La PE es una proteína monomérica, que posee un peso molecular de 34,5 kDa y está formada por un alto porcentaje de residuos ácidos. Posee una cadena polipeptídica sencilla que contiene 327 restos de aminoácidos. Su centro activo está formado por los residuos Asp32 y Asp215 (Fersht, 1980, p. 319; Campos y Sancho,

2003, p. 89).

Para que sea activa se requiere protonar en su centro catalítico uno de sus dos residuos de aspartato y desprotonar el otro (Worthington Biochemical Corporation, 2017). Esto se debe a que los residuos de Asp32 y Asp215 poseen valores de pKa lejanos entre sí. El pKa del Asp32 es de 1,4 y el pKa del Aps215 es de 4,5 (Antonov, Ginodman, Kapitannikov, Barshevskaya, Gurova y Rumsh, 1978, p. 87).

La PE es activada en ambientes ácidos como el del estómago; mientras que, en un ambiente neutro y a pH básico se desnaturaliza completamente (Meridor y Gedanken, 2014, p. 67). El rango de pH en el cual esta enzima mantiene una alta actividad proteolítica oscila entre 2 y 3 (Dev, Strugala y Dettmar, 2011, p. 3).

Dentro de los principales usos que tiene la pepsina se encuentra la fabricación de quesos y el análisis de proteínas. En adición a estos usos, la pepsina es empleada en la industria del cuero, pues permite remover el pelo del animal y tejidos proteicos residuales, aún presentes después del lavado (Meridor y Gedanken, 2014, p. 67).

Para ser utilizada a nivel biotecnológico, la PE ha sido inmovilizada en diferentes medios. Por ejemplo, se ha inmovilizado en resinas, geles y polisacáridos (Patel y Kharat, 2012, p. 5 016). La inmovilización de PE en quitosano, por entrecruzamiento con glutaraldehído, ha permitido mantener la estabilidad estructural de la enzima y evitar su desnaturalización a altas temperaturas, ya que conserva un 60 % de la actividad proteolítica a 50 °C (Salazar et al., 2014, pp. 141-145).

1.2 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

1.2.1 GENERALIDADES

La inmovilización es un proceso que permite confinar una enzima en una región determinada, con la finalidad de retener su actividad catalítica y de reutilizarla varias veces (Arroyo, 1998, p. 2). La importancia de realizar una inmovilización de enzimas

radica en que permite mejorar su estabilidad, lo cual conlleva a que sea utilizada en varios ámbitos, como por ejemplo industrial, biotecnológico, alimentario, entre otros.

Para realizar inmobilizaciones enzimáticas existen métodos físicos y químicos. Entre los métodos físicos, se pueden mencionar a la unión por adsorción, el atrapamiento e inclusión en membranas; mientras que, dentro de los métodos químicos, se encuentran la unión covalente a soportes y el reticulado (Meridor y Gedanken, 2014, p. 68).

1.2.2 SELECCIÓN DEL SOPORTE DE INMOVILIZACIÓN

Para que se dé una buena inmobilización enzimática, es necesario que se seleccione un adecuado soporte para inmobilizar, de acuerdo con la resistencia física a la compresión y al ataque microbiano, la hidrofiliidad, la biocompatibilidad y el bajo costo (Ochoa *et al.*, 2011, p. 51). Para la matriz de inmobilización se utilizan diversos materiales, los más comunes son los polisacáridos (Nisha, Karthick y Gobi, 2012, p. 148).

La agarosa ha sido utilizada como soporte en diversas inmobilizaciones (Roldán, Blasco, Huertas, Caballero, Moreno y Luque, 2005, p. 306), porque es un soporte poroso que permite una alta captación enzimática (Ochoa *et al.*, 2011, p. 52); que, además, posee carácter hidrofílico que facilita, de ser necesaria, la unión de la coenzima con la apoenzima; no posee grupos con carga, lo cual evita una adsorción no específica de la enzima; es de fácil obtención y de bajo costo (Guijarro, 2013, p. 9).

1.2.3 TIPOS DE INMOVILIZACIÓN

Como se dijo anteriormente, existen diferentes métodos de inmobilización enzimática, entre los cuales los más utilizados son la adsorción, la unión covalente y el atrapamiento (Romero, Mejía, Sánchez, Balagurusamy y Luévanos, 2014, p. 2).

En la Figura 1.1. se esquematizan estos tres tipos de inmovilización.

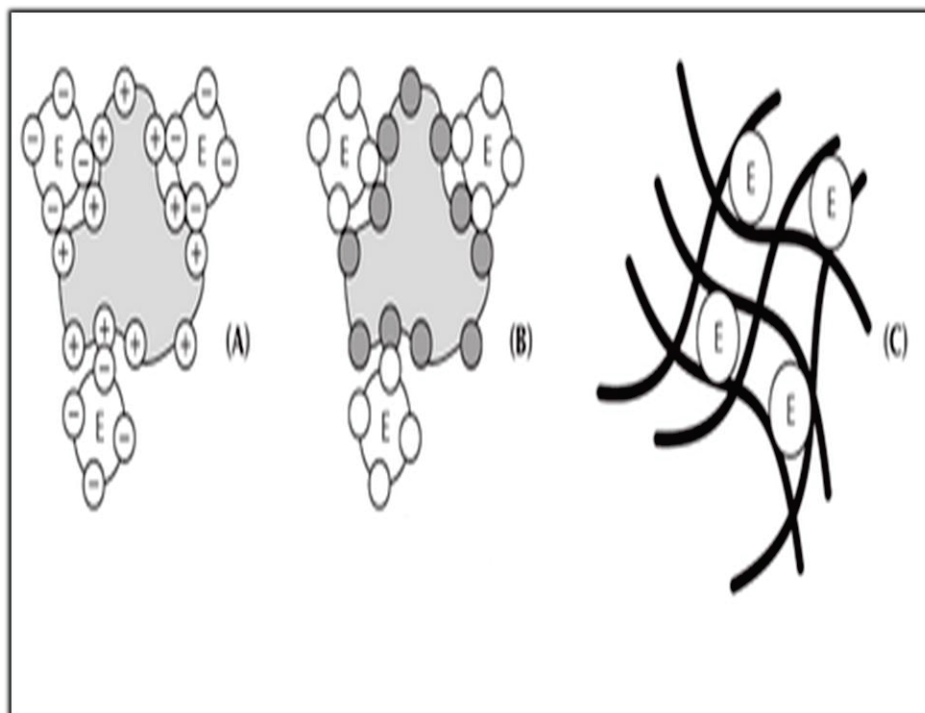


Figura 1.1. Inmovilización de enzimas. (A) Adsorción; (B) Unión covalente; (C) Atrapamiento
(Roldán et al., 2005, p. 306)

La inmovilización por enlace covalente es uno de los métodos más utilizados para inmovilizar enzimas, el cual generalmente involucra la unión de la enzima soluble a un soporte insoluble. Se activan los grupos químicos del soporte para que reaccionen con los nucleófilos de las proteínas (Romero et al., 2014, p. 2).

Se genera una unión estable y fuerte entre los grupos funcionales de los residuos de aminoácidos de la enzima y los grupos funcionales de la superficie de la matriz de inmovilización. Los grupos funcionales de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que pueden participar en esta unión son los grupos amino ($-\text{NH}_2$), hidroxilo ($-\text{OH}$) y carboxilo ($-\text{COOH}$) (Nisha, Karthick y Gobi, 2012, p. 148).

La inmovilización por adsorción corresponde a un método de inmovilización reversible, debido a que bajo condiciones diferentes se puede desprender la enzima inmovilizada. La adsorción puede ser física o por intercambio iónico. En la adsorción

física la unión se da gracias al contacto de la enzima con un adsorbente activo, el cual atrae y retiene a la enzima por medio de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals.

Por otro lado, la adsorción de enzimas por intercambio iónico se da por la combinación de interacciones salinas e hidrofóbicas. Para lo cual se emplean geles de intercambio iónico, como el DEAE-Sephadex que actúa como un intercambiador aniónico; o, las resinas de intercambio iónico, DEAE-Sepharosa, CM-Sepharosa, sílica gel y óxido de aluminio (Roldán et al., 2005, p. 306; Guisan, 2006, pp. 23-24; Romero et al., 2014, p. 2).

Por ejemplo, el intercambiador aniónico DEAE-Sepharosa CL-6B ha sido utilizado para inmovilizar la enzima ácida β -Galactosidasa fúngica, en un estudio de obtención y caracterización de un biocatalizador para tratar un efluente de la industria lechera. La enzima fue inmovilizada en el soporte por adsorción iónica. Con este proceso, se obtuvo un porcentaje de actividad enzimática inmovilizada del 60 % y un porcentaje de retención de actividad funcional del 99 % (Zamisch y Batista, 1999, pp. 106-107).

Este tipo de inmovilización se produce cuando la solución de enzima se pone en contacto con un soporte adsorbente por un determinado tiempo (2 – 48 h), para después lavar el soporte y retirar la enzima que no haya sido inmovilizada. La ventaja de esta inmovilización radica en que se retienen altos porcentajes de la actividad proteolítica de la enzima inmovilizada. Sin embargo, la unión al soporte es muy susceptible a cambios en pH, temperatura y fuerza iónica (Ochoa *et al.*, 2011, p. 49).

En la Tabla 1.1. se muestra una comparación entre las características fundamentales de la inmovilización por enlace covalente y la inmovilización por adsorción a resinas de intercambio iónico.

Tabla 1.1. Comparación de los métodos de inmovilización por enlace covalente y por adsorción

CARACTERÍSTICA	INMOVILIZACIÓN POR ENLACE COVALENTE	INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN
Preparación	Compleja	Sencilla
Costo	Alto	Bajo
Intensidad de la unión	Fuerte	Débil
Pérdida de enzima	No	Sí
Aplicabilidad	Selectiva	Amplia
Protección microbiana	No	No
Problemática principal	Alto costo y poca cantidad de enzima para inmovilizar	Pérdidas de enzima

(Roldán *et al.*, 2005, p. 308)

1.3 INHIBICIÓN DE PROTEASAS

1.3.1 FAMILIAS DE INHIBIDORES PROTEOLÍTICOS

Debido a que las enzimas proteolíticas en altas concentraciones pueden afectar de manera patogénica a un organismo, se debe controlar su actividad. Una forma de controlarla radica en la interacción de la enzima activa con proteínas que inhiban su actividad de manera específica (Habib y Majid, 2007, p. 69). Entonces, para lograr que disminuya la actividad proteolítica de una enzima se requiere de IP. Los cuales se clasifican dentro de las siguientes familias: Kunitz, Bowman-Birk, Arrowhead, Papa o Patata, Rapeseed, Squash, entre otros (Paiva, Pontual, Coelho y Napoleão, 2013, p. 642).

Los inhibidores Kunitz poseen un peso molecular que oscila entre 18 y 22 kDa (Paiva, Pontual, Coelho y Napoleão, 2013, p. 642). Generalmente, inhiben a las serino proteasas, pero también inhiben a las cisteíno y aspártico proteasas. Se encuentran de manera abundante en el reino vegetal, especialmente en legumbres y cereales. Poseen un sitio activo y dos puentes disulfuro. Como ejemplo de las proteasas que inhiben se tiene, como aspártico proteasa a la catepsina D; como cisteíno proteasa, a la papaína; y, como serino proteasa, a la tripsina (Habib y Majid, 2007, p. 74).

Los inhibidores Bowman-Birk son altamente estables debido a que poseen dos puentes disulfuro. Tienen dos sitios reactivos que pueden unirse a dos proteasas o a dos moléculas pertenecientes a una misma enzima (Paiva, Pontual, Coelho y Napoleão, 2013, p. 642). Por lo general, se encuentran en semillas, pero también se han encontrado en hojas. Los que provienen de semillas de plantas dicotiledóneas presentan una cadena polipeptídica de 8 kDa. Su sitio activo es específico para tripsina, elastasa y quimotripsina (Habib y Majid, 2007, p. 73). Los inhibidores provenientes de semillas de monocotiledóneas son de dos tipos. El uno posee un sitio activo y presenta una cadena polipeptídica de alrededor de 8 kDa; mientras que, el otro tipo tiene una cadena polipeptídica de 16 kDa y presenta dos sitios reactivos (Habib y Majid, 2007, p. 74).

Los inhibidores Arrowhead se componen de 179 residuos de aminoácidos, con 3 puentes disulfuro. Presentan inhibición frente a las serino proteasas como la tripsina y la quimotripsina. No poseen una secuencia homóloga en su estructura (Xie, Luo, Xu y Chi, 1997, p. 5 846).

Los inhibidores de Papa o Patata han sido descubiertos en el tomate y en la papa. Presentan inhibición ante las serino proteasas como la quimotripsina (Turra y Lorito, 2011, p. 374). Los que pertenecen al tipo I son monoméricos, con un peso molecular de alrededor de 8 kDa y no poseen puentes disulfuro. Por otro lado, los inhibidores de tipo II se componen de diversas unidades de repetición, que varían entre uno y ocho. Presentan especificidad frente a quimotripsina y elastasa (Jamal, Pandey, Singh y Khan, 2013, p. 16).

Los inhibidores Rapeseed son inhibidores de las serino proteasas, provenientes de la canola (*Brassica napus*), planta rica en proteína. Están compuestos por péptidos cuyo peso molecular oscila entre 6,1 y 8,4 kDa, unidos por puentes disulfuro (Ceciliani, Bortolotti, Menegatti, Ronchi, Ascenzi y Palmieri, 1994, p. 221; Vioque, Sánchez, Clemente, Pedroche, Mar y Millán, 2000, p. 81).

Los inhibidores Squash, que poseen de 27 a 34 residuos, pertenecen a una de las

familias de inhibidores con peso molecular más pequeño que existe frente a las serino proteasas. Participan en mecanismos de defensa frente a insectos, patógenos o plagas. Contienen 6 residuos de cisteína y 3 puentes disulfuro en su estructura (Chiche et al., 2004, pp. 341 y 342).

1.3.2 TIPOS DE INHIBICIÓN

La inhibición de la actividad enzimática tiene dos mecanismos, la irreversible y la reversible. Se denomina irreversible a aquella inhibición en la cual el inhibidor se une de manera covalente a la enzima, esta unión es muy fuerte y su disociación es lenta. Por el contrario, la inhibición reversible disocia rápidamente el complejo enzima-inhibidor (EI); dentro de este tipo de inhibición, se tiene la inhibición competitiva, acompetitiva y no competitiva (Moran, Horton, Scrimgeour y Perry, 2012, pp. 149-151; Voet, Voet y Pratt, 2013, pp. 374-377).

En la inhibición competitiva, el sustrato y el inhibidor se unen a la enzima libre en el mismo sitio, por lo cual ambos compiten por él. En la inhibición acompetitiva, el inhibidor se une únicamente al complejo enzima-sustrato (ES) (Moran et al., 2012, p. 149). Mientras que, en la inhibición no competitiva, en contraste con la inhibición competitiva, el inhibidor no se une al mismo sitio al que se une el sustrato (Donoso, 2006, p. 4); la unión a la enzima se da en un lugar diferente al sitio activo, lo cual modifica la estructura tridimensional de la enzima (Prendes, Garzón y Castillo, 2010, p. 120). Sin embargo, se impide la formación de productos. Esto se debe a que la afinidad de la enzima por el sustrato se mantiene, por lo cual su disociación se dificulta (Jacubowski, 2017). Además, la inhibición no competitiva puede ser no competitiva pura o mixta, no competitiva acompetitiva y no competitiva competitiva.

Se tiene una inhibición no competitiva pura cuando el inhibidor se une a la E y al complejo ES con igual afinidad; en la inhibición no competitiva-acometitiva el inhibidor se une al complejo (ES) y en la inhibición no competitiva-competitiva el inhibidor se une a la enzima libre (Voet et al., 2013, pp. 374-376).

1.4 PURIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

Para estudiar la estructura y el mecanismo de acción de un inhibidor proteolítico es necesario purificarlo. Para ello, se necesita tener a los inhibidores aislados con base en sus diferencias físicas o químicas. Entre las características que se toman en cuenta para aislar a un inhibidor están el tamaño y la afinidad que tiene de unión a ligandos específicos (Lodish et al., 2005, p. 86).

Para purificar inhibidores de proteasas se tienen varias técnicas, las cuales pueden ser de baja ó de alta resolución. Dentro de las de baja resolución se tiene a la ultrafiltración por exclusión molecular, al tratamiento calórico y a la precipitación de proteínas con sales como sulfato de amonio; mientras que, en las de alta resolución se tiene a la cromatografía que puede ser de afinidad, por exclusión de tamaño o por intercambio iónico (Devlin, 2004, pp. 140-145; Koolman y Röhm, 2004, p. 78).

1.4.1 ULTRAFILTRACIÓN POR EXCLUSIÓN DE TAMAÑO

La ultrafiltración centrífuga es una técnica que permite separar proteínas por sus pesos moleculares, a través de membranas semipermeables con tamaño de poro conocido. Con este tipo de purificación de proteínas se obtienen dos fases: el permeado y el retenido (Baynes y Dominiczak, 2011, p. 15).

Las proteínas de mayor peso molecular se quedan retenidas; mientras que, las de menor peso conforman el permeado (Almécija, 2007, p. 56). Esta técnica permite concentrar, separar y fraccionar las proteínas. La separación se debe a la presión o a la aplicación de una fuerza centrífuga sobre la disolución (Kubota, Hashimoto y Mori, 2008, p. 104).

1.4.2 TRATAMIENTO CALÓRICO

Los inhibidores de proteasas pueden ser purificados mediante la aplicación de calor. Sin embargo, al ser proteínas pueden desnaturalizarse si sobrepasan una

temperatura o tiempo de aplicación de calor. Los IPP son estables a temperaturas que oscilan entre los 60 y 80 °C, esto depende del tipo de variedad que se utilice y demás factores agronómicos propios de las semillas, como por ejemplo la época de cosecha (Voet y Voet, 2006, p. 137).

Por tal motivo, el tratamiento calórico es una vía de purificación de IPP, debido a que se logra la eliminación de otras proteínas poco estables presentes en los extractos acuosos (Voet y Voet, 2006, p. 137). Por lo cual, se recomienda para purificar inhibidores proteolíticos obtenidos a partir de semillas, se caliente a 60 °C, durante unos 30 min (Elizalde, Porrilla y Chaparro, 2009, p. 49).

1.4.3 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS POR SULFATO DE AMONIO

Otro de los tratamientos que se aplica para purificar proteínas es la precipitación salina. Por lo general, se utiliza sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, debido a que es una sal altamente soluble, lo cual permite que las proteínas se fraccionen según su solubilidad (Koolman y Röhm, 2004, p. 78). La cantidad de sulfato de amonio que se agrega a la solución depende de la proteína que se desee purificar. Una vez realizado este tipo de precipitación, la solución queda con altas concentraciones de sal, por tal motivo se debe eliminar la sal de las muestras. Esta eliminación se puede realizar por varias técnicas, como por ejemplo: ultrafiltración centrífuga con membranas de bajo tamaño de poro o mediante diálisis (Duong y Gabelli, 2014, p. 87).

1.4.4 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

Existen varios tipos de cromatografía, entre los más importantes se encuentran la cromatografía de afinidad, de exclusión molecular y de intercambio iónico.

La cromatografía de afinidad es una técnica de purificación de proteínas de alta resolución. Consiste en pasar una fase móvil por una fase estacionaria para que la

proteína de interés se una de forma reversible y específica a la fase estacionaria. Esta fase puede estar constituida por geles de sepharosa modificados (Ritchie, 2012, p. 5). Esta técnica aprovecha las propiedades de especificidad que tienen las proteínas para unirse a otras moléculas, como por ejemplo sustratos o inhibidores proteolíticos (Brandt, Anderka, Kieb, Ridinger y Plenikowski, 2008, p. 107).

En la Figura 1.2. se representa gráficamente la cromatografía de afinidad inmunológica con anticuerpos como ligandos y su posterior elución.

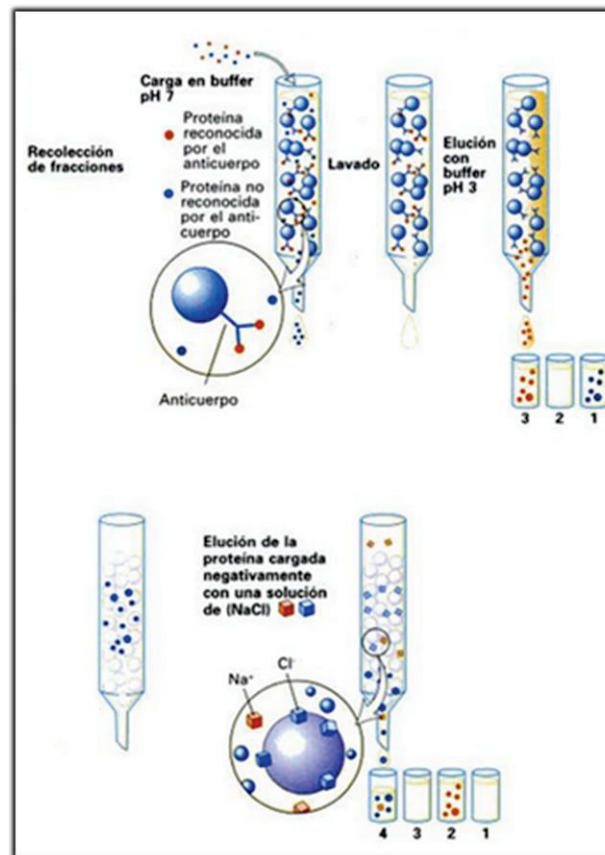


Figura 1.2. Cromatografía de afinidad
(Lodish et al., 2005, p. 91)

La cromatografía de afinidad tiene la capacidad de unir proteínas de manera específica a moléculas del ligando. El soporte de cromatografía contiene al ligando. Las proteínas que han sido ligadas al soporte son eluidas al variar la concentración de sal y/o al cambiar el valor de pH. La capacidad de separación de proteínas mediante esta técnica depende del ligando que se ha seleccionado (Lodish et al., 2005, p. 92).

La matriz utilizada en el relleno de la columna cromatográfica debe ser altamente porosa. Además, para asegurar la unión covalente del ligando con la matriz, debe tener un elevado número de grupos funcionales (Voet, et al., 2013, p. 102).

Como se mencionó en el acápite 1.4., se tienen diferentes tipos de cromatografía. La cromatografía de exclusión molecular consiste en separar proteínas de acuerdo con su tamaño en un gel poroso. Las proteínas que eluyen primero son las de mayor tamaño; mientras que, las pequeñas se demoran en eluir debido a que penetran las porosidades del gel (Devlin, 2004, p. 143).

Por otro lado, se tiene la cromatografía por intercambio iónico. Esta cromatografía consiste en separar las proteínas con base en la diferencia de sus cargas. En esta técnica se utilizan soportes que poseen en su superficie grupos carboxilo o amino, que les otorga cargas negativas o positivas a pH 7. Es por ello, que según la carga del soporte, las proteínas con carga contraria serán las únicas en unirse al soporte; mientras que, las que poseen igual carga o carga nula eluirán fácilmente a través de la columna (Lodish et al., 2005, p. 90).

1.5 CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES PROTEOLÍTICOS

1.5.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

Las enzimas tienen la capacidad de catalizar las reacciones celulares. De manera general, el comportamiento cinético de estas reacciones se describe mediante la ecuación [1.1], propuesta por Michaelis-Menten.



Como se puede observar en la ecuación [1.1], las reacciones enzimáticas en primer lugar forman el complejo ES. Esta etapa se da de manera reversible y rápida. Una vez formado, el ES se transforma en producto P y enzima libre E. El proceso de obtención de P de la reacción es una etapa irreversible y lenta, que permite determinar la velocidad de reacción global (V_o) (Voet et al., 2013, pp. 361-362). La

relación que existe entre la V_o y la $[S]$ para una E, que obedece a la cinética de Michaelis-Menten, se representa en la Figura 1.3.

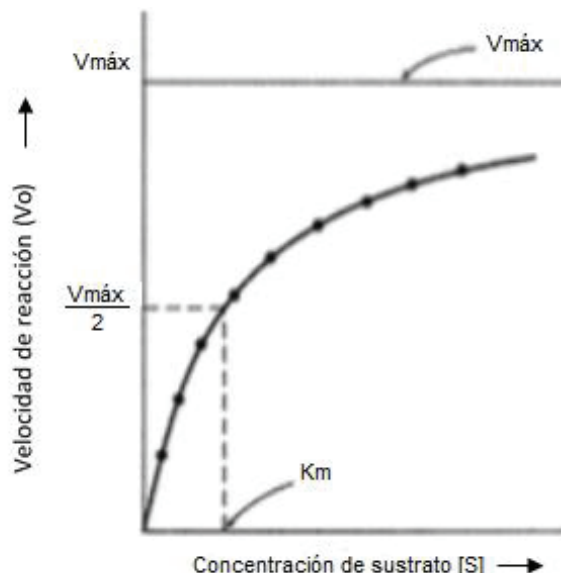


Figura 1.3. Representación gráfica de la cinética de Michaelis-Menten
(Berg, Tymoczko y Stryer, 2007, p. 217)

Como se observa en la Figura 1.3., la V_o de una reacción enzimática es dependiente de la $[S]$. Es decir, la V_o aumenta conforme se incrementa la $[S]$, hasta que la reacción se satura con S, ahí aparece la velocidad máxima ($V_{máx}$), la cual se obtiene de manera asintótica (Berg, Tymoczko y Stryer, 2007, p. 217; Hill, Wyse y Anderson, 2004, p. 48).

La constante de Michaelis-Menten (K_m) representa la $[S]$ que produce la mitad de la $V_{máx}$ de la reacción enzimática (Berg, Tymoczko y Stryer, 2007, p. 217). El valor de K_m incrementa cuando la afinidad entre la E y el S disminuye (Nelson y Cox, 2013, pp. 203-204).

Las reacciones enzimáticas se asocian con las denominadas cinéticas de saturación. Existen dos tipos de cinética de saturación, la cinética sigmoide y la cinética hiperbólica (Hill et al., 2004, p. 48).

La cinética sigmoide se presenta en las enzimas reguladoras, que al tener por lo menos dos sitios activos para que se enlace el sustrato, permiten la existencia de

este tipo de cinética, la cual se manifiesta por la transición cooperativa de varios centros activos a través de estados de baja y de alta actividad (Müller, 2008, p. 181).

Por otro lado, la cinética hiperbólica indica la falta de cooperatividad en el enlazamiento del sustrato (Peretó, Sendra, Pamblanco y Bañó, 2007, p. 118). Se presenta cuando cada una de las moléculas de la enzima implicada poseen un solo lugar de unión para el sustrato (Hill et al., 2004, p. 48).

En la Figura 1.4. se ejemplifica la cinética hiperbólica, la cual es un tipo de cinética de saturación, que obedece al modelo de Michaelis-Menten.

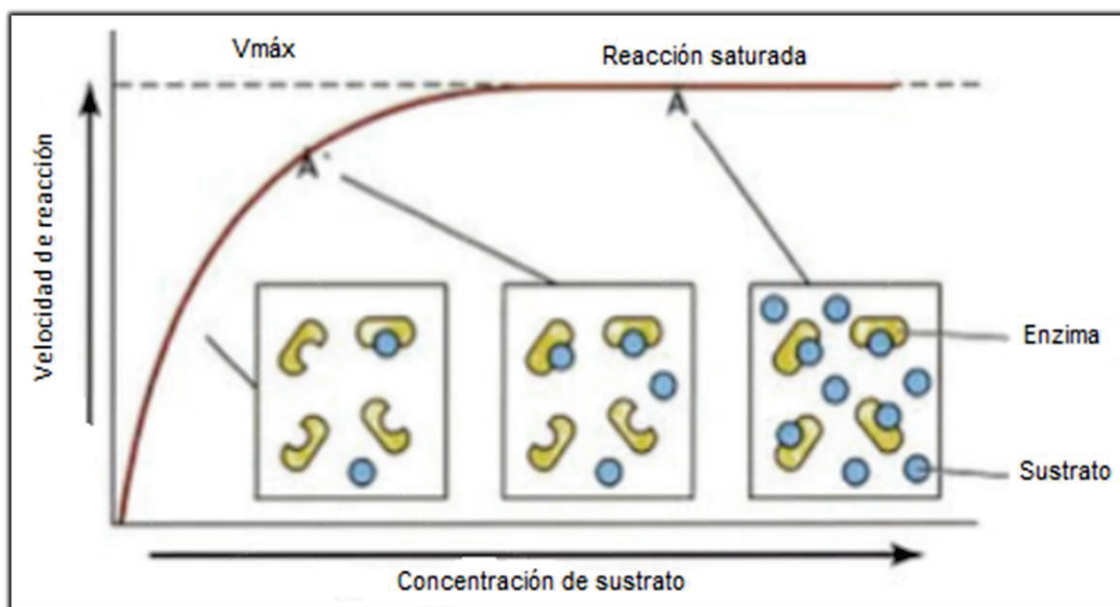


Figura 1.4. Cinética hiperbólica
(Hill et al., 2004, p. 48)

De manera cuantitativa, la relación que existe entre la actividad de una enzima y la [S] está representada por la ecuación [1.2], que define la velocidad para una reacción enzimática.

$$V_0 = \frac{V_{máx} \times [S]}{[S] + K_m} \quad [1.2]$$

Donde:

V_o : Velocidad inicial de reacción, en U/mL
 $V_{m\acute{a}x}$: Velocidad máxima, en U/mL
 $[S]$: Concentración de sustrato, en mM
 K_m : Constante Michaelis-Menten, en mM

La ecuación de Michaelis-Menten puede transformarse en la ecuación de una línea recta, para facilitar el cálculo de los valores de las constantes cinéticas: $V_{m\acute{a}x}$ y K_m . Para realizar esta transformación se tienen varios métodos, el más utilizado es el de los dobles recíprocos, también denominado ecuación de Lineweaver-Burk (Castillo, 2005, p. 301). La ecuación [1.3] relaciona el inverso de la V_o con respecto al inverso de la $[S]$. El valor de los parámetros cinéticos se puede obtener a partir del siguiente gráfico (Nelson y Cox, 2013, p. 204).

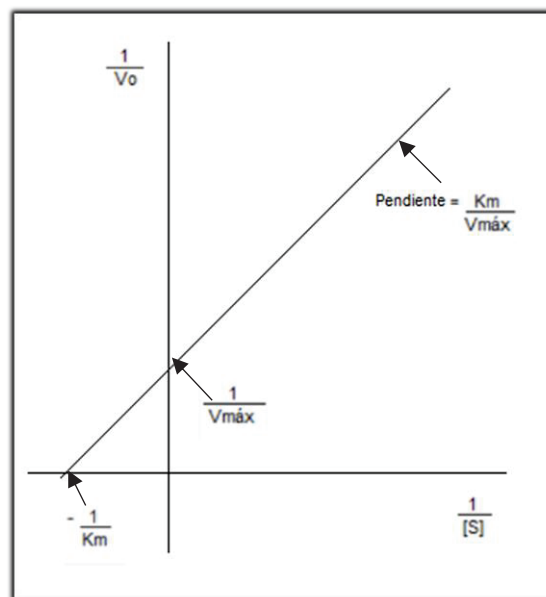


Figura 1.5. Linealización de la ecuación Michaelis-Menten, de acuerdo con el método de Lineweaver-Burk (Nelson y Cox, 2013, p. 204)

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad [1.3]$$

Como se mencionó en el acápite 1.3.2, existen diferentes tipos de inhibición, competitiva, acompetitiva y no competitiva o mixta (Moran et al., 2012, pp. 149-151; Voet et al., 2013, pp. 374-377).

La cinética de la inhibición competitiva radica en que aumenta la K_m debido a que se necesita de mayor cantidad de sustrato para alcanzar la $V_{m\acute{a}x}$; mientras que, la $V_{m\acute{a}x}$ se mantiene constante (Peña, Arroyo, Gómez, Tapia y Gómez, 2004, p. 204).

En la inhibición acompetitiva, la $V_{m\acute{a}x}$ y la K_m disminuyen debido a que varias moléculas de E se transforman al complejo ESI (Moran et al., 2012, p. 149; Voet et al., 2013, p. 375).

Por otro lado, se tiene la inhibición no competitiva, que como se dijo con anterioridad, puede denominarse mixta. Esta inhibición se da por la presencia de más de un sustrato que dan lugar a la formación de complejos inactivos EI y ESI. En este caso, el I no se enlaza al mismo sitio que el S. A consecuencia de esto, la $V_{m\acute{a}x}$ y la K_m son afectadas, pero no necesariamente cambian de la misma manera. La $V_{m\acute{a}x}$ disminuye mientras que la K_m se mantiene constante (Moran et al., 2012, pp. 149-150; Voet et al., 2013, p. 374). De esta manera, se tienen dos tipos de inhibición, la competitiva y la no competitiva (Peretó et al., 2007, p. 110).

Los cambios que sufren K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se corrigen mediante un factor (α y/o α'). Este factor junto a la concentración de inhibidor permite determinar el grado de afinidad que tiene el inhibidor hacia la enzima (K_i). La ecuación [1.4] indica esta relación (Nelson y Cox, 2013, pp. 207-208).

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad [1.4]$$

Donde:

α : Factor alfa

[I]: Concentración del inhibidor

K_i : Constante de inhibición

En la Figura 1.6. se visualizan los diferentes tipos de inhibición en las gráficas de los dobles recíprocos.

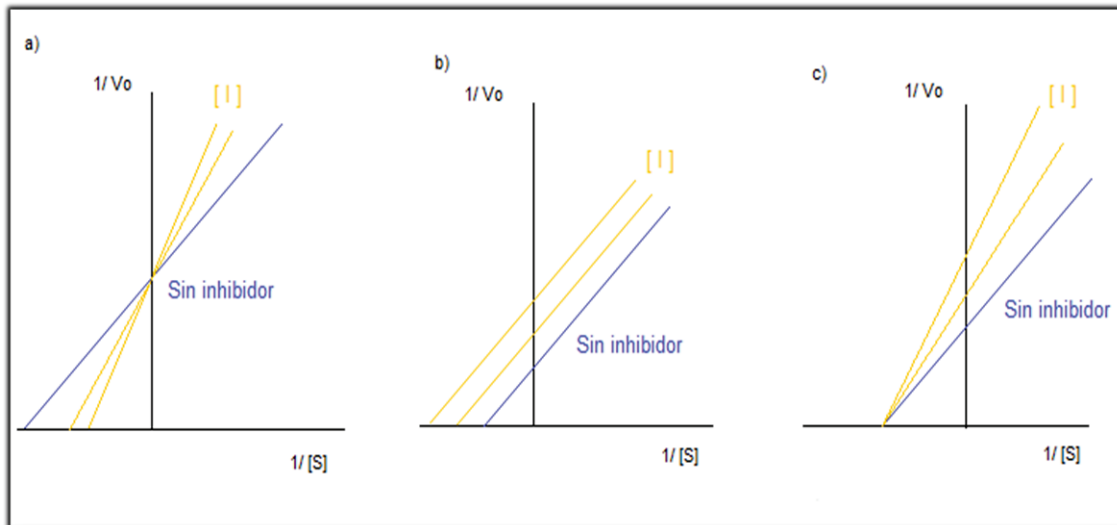


Figura 1.6. Gráfico de los dobles recíprocos propuesto por Lineweaver y Burk a) Inhibición competitiva; b) inhibición acompetitiva y c) Inhibición no competitiva (Garrido et al., 2006, p. 215; Voet et al., 2013, pp. 375)

1.5.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Para la caracterización molecular de proteínas se tienen varias técnicas, entre las cuales están la electroforesis y la cromatografía líquida de alta resolución denominada (HPLC) (Hernández, Compte, Quesada y Rodríguez, 2009, p. 3).

La técnica de electroforesis consiste en separar moléculas según su movilidad, en un campo eléctrico, a través de un soporte (Becerril, 2008, p. 1). Los geles más utilizados para realizar electroforesis son la poliacrilamida y la agarosa. La poliacrilamida es usada con mucha frecuencia como soporte, debido a que es químicamente inerte, fácil de preparar y forma geles transparentes, que permiten visualizar las bandas formadas. Los geles de poliacrilamida para electroforesis se forman a partir de la polimerización de la acrilamida con la bisacrilamida. Estos geles separan las biomoléculas por sus tamaños moleculares, ya que las moléculas de bajo tamaño molecular atraviesan el soporte con más rapidez que las moléculas grandes (García, 2000, p. 32).

La electroforesis con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) separa proteínas y, también permite determinar su punto isoeléctrico (Voet y Voet, 2006, p. 153). El SDS

es un detergente aniónico que desnatura, solubiliza las proteínas y les otorga carga negativa, con lo cual se facilita la movilidad relativa de las proteínas hacia el ánodo a través del gel (Labome, 2016). El tratamiento con SDS permite eliminar las diferencias de forma entre las subunidades de las proteínas multiméricas. Por lo cual, el único determinante que existe en la velocidad de migración de las proteínas es el tamaño de la cadena polimérica, cuando difieren al menos en un 10 % de su peso molecular (Lodish et al., 2005, p. 87).

Las proteínas que se utilizan en la electroforesis son previamente desnaturadas e ingresan a los pocillos formados en el gel concentrador. Para desnaturarlas, se utiliza una solución que contiene SDS, 2-mercaptoetanol y azul de bromofenol. El 2-mercaptoetanol es un agente reductor que rompe los puentes disulfuro al reducirlos a grupos tioles. El azul de bromofenol es un colorante utilizado para visualizar el avance de la electroforesis, mediante el seguimiento del denominado frente electroforético (Velga, 2013, p. 9; Lomonte, 2002, pp. 92-95; Solari, 2004, p. 43). Al terminar la corrida electroforética, se sumerge el gel obtenido en una solución de coloración que puede ser de azul de Coomassie y luego en una solución de decoloración para observar las bandas generadas (Lomonte, 2002, p. 95).

Para la determinación del peso molecular de las muestras, se emplea la movilidad electroforética relativa (R_f), que representa la migración de las proteínas con respecto al frente electroforético (Universidad Nacional de Quilmes, 2010, p. 3). La R_f se calcula con la ecuación [1.5].

$$R_f = \frac{\text{Distancia de migración de la muestra}}{\text{Longitud de corrida total del gel}} \quad [1.5]$$

Una vez calculada la R_f para cada una de las bandas generadas en el gel, se procede a determinar el PM de las mismas, mediante una curva de calibración del logaritmo del PM establecido para cada una de las bandas del estándar frente al R_f calculado para cada una de ellas. Como resultado se tiene una recta de pendiente negativa, sobre la cual se puede interpolar para estimar el PM de las muestras deseadas.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.1.1 MATERIALES

- Agitadores magnéticos
- Celdas de cuarzo para espectrofotómetro
- Columna de vidrio de 23,5 cm de longitud
- Embudos con frita
- Filtro de jeringa
- Jeringas de 3 y 5 mL
- Matraces aforados de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 1 000 mL
- Micropipetas de 10 – 1 000 μ L
- Filtros Millipore de 0,45 μ m
- Probetas de 10, 50 y 100 mL
- Semillas certificadas de amaranto (*Amaranthus caudatus L.*), arveja (*Pisum sativum L.*), chocho (*Pisum sativum L.*), frejol (*Phaseolus vulgaris L.*), quinua (*Chenopodium quinoa willd*) y sangorache (*Amaranthus hybridus L.*) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Estación Santa Catalina.
- Tubos de centrifuga
- Tubos Eppendorff
- Tubos Millipore Amicon Ultra para Ultracentrifugación, con tamaño de poro de 10 y 50 kDa
- Vasos de precipitación de 50, 100, 250, 500 y 1 000 mL

2.1.2 EQUIPOS

- Balanza analítica, ACCULAB, 110 g, 0,0001 g
- Bomba de vacío, DENTSPLY, modelo C2428

- Bomba peristáltica, GILSON, modelo Miniplus 2
- Centrífuga, WIFUG, modelo 2 000 E, 5 800 rpm
- Equipo de electroforesis, Thermo Electron Corporation, EC 250–90
- Espectrofotómetro UV-Visible, Hitachi, modelo U -1 900
- pHmetro, JENWAY, modelo 3 510
- Rotavapor, IKA, modelo RV10B599
- Sistema de cromatografía, Pharmacia, modelo LKB – FRAC 100

2.1.3 REACTIVOS

- Acetato de sodio anhidro, grado analítico, Mallinckrodt Chemical
- Ácido acético, 99 % de pureza, Riedel–de Haën AG
- Ácido clorhídrico, 37 % de pureza, J.T. Baker
- Ácido tricloroacético, grado analítico, SIGMA
- Acrilamida, grado electroforesis, Bio – Rad
- Azul brillante de bromofenol, grado electroforesis, SIGMA
- Azul brillante de Coomasie, grado electroforesis, MERCK
- Bisacrilamida, grado electroforesis, Bio – Rad
- Caseína, grado analítico, MERCK
- Cloruro de sodio, grado analítico, MERCK
- DEAE–Sepharosa CL-6B, Pharmacia AB Biotechnology
- Dimetil formamida, 99 % de pureza, Mallinckrodt Chemical
- Dodecil sulfato de sodio, grado electroforesis, SIGMA
- Fosfato monobásico de sodio, 99 % de pureza, SIGMA
- Hidróxido de sodio, grado analítico, BDH Laboratory
- Pepsina, 250 U/mg, SIGMA
- 1–Propanol, pureza 99 %, BDH Laboratory

2.2 SELECCIÓN DE LOS EXTRACTOS CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA A PARTIR DE LAS SEMILLAS DE AMARANTO, ARVEJA, CHOCHO, FRÉJOL, QUINUA O SANGORACHE

2.2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SEMILLAS SELECCIONADAS DE AMARANTO (*Amaranthus caudatus L.*), ARVEJA (*Pisum sativum L.*), CHOCHO (*Pisum sativum L.*), FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris L.*), QUINUA (*Chenopodium quinoa willd*) Y SANGORACHE (*Amaranthus hybridus L.*)

Inicialmente, se desengrasaron las harinas obtenidas a partir de la molienda de cada una de las semillas mencionadas. El proceso de desengrasado, que se realizó mediante el método adaptado por Echeverría (2014, p. 38); consistió en la aplicación de diferentes etapas de extracción sólido-líquido con 1-propanol, en una relación 1:4 (harina: solvente), hasta que el solvente no mostró turbidez. Se determinó el porcentaje que representa la cantidad de grasa removida respecto a la masa inicial y se expresó como porcentaje en relación con el contenido de grasa establecido en el análisis proximal de las semillas dado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) (2009). El detalle de este proceso se puede observar en la Figura A1.2 del Anexo I.

Una vez desengrasadas las harinas, se procedió a obtener los extractos acuosos de cada una de ellas. Se pesó la harina de cada semilla y se añadió tampón fosfato 0,1 M pH 2,2, en una relación peso:volumen de 1:5. Posteriormente, se mantuvo en agitación constante durante 1,5 h, para obtener una mezcla homogénea. Después de ese tiempo, se centrifugó a $850 \times g$, durante 30 min. El sobrenadante de cada una de las harinas se colocó en tubos para centrifuga para ultrafiltrar con una membrana de 50 kDa a $2\ 000 \times g$, durante 45 min. Se recolectaron los permeados que se denominaron extractos crudos (Echeverría, 2014, p. 92). El proceso de obtención de extractos acuosos se detalla en la Figura A1.4 del Anexo I.

2.2.2 SELECCIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A PEPSINA

En primer lugar, se determinó la actividad proteolítica de la enzima soluble, según el método desarrollado por Kakade, Swenson y Liener (1970, pp. 256-257) y Jácome (2015, pp. 47-48); modificado. Para cuantificar la actividad proteolítica de pepsina en ausencia del inhibidor, se colocaron en un tubo de ensayo 0,5 mL de la solución enzimática (5 mg/mL) y 1,5 mL de tampón fosfato 0,1 M, pH 2,2. Esta solución se mantuvo a 37 °C, durante 15 min. Posteriormente, se colocaron 2 mL de caseína al 1 % (p/v), se incubó la mezcla de reacción por 10 min y se detuvo la reacción con 6 mL de solución de TCA. Luego, se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente, durante 30 min. Terminado este tiempo, se filtró y se midió la absorbancia a 275 nm frente al blanco que se preparó de la misma manera mencionada, con la diferencia de que la solución de TCA se colocó antes de la solución de caseína. El esquema de la determinación de actividad proteolítica de pepsina se encuentra en la Figura AI.1 del Anexo I.

Para calcular la actividad de pepsina, (AE), en U/mL a partir del promedio de tres lecturas de absorbancia a 275 nm (h), con caseína como sustrato, se utilizó la ecuación [2.1], propuesta por Becker, Makkar y Siddhuraju (2007, p. 9). Un ejemplo de cálculo se presenta en el Anexo II.1.

$$AE = \frac{h}{(0,1)^2} \quad [2.1]$$

Para determinar la actividad inhibidora de los extractos, se midió la actividad de pepsina en presencia del inhibidor. Para lo cual, se siguió el mismo método antes enunciado, con la diferencia de colocar el extracto acuoso en lugar del tampón. Posteriormente, se calculó la actividad inhibidora (AI), en U/mL de solución proteica, que se definió como la diferencia entre la actividad proteolítica de pepsina sin inhibidor (AE_{SI}) y con inhibidor (AE_{CI}) (Ruiz, 2017, p. 27). La actividad inhibidora específica (AIE) se determinó como la relación entre la actividad inhibidora y la concentración de proteína de cada extracto [P], determinada mediante la medición de la A a 280 nm y expresada en mg/mL (El-Yassi, 2012, p. 2), como se indica en

el Anexo II. Para la determinación de la AI y de la AIE se utilizaron las ecuaciones [2.2] y [2.3], respectivamente. En el Anexo III se presenta un ejemplo de cálculo de la AI y AIE.

$$AI = AE_{SI} - AE_{CI} \quad [2.2]$$

$$AIE = \frac{AI}{[P]} \quad [2.3]$$

Con los valores de AI y AE se calculó el porcentaje de rendimiento de actividad inhibitora (%RAI) que representa el cociente entre la AI del extracto purificado por su respectivo volumen, sobre la AI del extracto crudo por su volumen; mientras que, el porcentaje de rendimiento de concentración de proteína (%RCP), se calculó mediante la relación entre la [P] del purificado por su volumen y la [P] del extracto crudo por su volumen.

Adicionalmente, se calculó el porcentaje de inhibición como la relación entre la AI y la AE.

Para la selección del extracto con mayor potencial de inhibición sobre pepsina, se aplicó un diseño unifactorial cuya variable de entrada fue el tipo de semilla. Se analizaron los seis tipos de semillas mencionados. La variable de salida fue la AIE con tres repeticiones para cada semilla. El análisis de resultados se realizó con el software Statgraphics Centurion XV, a través de un análisis de varianza (ANOVA) con el 95 % de confianza y un test de rangos múltiples con el método de Fisher LSD (Least Significant Difference) o también denominado Método de la mínima diferencia significativa.

El extracto crudo con mayor actividad inhibitora específica sobre pepsina se seleccionó para su purificación parcial.

2.3 PURIFICACIÓN PARCIAL DEL EXTRACTO CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA SOBRE PEPSINA

El extracto crudo con mayor actividad inhibidora específica sobre pepsina fue purificado parcialmente mediante la aplicación de las siguientes técnicas.

En primer lugar, el extracto acuoso con mayor AIE se ultrafiltró por una membrana de 10 kDa, durante 40 min, a $2\ 000 \times g$. Posteriormente, se recolectó por separado el permeado y el retenido. Las dos fases recolectadas se sometieron a calentamiento en baño María a $60\ ^\circ\text{C}$, durante 30 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron tratados con sulfato de amonio, en un porcentaje de saturación de 40 y 70. Los precipitados fueron resuspendidos y desalinizados por ultrafiltración a través de una membrana de 3 kDa.

En cada etapa de la purificación parcial, se determinó la AI, AIE y concentración de proteína para la fracción del retenido y del permeado. Para determinar la cantidad de proteína que disminuyó al aplicar cada uno de los procesos descritos, se multiplicaron los valores obtenidos de [P] por el volumen final de cada fracción.

Se realizó un análisis estadístico entre los GP obtenidos por precipitación salina de las fracciones del permeado y del retenido del extracto de quinua que presentaron mayor AIE sobre pepsina. Este análisis se realizó para determinar que fracción se tenía que alimentar a la columna de afinidad.

Una vez evaluados los resultados del análisis estadístico entre los GP de ambas fracciones, se determinó que el permeado y el retenido se debían purificar selectivamente. Por lo que, se realizó la cromatografía de afinidad.

2.4 SELECCIÓN DEL VALOR DE pH DE INMOVILIZACIÓN DE PEPSINA EN DEAE-SEPHAROSA CL-6B

Inicialmente, se acondicionó el soporte de inmovilización (DEAE-Sepharosa

CL- 6B), para lo cual, se mezclaron 6 mL de gel, 300 mL de NaOH 0,1 M y 60 mL de agua destilada con agitación constante, durante 3 h. Después, se filtró en una frita y se lavó el gel de DEAE-Sepharosa CL-6B con 100 mL de tampón fosfato 0,1 M, pH 2,0. A continuación, se mezcló y agitó magnéticamente por 3 h el gel lavado y el tampón fosfato. Posteriormente, se detuvo la agitación, se dejó reposar la mezcla durante 16 h, a temperatura ambiente (18 °C) y se filtró.

Una vez acondicionada la matriz, se realizó la inmovilización de pepsina mediante intercambio iónico, con el método de Iborra, Obón, Guardiola, Manjón y Cánovas; modificado (1992, pp. 340-345).

Para la incubación se preparó una solución enzimática de 5 mg de pepsina / mL de DEAE-Sepharosa CL-6B, en tampón HCl 0,01 M con 40 mM de NaCl para la activación de la enzima (Klomklao, Kishimura, Yabe y Benjakul, 2007, p. 688). Esta solución se mezcló con 6 mL del gel preparado, por 1 h. Al inicio y cada 15 min se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración de proteína remanente en la mezcla de reacción, con respecto al tiempo, durante el período de incubación (Iborra et al., 1992, pp. 340-345).

Una vez lograda la inmovilización, se filtró en frita el gel con la enzima fijada y se lavó la matriz con 50 mL de tampón fosfato 0,1 M, pH 2,0, durante 30 min. Posteriormente, se filtró y lavó nuevamente con dicho tampón y por el mismo período de tiempo. Se recolectaron el filtrado y los lavados; y, en ellos se midió la absorbancia a 275 nm y 280 nm con la finalidad de determinar la actividad proteolítica y la concentración de proteína en cada solución, respectivamente (Kakade et al., 1970, pp. 256-257) y Jácome (2015, pp. 47-48); modificado.

Finalmente, y después del segundo lavado, se filtró para obtener el preparado inmovilizado, del cual se tomó 1 g para la medición de la actividad proteolítica y el resto del preparado inmovilizado se almacenó en 25 mL de tampón fosfato 0,1 M, pH 2,0. En la Figura A1.3 del Anexo I se muestra el esquema del proceso de inmovilización de pepsina, en la matriz DEAE-Sepharosa CL-6B. Para la determinación de los parámetros EI, AEi y RAF se aplicaron las ecuaciones [A.4],

[A.6] y [A.8]; respectivamente. Estas ecuaciones se encuentran descritas en el Anexo II al igual que el ejemplo de cálculo de estos parámetros.

2.5 PURIFICACIÓN SELECTIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE LA FRACCIÓN INHIBIDORA PURIFICADA PARCIALMENTE

2.5.1 CORRIDA CROMATOGRÁFICA

A partir del permeado y de retenido, se prepararon 5 g de Pepsina-DEAE-Sepharosa CL-6B, como se indicó en el acápite 2.4.1.

Para proceder a purificar selectivamente, se llenó la columna de 1,2 cm de diámetro con 7 mL de la matriz pepsina-DEAE-Sepharosa CL-6B hasta alcanzar una altura de 6,3 cm. Con un flujo de entrada de 0,5 mL/ min se añadieron 5 mL de la fracción purificada parcialmente con mayor AEI sobre pepsina, seguido del tampón (Félix, 2008, p.40).

Luego, se recolectaron fracciones de 2 mL y en cada una se determinó la concentración proteica y la actividad inhibidora mediante espectrometría UV. Cuando en las fracciones se determinó una concentración de proteína alrededor de cero, las proteínas retenidas en el relleno de la columna se eluyeron con KCl-HCl 1 M; en cada fracción eluída se determinó la concentración de proteína y la actividad inhibidora, según el método descrito por Echeverría (2014, pp. 45-46), modificado.

Finalmente, se realizó el cromatograma correspondiente, mediante la gráfica de la [P] vs el número de fracción. El proceso mencionado, se hizo para la fracción del permeado y del retenido que fueron purificados parcialmente. Sobre el cromatograma se representaron los valores de actividad inhibidora de cada fracción.

2.5.2 DISEÑO DE UN SISTEMA DE PURIFICACIÓN DEL INHIBIDOR MÁS ACTIVO DE PEPSINA PRESENTE EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS

Para el diseño del sistema de purificación de pepsina, se determinó el GP en cada una de las etapas mencionadas en el acápite 2.3 y 2.5. El GP se obtuvo mediante la relación entre la AIE obtenida después de la purificación y la AIE antes de cada etapa purificada (Ruiz, 2017, p. 29). Todas las etapas se realizaron en serie y con los GP logrados en cada una se procedió a evaluar estos valores mediante un análisis estadístico con el software Statgraphics Centurion XV, a un nivel de confianza del 95 % y con el método de LSD, para determinar si se debían eliminar las etapas que no aporten a la purificación selectiva por cromatografía, o a su vez, combinarlas con esta técnica de purificación final.

Con las etapas seleccionadas se diseñó un sistema de purificación de los inhibidores de pepsina, que se puede apreciar en la Figura 3.10 del acápite 3.4.2. Un ejemplo de cálculo del GP se encuentra en el Anexo AIII.3.

2.6 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y MOLECULAR DEL INHIBIDOR MÁS ACTIVO DE PEPSINA

2.6.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

La caracterización cinética de las fracciones purificadas selectivamente, se realizó con los picos más activos de la cromatografía de afinidad. Estos picos se agruparon en lotes denominados R y P. El Lote P fue formado por los picos más activos del permeado y el Lote R, por los del retenido.

Se midió la AE de la pepsina en presencia de las fracciones que presentaron mayor AIE y en ausencia de las mismas. Se utilizó caseína como sustrato, en concentraciones de 3, 5, 7, 11 y 15 mg/mL. (Nelson y Cox, 2013, pp. 203-209).

La constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y constante de

inhibición (K_i) se determinaron a partir del gráfico de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk. La K_i se determinó con la ecuación [1.4] del acápite 1.5.1. Un ejemplo de cálculo de los parámetros cinéticos se encuentra en el Anexo V.

2.6.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Posteriormente, las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad se caracterizaron molecularmente, por medio de electroforesis desarrollada en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con el método de Laemmli (1970, p. 680), modificado por Félix (2008, p. 43) y por Ruiz (2017, p. 30). La preparación de la solución desnaturalizante se detalla en la Tabla AVI.1 del Anexo VI.

El estándar utilizado para los extractos crudos tuvo un peso molecular en el rango de 10-100 kDa; mientras que, el estándar de los inhibidores estuvo en el rango de 2,56 y 17,20 kDa. Los geles se prepararon con un espesor de 1 mm y con 10 y 16 % de poliacrilamida, respectivamente para el gel separador y para el gel concentrador. Para iniciar la polimerización, en ambos casos, se añadieron 80 μ L de persulfato de amonio al 10,0 % y 10 μ L de TEMED. Se dejaron polimerizar durante aproximadamente 15 min (Schagger y Von Jacow, 1987, p. 369; Félix, 2008, p. 45; Bio-Rad, 2013, p. 12); modificado por Ruiz (2017, p. 30). Se aplicó un voltaje constante de 110 V para el gel concentrador y de 150 V para el gel separador método de Schagger y Von Jacow (1987, p. 369); modificado por Echeverría (2014, pp. 48-49).

Finalmente, se sumergió el gel en una solución fijadora, durante 30 min; y, en una de tinción, durante 16 h, aproximadamente. Después, se procedió a desteñir los geles con una solución de decoloración hasta que se pudieron visualizar las bandas bien definidas. La determinación del peso molecular de las proteínas se realizó a partir de la movilidad relativa de las bandas visualizadas, con la ecuación [1.5] (Voet y Voet, 2006, p. 151). La preparación de las soluciones utilizadas se indica en la Tabla AVI.2 del Anexo VI.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 SELECCIÓN DE LOS EXTRACTOS CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA OBTENIDOS A PARTIR DE LAS SEMILLAS DE AMARANTO, ARVEJA, CHOCHO, FRÉJOL, QUINUA O SANGORACHE

La cantidad de grasa removida de las harinas de las semillas certificadas de amaranto (*Amaranthus caudatus L.*), arveja (*Pisum sativum L.*), chocho (*Pisum sativum L.*), fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*), quinua (*Chenopodium quinoa willd*) y sangorache (*Amaranthus hybridus L.*), que permitieron la obtención de los extractos acuosos, se encuentra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Cantidad de grasa removida en cada una de las harinas

Harina	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Grasa removida (g)	Grasa removida (%)*
Amaranto	50,00	47,10	2,90	66,06
Arveja	50,00	48,55	1,45	72,50
Chocho	50,07	43,02	7,05	74,49
Fréjol	50,08	48,70	1,38	82,26
Quinua	50,00	47,25	2,75	90,02
Sangorache	50,03	47,41	2,62	66,79

*(INIAP, 2009)

Como se observa en la Tabla 3.1, el porcentaje de grasa removida fue mayor al 66 % para todas las semillas con respecto al contenido establecido en la composición proximal por el INIAP (2009). Este proceso permitió obtener harinas desengrasadas, una vez que el sobrenadante de la extracción no mostró grasa en suspensión.

Es necesario desengrasar las harinas debido a que la presencia de grasa puede interferir en la determinación de la actividad inhibidora de los extractos acuosos de

las semillas, puesto que retirar la grasa facilita la lectura espectrofotométrica para determinar la concentración de proteína, actividad enzimática y actividad inhibidora (Muñoz, 2011, p. 75; García y Sánchez, 1985, p. 227).

En el estudio de Molina, Blanco y Zamora (2011) se extrajeron inhibidores de aspártico proteasas a partir de harinas desengrasadas y harinas sin desengrasar de *L. bogotensis*; con la harina desengrasada obtuvieron una mayor actividad inhibidora (8764 UI) en comparación a la harina con grasa (2572 UI), (p. 186).

La concentración de proteína, de los extractos acuosos obtenidos de las harinas desengrasadas, determinada por espectrofotometría UV a 280 nm, se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Concentración de proteína presente en los extractos acuosos

Extracto acuoso	[P] (mg/mL)
Amaranto	1,93 ± 0,016
Arveja	8,80 ± 0,010
Chocho	17,26 ± 0,013
Fréjol	20,59 ± 0,003
Quinoa	3,85 ± 0,003
Sangorache	1,92 ± 0,006

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Muñoz (2011, p. 39) obtuvo concentraciones de proteína para el chocho (34,20 mg/mL); y, para la arveja (10,69 mg/mL) mayores a las expuestas en la Tabla 3.2. En esa investigación pudo ocurrir una sobrestimación de la [P] debido a que no se desengrasaron las harinas, sino que se realizaron centrifugaciones de la mezcla tampón-harina hasta obtener el volumen deseado de permeado. Con dicha centrifugación no se ultrafiltró con membranas, lo cual habría permitido que moléculas de varios pesos moleculares, junto con la grasa dispuesta en la solución, sean analizadas espectrofotométricamente y puedan interferir en la lectura de la absorbancia a 280 nm.

Otras investigaciones con las que se puede comparar son la de Jácome (2015) y la

de Ruiz (2017), en las cuales se estudiaron semillas de las mismas especies. Jácome y Ruiz aplicaron el mismo protocolo para obtener los extractos acuosos de todas las semillas mencionadas. Sin embargo, existe diferencia en los valores de la concentración de proteína para cada una de ellas. Por ejemplo, para el chocho Ruiz obtuvo como concentración de proteína 22,58 mg/mL, mientras que, Jácome obtuvo 28,63 mg/mL. Esto ocurriría debido al manejo posterior de las harinas desengrasadas y de los diferentes factores agronómicos y de conservación de cada variedad y cada muestra.

3.2 PURIFICACIÓN PARCIAL DEL EXTRACTO CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA SOBRE PEPSINA

Los resultados de la selección del extracto que presentó mayor AIE, realizada según el método mencionado en el apartado 2.2.2. se detallan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Actividad enzimática (AE), actividad inhibidora (AI) y actividad inhibidora específica (AIE) presente en cada uno de los extractos acuosos

Extracto Acuoso	AE (U/mL)	AI (U/mL)	AIE (U/mg)
Amaranto	37,08 ± 0,35	10,15 ± 0,38 ^b	5,27 ± 0,16 ^b
Arveja		4,40 ± 0,24 ^d	0,50 ± 0,09 ^d
Chocho		1,95 ± 0,05 ^e	0,11 ± 0,05 ^e
Fréjol		1,90 ± 0,08 ^e	0,09 ± 0,03 ^e
Quinoa		19,15 ± 0,17 ^a	9,67 ± 0,06 ^a
Sangorache		9,05 ± 0,04 ^c	4,72 ± 0,08 ^c

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticamente significativas, según la prueba LSD (95 % de confianza)

Con base en estos resultados, se determinó que el extracto con mayor AIE sobre pepsina fue el de quinua, con un porcentaje de 41,32 % de inhibición; seguido por el de amaranto y de sangorache, con un 27,10 y 25,60 % de inhibición, respectivamente. La arveja, el chocho y el fréjol fueron los extractos con menor

porcentaje de inhibición frente a pepsina (11,97; 5,26 y 5,09; respectivamente).

Como se observa en la Tabla 3.3., la quinua, el amaranto y el sangorache presentan mayores valores de AIE frente a pepsina. Es conocido que la quinua y el amaranto, presentan antinutrientes como saponinas, taninos e inhibidores proteolíticos (Carrillo, Vilcacundo y Carpio, 2015, p.19).

A partir de la evaluación de estos resultados, se seleccionó al extracto acuoso de quinua por su mayor valor de AIE frente a pepsina. Por lo cual, se procedió a purificarlo parcialmente por varios métodos: ultrafiltración centrífuga por membrana de 10 kDa, tratamiento calórico y precipitación salina.

En la Tabla 3.4. se detallan los resultados de [P], AI y AIE obtenidos a partir de la ultrafiltración centrífuga a 10 kDa del permeado y del retenido del extracto acuoso de quinua. Además, se presenta el análisis estadístico a un nivel de confianza del 95.0 %, realizado por la prueba de múltiples rangos con el método LSD.

Tabla 3.4. Resultados de [P], de la AI y de la AIE para el proceso de purificación parcial mediante ultrafiltración centrífuga

FRACCIÓN	V (mL)	[P] (mg/mL)	AI (U/mL)	AIE (U/mg)	GP (veces)
Extracto Crudo	13,50	3,85±0,10 ^a	35,90± 1,66 ^a	9,31± 0,49 ^a	1
Permeado	8,60	2,02±0,39 ^b	20,17± 1,25 ^b	10,01± 0,22 ^a	1,07
Retenido	4,50	1,71± 0,19 ^b	16,80± 0,26 ^c	9,85± 1,75 ^a	1,06

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticamente significativas, según la prueba LSD (95 % de confianza)

En la Tabla 3.4. se observa que para las dos fracciones hubo una disminución en la concentración de proteína, esto se debe a que en todo proceso de purificación existen pérdidas al colocar y retirar las muestras de la membrana (Labome, 2012).

Además, en la Tabla 3.4. se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas en el valor de la AIE con respecto al extracto crudo, en el permeado ni

en el retenido. Este es un indicio de que el inhibidor se repartió entre el retenido y el permeado.

A pesar de no haber encontrado diferencias significativas, el GP de ambas fracciones después de ser ultrafiltradas es superior a la unidad, lo cual implica que este tratamiento debe ser tomado en cuenta para la posterior purificación parcial.

Adicionalmente, se obtuvo un %RCP del 33,42 % para el permeado; mientras que, para el retenido un 14,81 %. Como %RAI se obtuvo 35,79 % y 15,59 %; respectivamente.

Por las razones mencionadas, se determinó que la ultrafiltración centrífuga con una membrana de 10 kDa fue un proceso que en algo contribuyó a la purificación de las fracciones. Por lo cual, se tomaron ambas fracciones para continuar con la purificación.

En la Tabla 3.5. se detallan los valores obtenidos para [P], AI y AIE para la fracción del permeado y del retenido antes y después del tratamiento calórico a 60 °C, durante 30 min.

Tabla 3.5. Resultados de la [P], de la AI y de la AIE para el proceso de purificación parcial mediante tratamiento calórico (TC)

FRACCIÓN		V (mL)	[P] (mg/mL)	AI (U/mL)	AIE (U/mg)	GP (veces)
Permeado	Antes del TC	8,60	2,02 ± 0,39 ^a	20,17 ± 1,25 ^c	10,01 ± 0,22 ^a	1,07
	Después del TC	6,40	1,77 ± 0,86 ^a	24,40 ± 1,70 ^b	13,81 ± 1,59 ^c	1,38
Retenido	Antes del TC	4,50	1,71 ± 0,19 ^a	16,80 ± 0,26 ^d	9,85 ± 1,75 ^a	1,06
	Después del TC	2,90	1,63 ± 0,27 ^a	29,50 ± 0,83 ^a	18,15 ± 2,06 ^b	1,85

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticamente significativas, según la prueba LSD (95 % de confianza)

En la Tabla 3.5 se observa que hubo una disminución en la [P] disminuyó en ambas

fracciones después del tratamiento calórico. Como pérdida de proteína se tuvo 6,04 mg para el permeado, mientras que para el retenido 2,96 mg. Por otro lado, el %RCP fue de 65,21 % y de 61,43 %, respectivamente. Esto se debe a que al someter las fracciones al calor, se desnaturalizaron proteínas que no son de interés en la inhibición. Es decir, se desnaturalizaron proteínas poco estables y/o de mayor tamaño, por lo cual quedaron proteínas resistentes a este tratamiento (Voet y Voet, 2006, p. 137).

Además, se determinó el %RAI, el cual fue de 90,03 % para el permeado y de 113,16 % para el retenido.

Como se observa, el tratamiento calórico causó diferencias estadísticamente significativas en la AI. El valor de este parámetro aumentó en ambas fracciones.

Los valores de AI incrementaron debido a que el tratamiento aplicado fue efectivo en cuanto al tiempo y al calor aplicado, pues si el calor es aplicado a temperaturas alrededor de los 80 °C durante 15 o más minutos, la AIE disminuiría porque se produce una desnaturalización de proteínas (Brenes y Brenes, 1993, p. 10; Elizalde, Porrilla y Chaparro, 2009, p. 49).

En la Tabla 3.5. se observa que existen diferencias estadísticamente significativas para la AIE del permeado y del retenido. Se obtuvo un incremento en la AIE al aplicar el calor y con ello se logró un GP de 1,38 que indica un aumento de la AIE en un 38 %. Además, para el retenido se obtuvo un GP de 1,84, este valor indica un incremento en la AIE de 84 %. Estos resultados reflejaron un efecto positivo sobre la fracción retenida al aplicar esta etapa de purificación parcial.

Estos resultados evidencian que el tratamiento calórico aporta positivamente con la purificación parcial del permeado y del retenido. Es por ello que el tratamiento calórico debe mantenerse como etapa de purificación parcial.

A continuación, se procedió a purificar mediante precipitación salina. En la Tabla 3.6. se indica la comparación de los resultados obtenidos de [P], AI y AIE antes y

después de aplicar el tratamiento por precipitación salina a las fracciones permeado y retenido.

Tabla 3.6. Resultados obtenidos de [P], de AI y de AIE para el proceso de purificación parcial mediante precipitación salina (PS)

FRACCIÓN		V (mL)	[P] (mg/mL)	AI (U/mL)	AIE (U/mg)	GP (veces)
Permeado	Antes de la PS	6,40	1,77 ± 0,86 ^a	24,40 ± 1,70 ^d	13,81 ± 1,59 ^c	1,38
	Después de la PS	5,90	1,21 ± 0,00 ^a	26,90 ± 0,53 ^c	22,25 ± 0,47 ^b	2,39
Retenido	Antes del PS	2,90	1,63 ± 0,27 ^a	29,50 ± 0,83 ^b	18,15 ± 2,06 ^b	1,85
	Después del PS	2,70	1,61 ± 0,36 ^a	36,70 ± 0,83 ^a	22,77 ± 3,59 ^{ab}	2,44

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticamente significativas, según la prueba LSD (95 % de confianza)

Al igual que en la purificación parcial mediante TC, en la Tabla 3.6. no se presentan diferencias estadísticamente significativas en la [P]. sin embargo, se nota una ligera disminución en este valor debido a que siempre existe pérdida de proteína en procesos de purificación.

En este caso, se obtuvo una pérdida de proteína de 4,19 mg en el permeado y 0,38 mg en el retenido. Existe una disminución de proteína debido a que las proteínas de mayor peso molecular precipitaron a esta concentración de sal. (Duong, y Gabelli, 2014, p. 85).

Como resultado de la precipitación salina, se obtuvo un 63,02 % de rendimiento de proteína para la fracción del permeado y 91,96 % para el retenido. Por otro lado, se obtuvo un incremento en el porcentaje de rendimiento de actividad inhibidora (%RAI) para ambas fracciones. El permeado incrementó su %RAI a 101,63 % y el retenido a 115,83 %.

En la Tabla 3.6. también se aprecia que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de AI y de AIE antes y después del tratamiento con sulfato de amonio. Los resultados de AI y AIE después de esta purificación parcial

fueron más altos que los obtenidos al tratar con TC, esto se detalla en la Tabla 3.6. Se tomó en cuenta esta última etapa de purificación parcial debido a que la AIE fue de $22,25 \pm 0,47$ U/mg para el permeado y de $22,77 \pm 3,59$ U/mg para el retenido. Estos valores provocaron un aumento en el GP. El valor del GP para el permeado fue de 2,39 veces y para el retenido de 2,44 veces.

El análisis estadístico entre los GP obtenidos por precipitación salina con sulfato de amonio para ambas fracciones se muestra en la Figura 3.1., en la cual se representa el gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD.

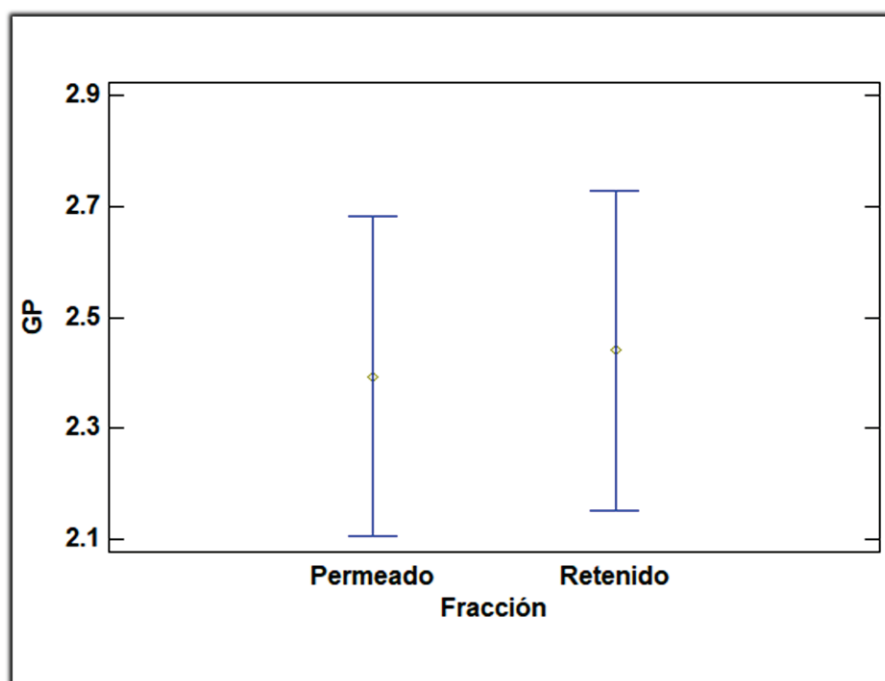


Figura 3.1. Gráfico de Medias del GP obtenido con el permeado y con el retenido del extracto acuoso de quinua

Como se observa en la Figura 3.1. no hay diferencia estadísticamente significativa entre el GP obtenido a partir del permeado y del retenido del extracto de quinua. Por lo cual, se procedió a purificar selectivamente ambas fracciones mediante cromatografía de afinidad. Esta purificación se detalla en el acápite 3.4.

Se realizó el gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para los GP logrados únicamente en la purificación mediante precipitación con sulfato de amonio, para determinar que fracción se purificaría selectivamente en la cromatografía de

afinidad.

3.3 SELECCIÓN DEL VALOR DE pH DE INMOVILIZACIÓN DE PEPSINA EN DEAE-SEPHAROSA CL-6B

En la Figura 3.2. se indica la concentración de proteína en función del tiempo de reacción de la solución proteica a pH 2,0; 2,2; 3,0 y 4,0 con el gel de inmovilización. El proceso de inmovilización se detalla en el acápite 2.4.1.

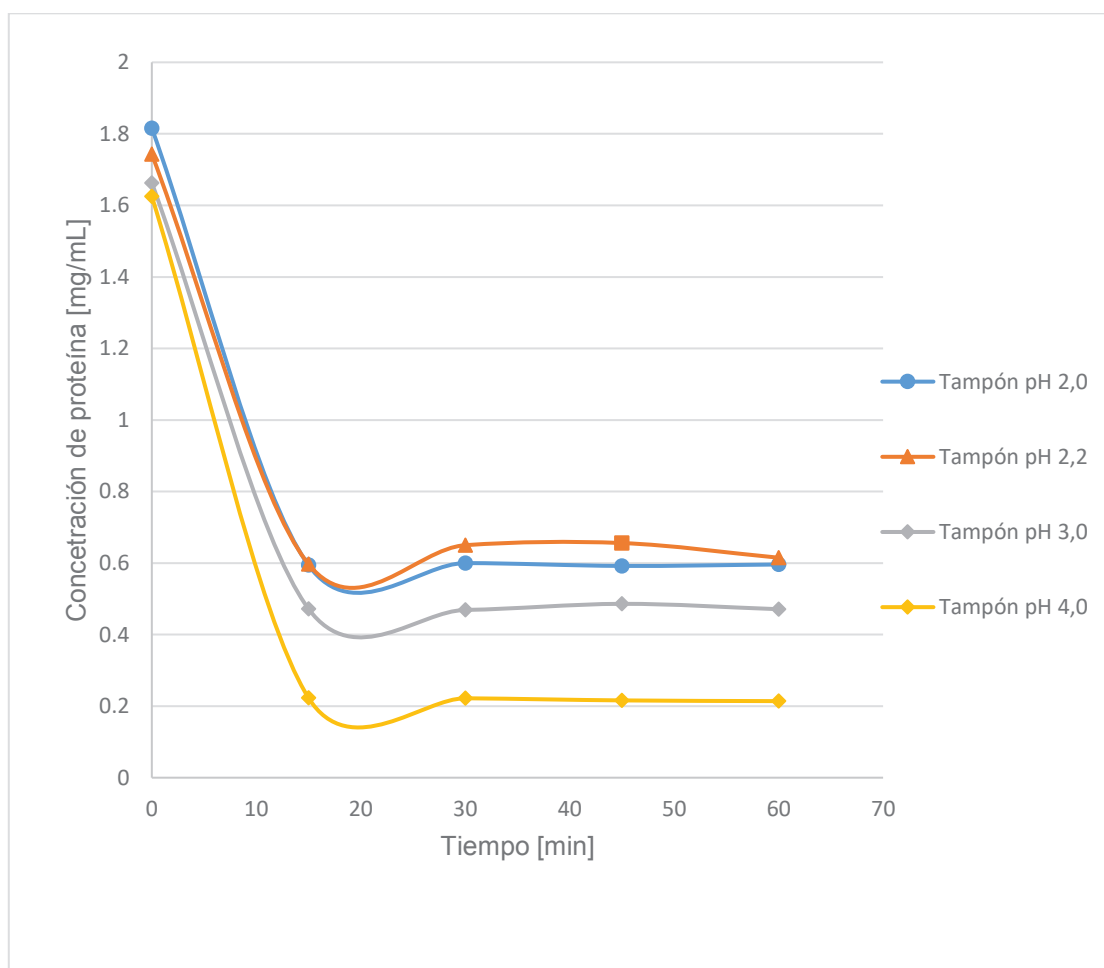


Figura 3.2. Concentración de proteína vs tiempo a diferentes pH de inmovilización de pepsina en la matriz DEAE-Sepharosa CL-6B

Como se observa en la Figura 3.2., la inmovilización de pepsina se logra en prácticamente 45 min de incubación. Sin embargo, se dejó por una hora para garantizar la estabilización del preparado inmovilizado. El periodo de este proceso fue relativamente corto en comparación con otros tipos de inmovilización, como la

producida por unión covalente. Esto se debe a que la interacción enzima soporte es de tipo iónico, una de cuyas ventajas es la rapidez y sencillez del proceso (Zamisch y Batista, 1999, pp.107-108).

En este caso, a los valores de pH 2,0; 2,2; 3,0 y 4,0, la matriz (DEAE-Sepharosa CL-6B) actúa como un intercambiador aniónico, mientras que la pepsina actúa como anión. De esta manera, por medio de interacción de cargas, se logra la inmovilización de pepsina en el gel mencionado (Zamisch y Batista, 1999, p.106).

El tiempo de inmovilización de pepsina en esta investigación es razonable ya que este tipo de inmovilización se logra en períodos cortos, como la inmovilización de β -Galactosidasa fúngica en DEAE-Sepharosa CL-6B por adsorción iónica realizado por Zamisch y Batista, en 30 min (1999, p. 108).

A pesar de que la enzima se encuentre inmovilizada, el medio en el cual se encuentre confinada, el tiempo y demás condiciones a las que se expone pueden disminuir su estabilidad y su actividad enzimática. Es por ello que se toman en cuenta otros parámetros que permiten determinar si el proceso de inmovilización fue o no adecuado, dichos parámetros son la actividad enzimática inmovilizada (AEi_t), masa total de enzima inmovilizada (EI_t) y la retención de actividad funcional en unidades totales (RAF_t) (Mateo et al., 2005, p. 276).

En la Tabla 3.7. se indican los resultados de los parámetros mencionados. Todas estas variables fueron medidas en 1 h de inmovilización para cada pH estudiado.

Tabla 3.7. Resultados de EI_t (mg), AEi_t (U) y RAF_t (U) de la pepsina inmovilizada en la matriz DEAE-Sepharosa CL-6B

pH de inmovilización	Parámetros		
	EI_t (mg)	AEi_t (U)	RAF_t (U)
2,0	24,72 \pm 0,19	814,75 \pm 2,87	728,00 \pm 3,69
2,2	24,87 \pm 0,03	524,85 \pm 2,39	548,00 \pm 2,10
3,0	24,70 \pm 0,15	340,60 \pm 3,16	268,00 \pm 3,03
4,0	24,06 \pm 0,03	116,60 \pm 1,69	88,00 \pm 3,51

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

Como se observa en la Tabla 3.7., la AEI_t , la cantidad de EI_t y el RAF_t disminuyen conforme se aumenta el valor de pH de inmovilización, a excepción de un aumento en el valor de EI_t a pH 2,2.

Además, en la Figura 3.2., se observa que a pH 4,0 existe una mayor cantidad de enzima inmovilizada en el sobrenadante que en las demás experimentaciones. Esto se puede observar mediante la diferencia que existe entre la concentración inicial de proteína al tiempo 0 min y la concentración final al tiempo 60 min.

Sin embargo, en la Tabla 3.7. la menor fijación relativa de la enzima en el soporte fue a pH 4,0. En estas condiciones se obtuvo una mayor concentración de proteína en los lavados y por ende menor porcentaje de enzima inmovilizada en la matriz.

El análisis de varianza para la EI_t se detalla en la Tabla 3.8. En este caso, el valor de p es menor a 0,05, lo cual indica que existe diferencia estadísticamente significativa en la variable de salida para cada una de las inmovilizaciones.

Tabla 3.8. Análisis de varianza para la EI_t de cada inmovilización

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,15247	3	0,384156	25,08	0,0002
Intra grupos	0,122533	8	0,0153167		
Total (Corr.)	1,275	11			

La Figura 3.3. muestra el gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para los resultados obtenidos de cantidad de EI_t a diferentes pH de inmovilización.

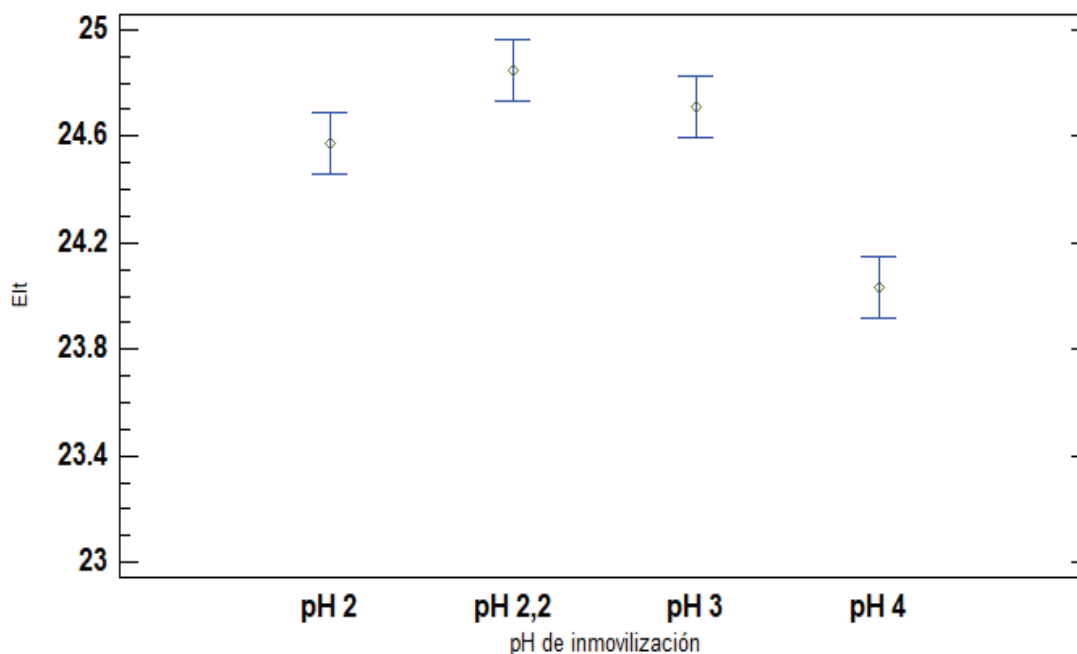


Figura 3.3. Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para la cantidad de EI_t en DEAE- Sepharosa CL-6B

Como se observa en la Figura 3.3., no existen diferencias estadísticamente significativas entre las inmovilizaciones realizadas a pH 2,0; 2,2 y 3,0. Mientras que, a pH 4,0 se obtuvo menor cantidad de EI_t en comparación a las demás inmovilizaciones.

En la Tabla 3.9. se detalla el análisis de varianza para los valores de RAF_t. En este caso, el valor de p es menor a 0,05, lo cual indica que existe diferencia estadísticamente significativa en cada una de las inmovilizaciones.

Tabla 3.9. Análisis de varianza para la RAF_t de cada inmovilización

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	728226	3	242742	2211,77	0,0000
Intra grupos	878	8	109,75		
Total (Corr.)	729104	11			

En la Figura 3.4. se observa el RAF_t para todas las inmovilizaciones, éstas son estadísticamente diferentes. Además, la mayor cantidad de RAF_t se obtuvo en la

inmovilización a pH 2,0.

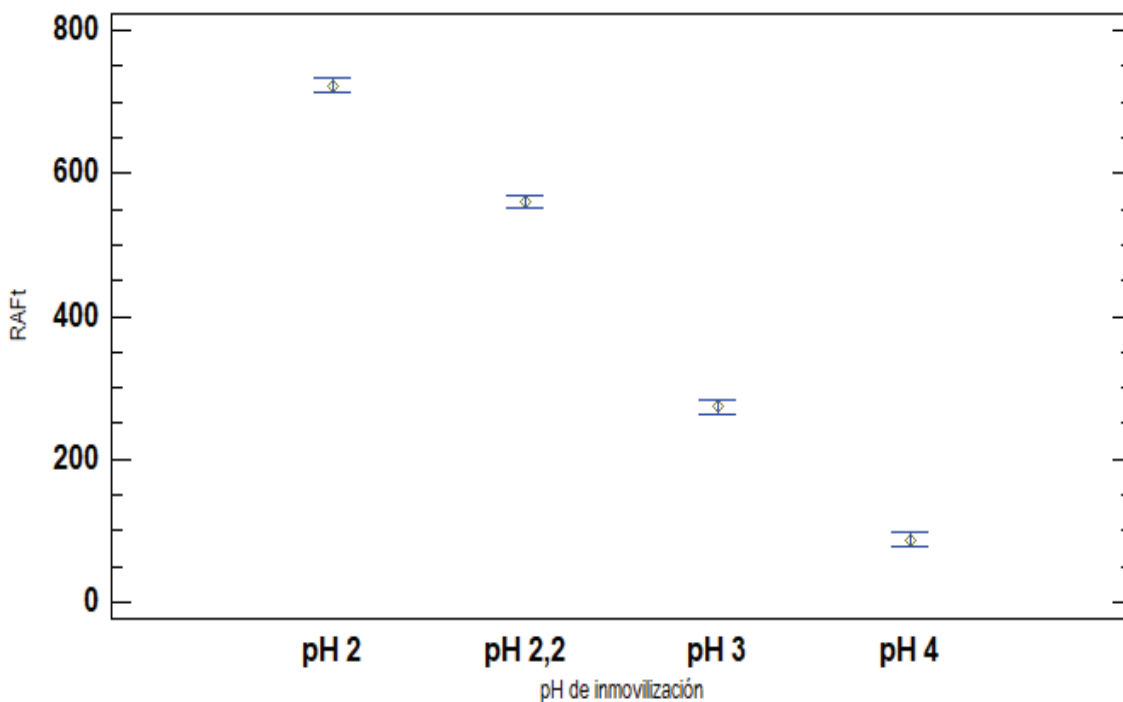


Figura 3.4. Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para las unidades totales de RAF_t presentes en el preparado inmovilizado

En resumen, se escogió el pH de 2,0 para inmovilizar pepsina en DEAE-Sepharosa CL-6B debido a que se obtuvo mayor cantidad de RAF_t y de EI_t.

En la Tabla 3.7. se observa que la mayor cantidad de enzima inmovilizada activa y de la retención de actividad funcional como unidades totales, se obtienen a pH ácido. Además, la AEI_t disminuye conforme aumenta el pH de inmovilización. Esto debido a que la PE inmovilizada pierde su actividad enzimática conforme se inmoviliza a pH cercanos a la neutralidad pH (7,0), incluso la PE puede llegar a inactivarse por completo.

Es por ello que se decidió inmovilizar a pH 2,0, pues es el pH más cercano a su pH óptimo (1,8), lo cual permite tener una alta actividad enzimática (Campos y Sancho, 2003, p.89).

Por otro lado, se colocaron 40 mM de NaCl para mantener activa la enzima. Esto

debido a que siempre, en un proceso de inmovilización existe pérdida de actividad proteolítica. En este caso, se añadió el NaCl para que actúe como un activador, pues se experimentó a pH ácidos (2,0; 2,2; 3,0 y 4,0) (Ramet, 2001, pp. 21-22; Sánchez, Cisternas y Ponce, 1987, p.797).

El NaCl permite mantener las cargas electrostáticas estables de la enzima, lo cual hace que se mantenga activa (Dueñas, Narváez y Sánchez, 2008, p. 224)

Se colocaron 40 Mm de NaCl para que pueda contribuir a la activación de la PE en el proceso de inmovilización y evitar que actúe como un inhibidor parcial frente a esta enzima (Oliveira, Bezerra y Dias, 2014, pp. 8-9; Klomklao, Kishimura, Yabe y Benjakul, 2007, pp. 687-688).

3.4 PURIFICACIÓN SELECTIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE LA FRACCIÓN INHIBIDORA PURIFICADA PARCIALMENTE

3.4.1 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

En las Figuras 3.5. y 3.6. se observan el cromatograma y la gráfica de actividad inhibidora frente al número de fracciones recolectadas para el permeado del extracto de quinua purificado selectivamente, mediante la matriz de afinidad Pepsina-DEAE-Sepharosa CL-6B.

Para realizar la cromatografía del permeado, se alimentó a la columna cromatográfica la fracción previamente purificada de manera parcial, utilizando, ultrafiltración centrífuga con membrana de 10 kDa, tratamiento calórico a 60 °C y precipitación salina.

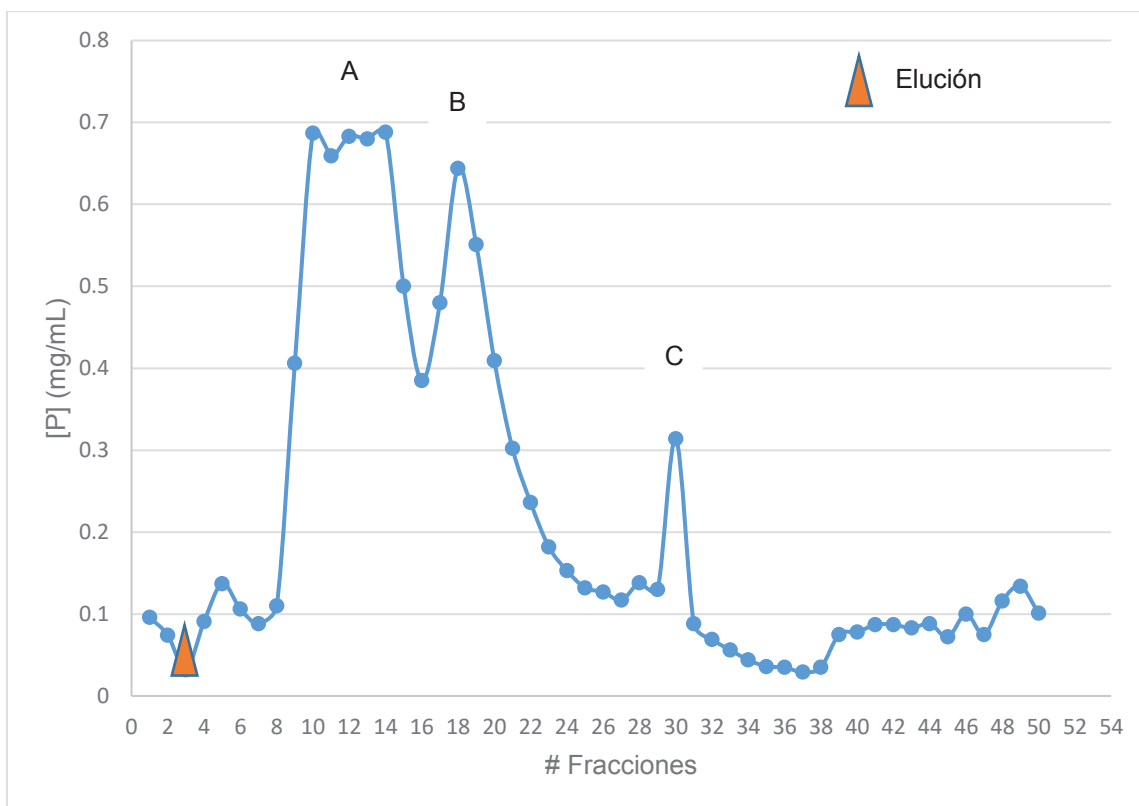


Figura 3.5. Concentración de proteína versus el número de fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del permeado del extracto acuoso de quinua

Como se observa en la Figura 3.5. se encuentra el cromatograma obtenido a partir de la [P] versus el número de fracciones de la elución con una solución HCl-KCl pH 1,5. Los picos generados se agruparon en lotes. El Lote A está compuesto por las fracciones 10 a 14, el Lote B, por la fracción 18 y el Lote C, por la fracción 30.

Con el Lote A se obtuvo una medición de [P] de 0,68, para el Lote B de 0,644 y para el Lote C de 0,314 mg/mL.

En la Figura 3.6. se presenta el gráfico de la AI versus el número de fracción para el permeado del extracto de quinua.

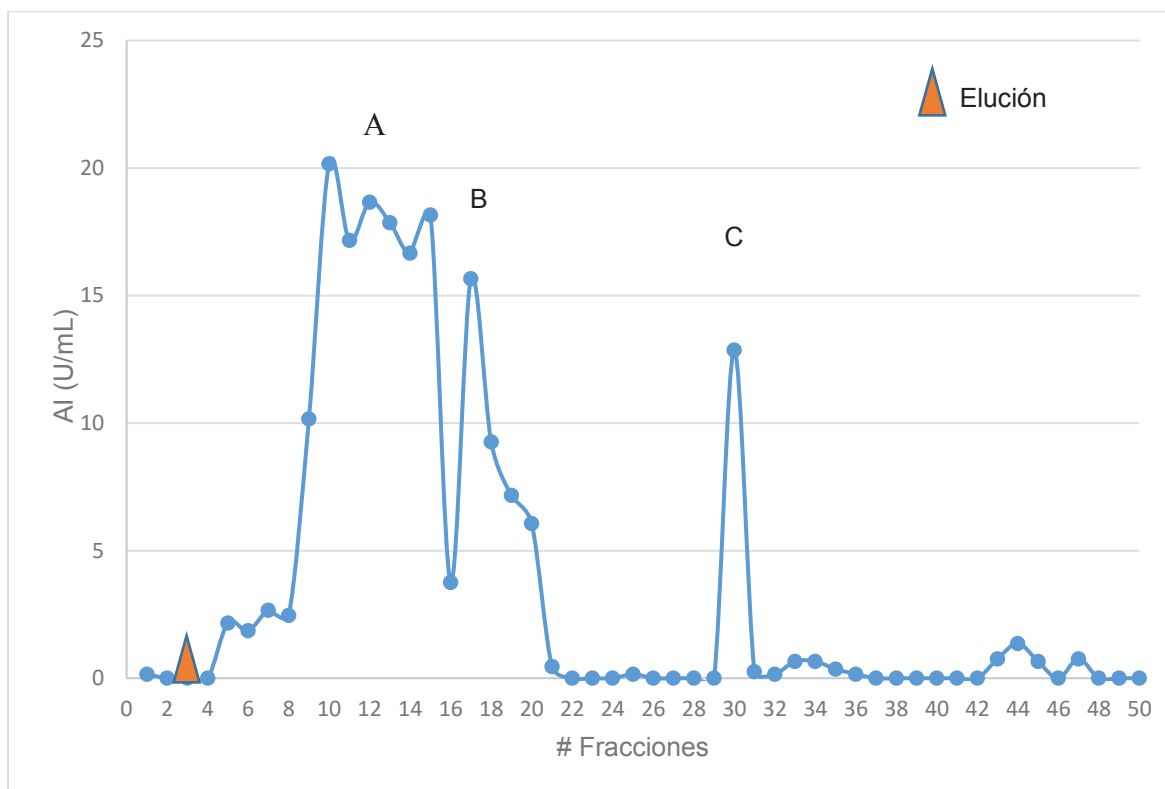


Figura 3.6. Gráfico de la actividad inhibidora versus el número de fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del permeado del extracto acuoso de quinua

En la Figura 3.6. se aprecia la formación de varios picos con actividad inhibidora frente a pepsina. De igual manera que en la Figura 3.6, después de la elución acida se formaron picos con alta AI, por lo cual se agruparon las fracciones con mayor AI; en este caso se formó el Lote A con las fracciones 10 a 15, el Lote B con las fracciones 17 y 18, y finalmente el Lote C con la fracción 30. El Lote A presentó el mayor valor de AI con 20,20 U/ml, seguido por el Lote C con 13,90 U/mL y finalmente por el Lote B con 13,00 U/mL. La formación de estos lotes (A, B y C), confirman la existencia de inhibidores en el permeado del extracto de quinua.

Con la cromatografía se logró mejorar la AIE y el GP. El resultado de la AIE fue de 127,16 U/mg y el GP fue de 13,65 veces.

En la Figuras 3.7. y 3.8. se esquematiza el cromatograma y gráfica del retenido obtenido a partir de los resultados de [P] y AI; respectivamente, de esta fracción versus el número de fracciones recolectadas en la purificación selectiva realizada en la matriz de afinidad Pepsina-DEAE-Sepharosa CL-6B. En el Anexo IV se

presenta las mediciones de las fracciones más activas del retenido y del permeado.

En la Figura 3.7. se presenta el cromatograma correspondiente al retenido del extracto de quinua.

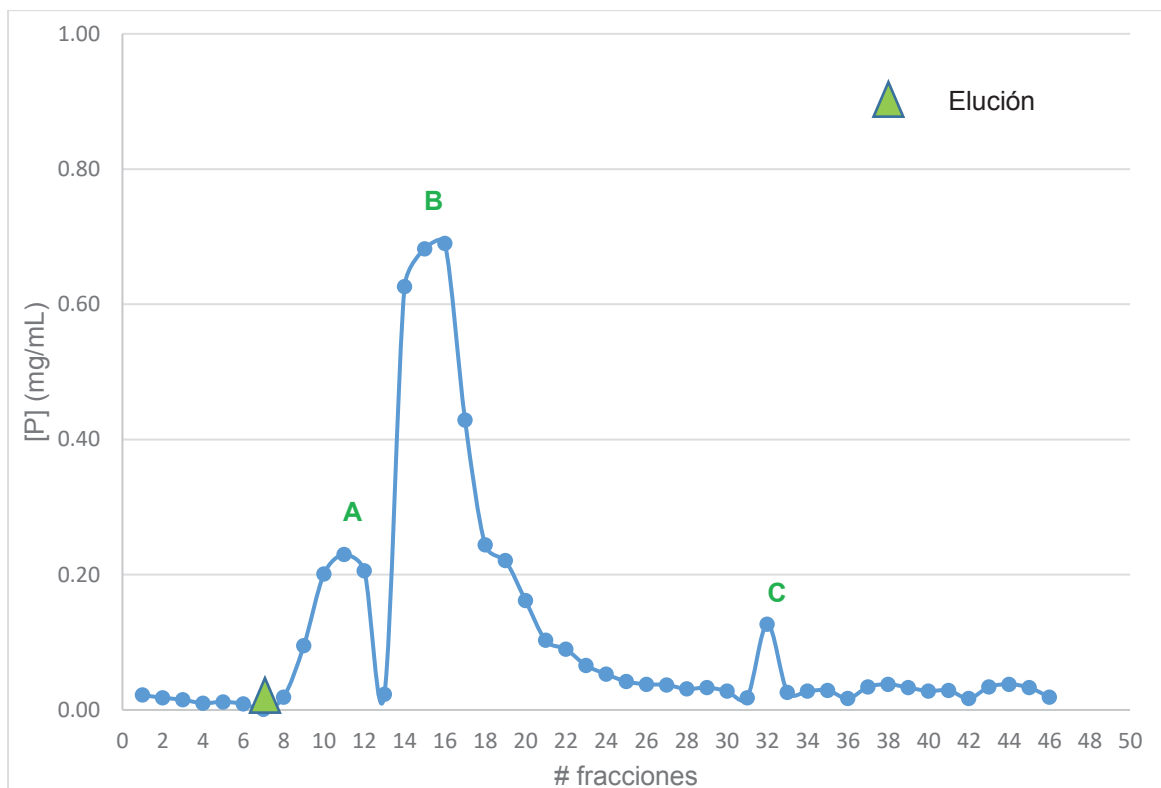


Figura 3.7. Concentración de proteína versus el número de fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del retenido del extracto acuoso de quinua

Al igual que en el permeado, después de la elución ácida se formaron picos con la mayor [P]. Estos picos se agruparon por lotes, siendo el Lote A el conformado por las fracciones 10, 11 y 12; el Lote B compuesto por las fracciones 14, 15 y 16 y el Lote C formado por la fracción 32.

En el Lote B se obtuvo un máximo de [P] igual a 0,690 mg/mL, seguido por la fracción número 11 presente en el Lote A con un valor de 0,230 mg/mL y, finalmente la fracción 32 que representa e Lote C con 0,127 mg/mL.

En la Figura 3.8. se presenta el gráfico de la AI del retenido versus el número de fracciones recolectadas.

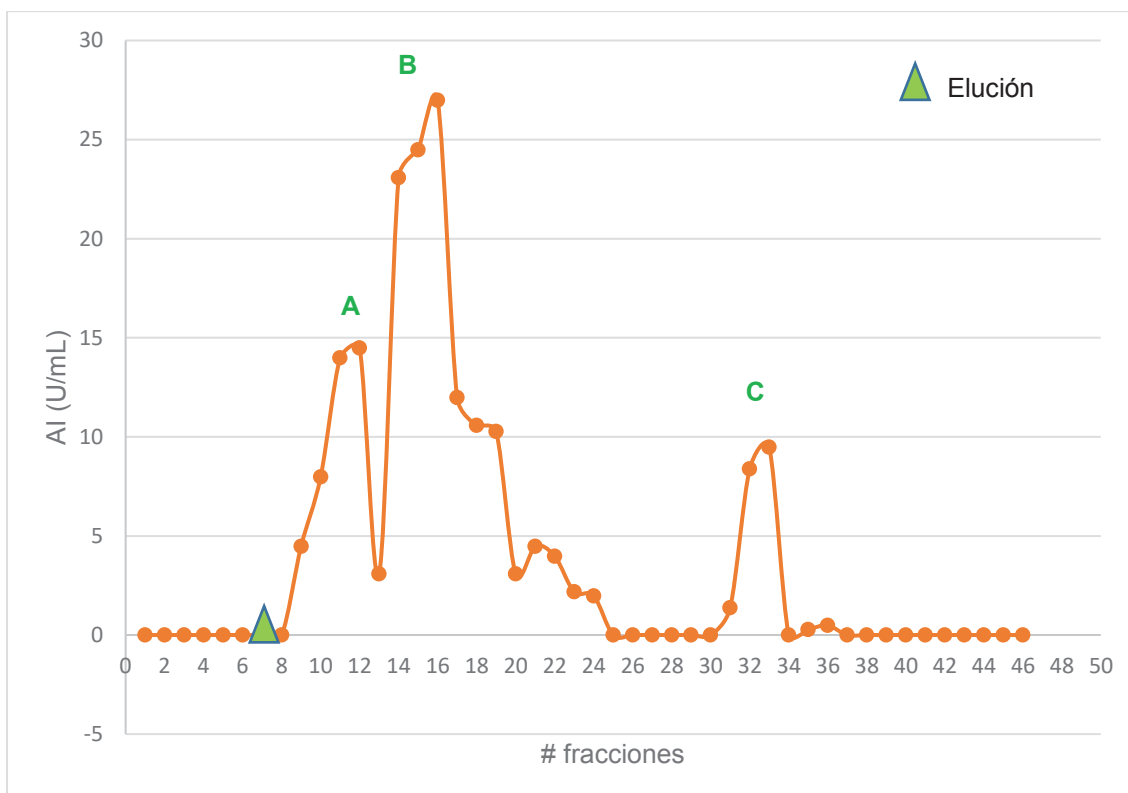


Figura 3.8. Gráfico de la actividad inhibidora versus el número de fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad del retenido del extracto acuoso de quinua

La Figura 3.8. indica los lotes correspondientes a las fracciones con mayor AI frente a pepsina. El Lote A conformado por las fracciones 11 y 12; el Lote B con las fracciones 14, 15 y 16 y el Lote C con las fracciones 32 y 33.

Para determinar los valores de AI, AIE, GP, %RP y %RAI se mezclaron los lotes más activos con lo cual se determinaron esos valores. Con la purificación selectiva del retenido se obtuvo una AIE de 127,84 U/mg. El GP logrado a través de esta etapa fue de 13,72 veces.

3.4.2 DISEÑO DEL SISTEMA DE PURIFICACIÓN MÁS ACTIVO SOBRE PEPSINA

A partir de los resultados de AI, AIE y GP obtenidos de la purificación parcial de los extractos de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua y sangorache se analizó estadísticamente que extracto presentó mayor inhibición frente a pepsina y se

determinó que fue el extracto de quinua.

Para terminar con la purificación, se procedió a purificar selectivamente el permeado y el retenido del extracto de quinua empleando cromatografía de afinidad en la matriz Pepsina-DEAE-Sepharosa CL-6B.

En la Tabla 3.10. se detallan los resultados obtenidos de [P], AI, AIE, GP, %RP y %RAI, para el permeado después de cada purificación.

Tabla 3.10. Etapas de purificación realizadas al permeado de quinua

ETAPA	V (mL)	[P] (mg/mL)	AI (U/mL)	AIE (U/mg)	GP (veces)	RCP (%)	RAI (%)
EC	13,5	3,85 ± 0,10	35,90 ± 1,66	9,31 ± 0,49	1,00	100	100
UC	8,6	2,02 ± 0,39	20,17 ± 1,25	10,01 ± 0,22	1,07	33,42	35,79
TC	6,4	1,77 ± 0,86	24,40 ± 1,70	13,81 ± 1,59	1,38	21,74	90,03
SA	5,9	1,21 ± 0,00	26,90 ± 0,53	22,25 ± 0,47	2,39	13,71	101,63
CA	2,2	0,68 ± 0,05	87,36 ± 5,31	127,16 ± 3,39	13,65	2,90	243,33

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

EC: Extracto crudo

UC: Ultrafiltración centrífuga a 10 kDa

TC: Tratamiento calórico

SA: Precipitación salina por sulfato de amonio

CA: Cromatografía de afinidad

Con los resultados obtenidos, se concluye que para purificar las fracciones inhibitoras presentes en el permeado de quinua, se requiere una purificación en serie compuesta por varias etapas como son: ultrafiltración centrífuga, tratamiento calórico a 60 °C durante 30 min, precipitación salina con sulfato de amonio y la cromatografía de afinidad en la matriz Pepsina-DEAE-Sepharosa CL-6B.

Por otro lado, en la Tabla 3.11. se detallan los resultados obtenidos de [P], AI, AIE, GP, %RP y %RAI, para el retenido después de cada purificación.

Tabla 3.11. Etapas de purificación realizadas al retenido de quinua

ETAPA	V (mL)	[P] (mg/mL)	AI (U/mL)	AIE (U/mg)	GP (veces)	RCP (%)	RAI (%)
EC	13,5	3,85 ± 0,10	35,90 ± 1,66	9,31 ± 0,49	1,00	100	100
UC	4,5	1,71 ± 0,19	16,80 ± 0,26	9,85 ± 1,75	1,06	14,81	15,59
TC	2,9	1,63 ± 0,27	29,50 ± 0,83	18,15 ± 2,06	1,85	9,06	113,16
SA	2,7	1,61 ± 0,36	36,70 ± 0,83	22,77 ± 3,59	2,44	8,37	115,83
CA	1,3	0,65 ± 0,03	83,10 ± 2,83	127,84 ± 4,35	13,72	1,62	231,47

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

EC: Extracto crudo

UC: Ultrafiltración centrífuga a 10 kDa

TC: Tratamiento calórico

SA: Precipitación salina por sulfato de amonio

CA: Cromatografía de afinidad

A partir de los resultados presentados en la Tabla 3.11. se concluye que al igual que el permeado, el retenido también requiere de todas las etapas de purificación parcial mencionadas para obtener un efecto positivo sobre el GP de las fracciones inhibitoras.

A continuación, en la Figura 3.9., se presenta un diagrama que esquematiza el proceso a seguir para purificar las fracciones.

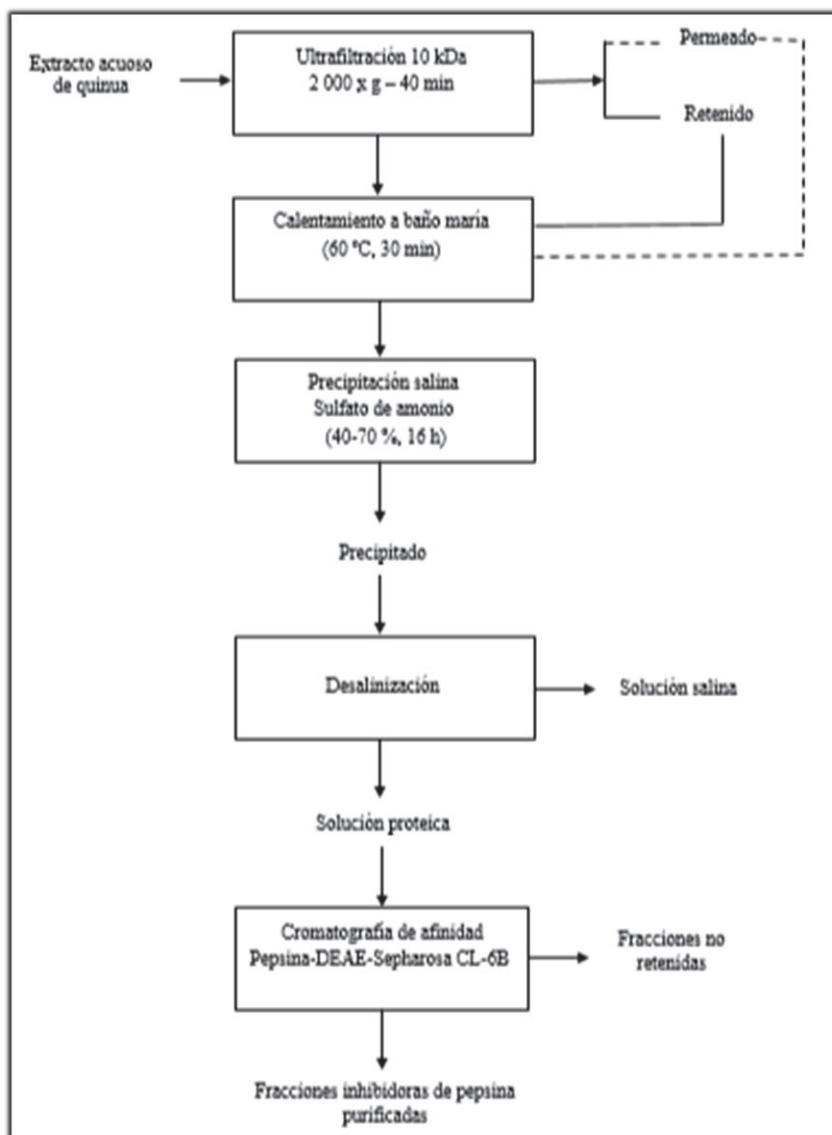


Figura 3.9. Diseño del sistema de purificación para los inhibidores presentes en el extracto acuoso de quinua

3.5 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y MOLECULAR DEL INHIBIDOR MÁS ACTIVO DE PEPSINA

3.5.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

En la Tabla 3.12. se detallan los resultados obtenidos para la caracterización cinética del permeado, del retenido y de la pepsina con y sin los lotes inhibidores, a partir de la cromatografía de afinidad al agrupar los picos más activos del permeado

(P) y del retenido (R).

Tabla 3.12. Actividad proteolítica de pepsina a diferentes concentraciones de pepsina

Concentración de caseína		Actividad proteolítica de pepsina en (U/mL)		
mg/mL	mM	Pepsina	Lote P	Lote R
3	0,252	14,80 ± 1,31	12,70 ± 2,28	12,50 ± 0,86
5	0,420	23,70 ± 0,45	20,40 ± 2,67	19,40 ± 2,61
7	0,588	29,10 ± 2,38	25,40 ± 1,23	24,90 ± 1,25
11	0,924	38,30 ± 2,69	32,40 ± 2,57	32,50 ± 2,12
15	1,260	45,00 ± 1,86	39,40 ± 4,16	39,00 ± 2,83

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

En la Figura 3.10. se esquematiza el inverso de los resultados obtenidos en la Tabla 3.12. de AE de pepsina frente a la concentración de sustrato con la finalidad de determinar si la enzima tiene un comportamiento que se ajuste al modelo de Michaelis-Menten.

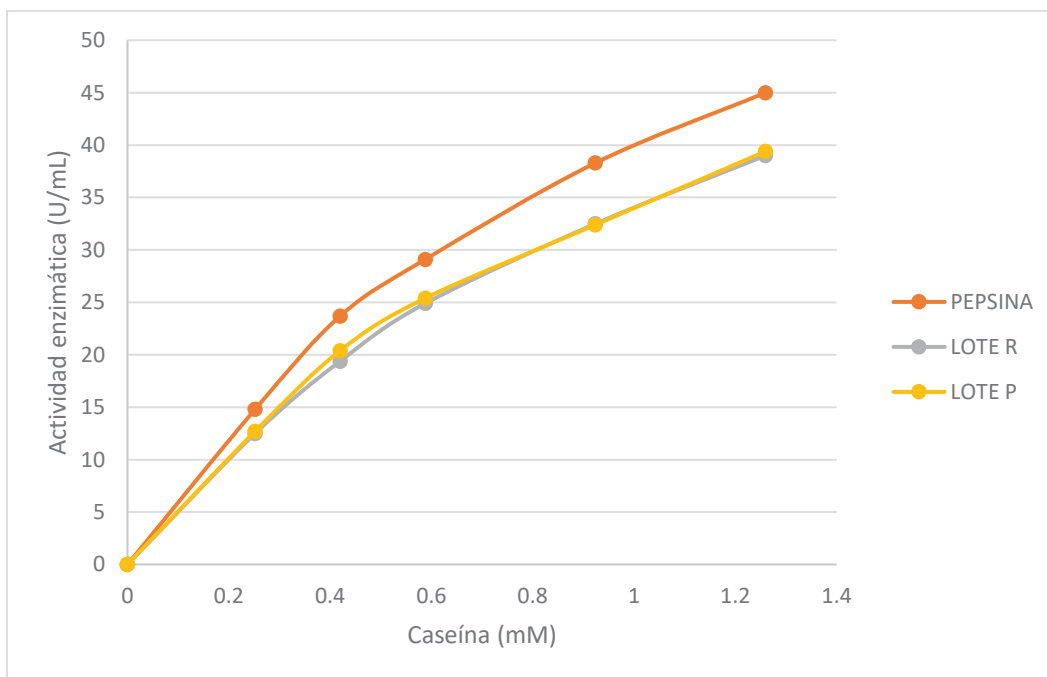


Figura 3.10. Actividad enzimática de pepsina, lote inhibidor del retenido y lote inhibidor del permeado versus caseína a diferentes concentraciones

Como se observa en la Figura 3.10., la pepsina se comporta de acuerdo con el modelo de Michaelis-Menten, debido a que en la figura se observa que a concentraciones bajas de caseína existe una tendencia lineal; mientras que, a concentraciones mayores a 0,4 mM la actividad enzimática crece, hasta que llegará a su valor máximo, de acuerdo con el modelo mencionado (Devlin, 2004, p. 421-422).

Con estos antecedentes se realizó el gráfico de los dobles recíprocos que se presenta en la Figura 3.11.

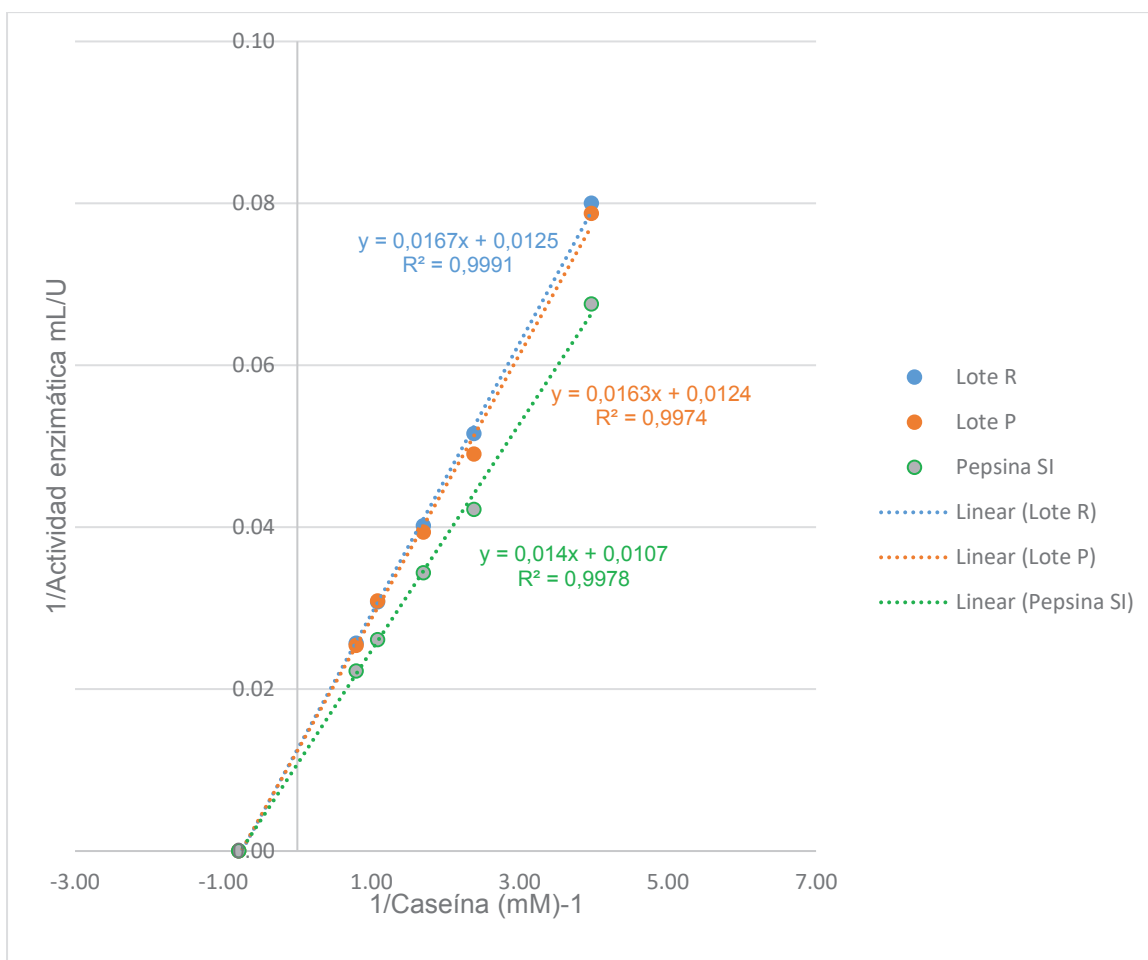


Figura 3.11. Gráfico de los dobles recíprocos para el Lote R, para el Lote P y para la pepsina sin inhibidor

En la Tabla 3.13. se indican los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y de K_m para la pepsina en ausencia de los lotes inhibidores y en presencia de los mismos, determinados a partir del gráfico de los dobles recíprocos. Un ejemplo de cálculo de la determinación

de la $V_{m\acute{a}x}$ y de la K_m se encuentra en el Anexo V.

Tabla 3.13. Parámetros cinéticos de la pepsina en ausencia y en presencia del Lote P y del Lote R

Pepsina	Parámetros cinéticos	
	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL)	K_m (mM)
Sin inhibidor	$93,46 \pm 0,03^a$	$1,31 \pm 0,01^a$
Con Lote R	$80,00 \pm 1,91^b$	$1,34 \pm 0,02^a$
Con Lote P	$80,65 \pm 2,04^b$	$1,31 \pm 0,01^a$

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

Columnas con diferentes letras presentan diferencias estadísticamente significativas, según la prueba LSD (95% de confianza)

De acuerdo con las variaciones experimentadas entre la pepsina sin inhibidor y la pepsina con inhibidor se puede determinar que el inhibidor presente en los lotes inhibidores fue no competitivo puro. Esto debido a que existe disminución en la $V_{m\acute{a}x}$ y una K_m constante. Al tener este tipo de inhibición, se infiere que el inhibidor no se unió al centro activo de la enzima, sino a otro punto de la misma (Donoso, 2006, p. 4).

Como se observa en la Tabla 3.13., no existen diferencias estadísticamente significativas ni para el valor de $V_{m\acute{a}x}$ ni para el valor de K_m entre los lotes (P y R). Esto confirma la presencia de un solo tipo de inhibidor que se ha repartido en las purificaciones parciales del retenido y del permeado.

En este caso, los picos más activos provenientes de la cromatografía con los cuales se formó el Lote R y el Lote P han bloqueado la formación del complejo ES.

El valor de K_m no experimenta variaciones, pues en este tipo de inhibición disminuye la afinidad por el sustrato aumentando el valor de K_m o a su vez se mantiene constante haciendo que la afinidad por el sustrato permanezca sin sufrir cambios.

Se observa en la Tabla 3.13. que K_m prácticamente se mantiene constante, por lo

cual no se ha perdido afinidad por el sustrato (Müller, 2008, p. 178).

Por otro lado, se tiene la investigación realizada por Molina (2011), quien extrajo inhibidores de aspártico proteasas a partir de extractos de semillas. El extracto proteínico con mayor inhibición frente a las aspártico proteasas fue el de *Lupinus bogotensis*.

En contraste con esta investigación, la inhibición resultó competitiva (p.131). Esto se pudo deber a que en el estudio de Molina se obtuvieron inhibidores a partir de semillas de origen distinto a las estudiadas en esta investigación; es decir, a partir de otras especies diferentes a la quinua. Sin embargo, existen estudios en los cuales se han encontrado inhibidores no competitivos frente a pepsina a partir de N-acetil-aminoácidos (Greenwell, Knowles y Sharp, 1969, pp. 365-366).

3.5.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Para realizar esta caracterización, se empleó la técnica de electroforesis SDS-PAGE. El extracto crudo de quinua y los inhibidores purificados fueron caracterizados según la metodología descrita en el acápite 2.6.2.

Una vez purificados selectivamente por cromatografía de afinidad, se desalinizó y concentró la muestra para obtener una concentración de proteína necesaria para electroforesis. Se realizaron dos corridas electroforéticas, en la primera tuvo lugar la electroforesis para el extracto crudo de quinua y en la segunda se realizó la corrida electroforética de las muestras purificadas.

El resultado de esta corrida se encuentra en la fotografía de la Figura 3.12. en la cual se visualizan las bandas generadas en tres carriles.

El primer carril es el que representa el estándar de proteínas, mientras que el carril dos pertenece al extracto acuoso de quinua y el carril tres muestra una repetición del extracto de quinua.



Figura 3.12. Electroforesis SDS-PAGE para el extracto acuoso de quinua

Como se observa en la Figura 3.12. las bandas generadas para el extracto acuoso de quinua no están muy bien definidas. Esto se debe a que existe una amplia variedad de proteínas en ese extracto.

Sin embargo, como también se puede visualizar, los carriles dos y tres no muestran bandas definidas, ya que son bandas que ocupan todo el carril. Esto se debe al efecto de la ultrafiltración centrífuga con membrana de 50 kDa, que se realizó para obtener el extracto de quinua, que constituye el permeado de este proceso y; por tanto, contiene proteínas de peso molecular cercanas a 50 kDa.

Los lotes P y R recolectados en la cromatografía de afinidad, en la matriz Pepsina-DEAE-Sepharosa CL-6B, también fueron caracterizados molecularmente mediante electroforesis SDS-PAGE.

La corrida electroforética para los lotes inhibidores se visualiza en la Figura 3.13. en la cual se aprecian tres carriles. El carril uno representa el estándar para los purificados, en el carril dos se encuentra el Lote R y en el carril tres el Lote P.

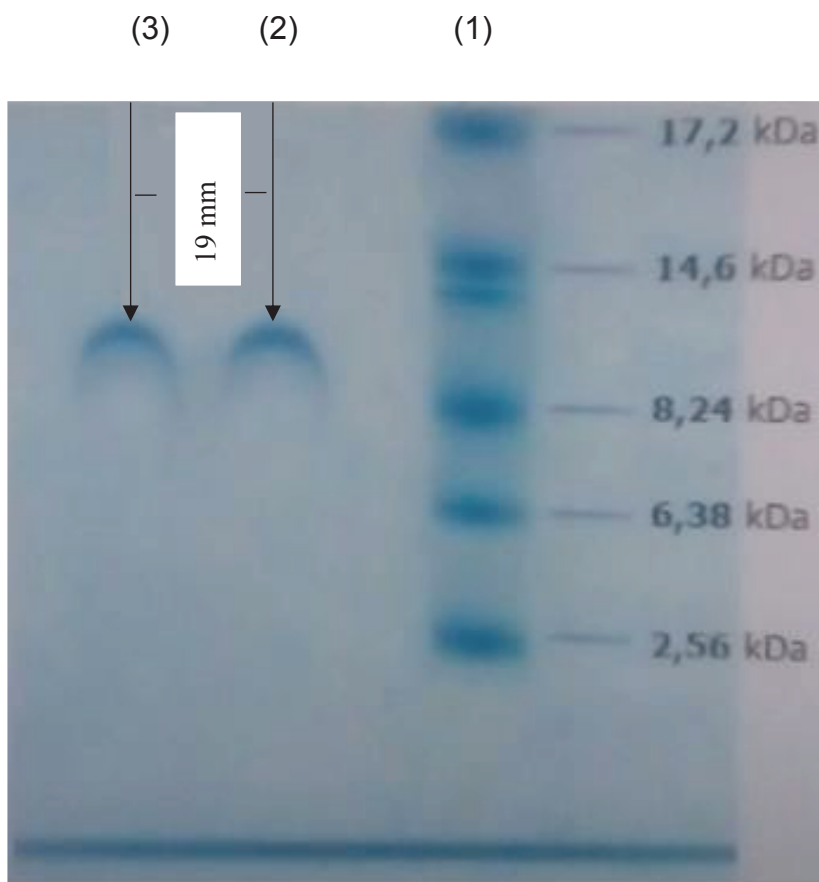


Figura 3.13. Electroforesis SDS-PAGE para los lotes inhibidores con su respectiva movilidad relativa

Se observa en la Figura 3.13. que para el Lote R y para el Lote P se formó una sola banda, lo cual representa el empleo de un eficiente método de purificación de los lotes inhibidores.

Para la determinación del peso molecular de las muestras, se realizó la curva de calibración para el estándar. En la Figura 3.14. se presenta el gráfico de los pesos moleculares de las bandas generadas en el estándar en función de la movilidad relativa que han generado.

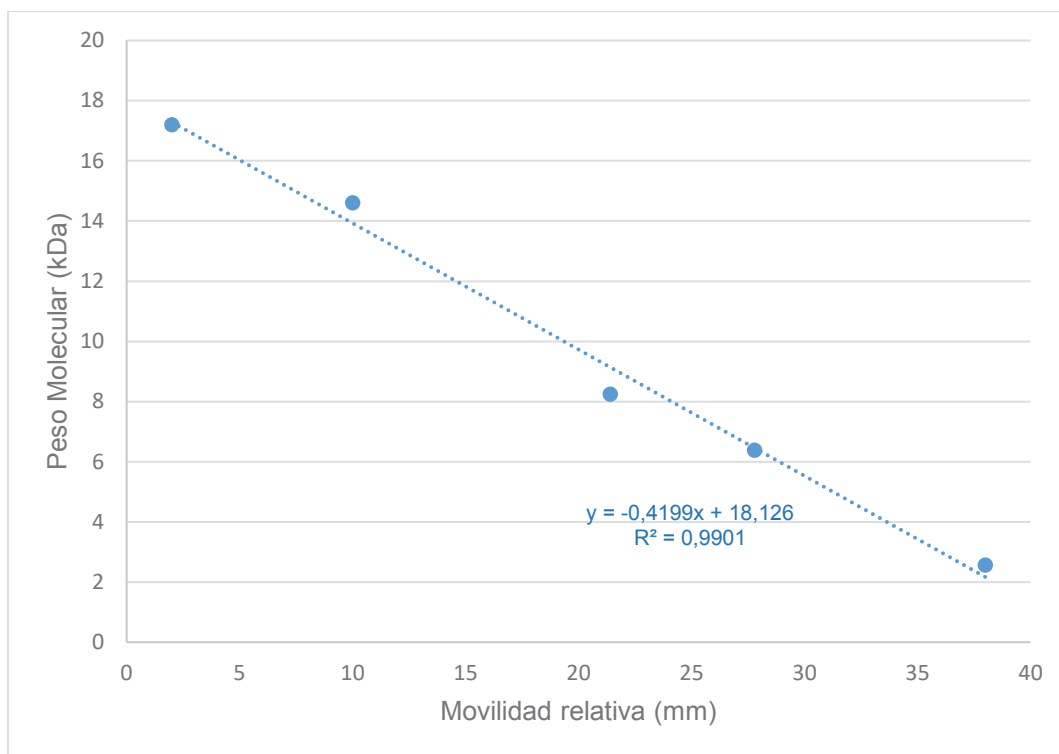


Figura 3.14. Curva de calibración de movilidad relativa de las bandas generadas en el estándar

En la Figura 3.14. se observa que existe una tendencia lineal debido al valor del R^2 obtenido (0,9901). A partir de esta curva se determinó el peso molecular para el inhibidor purificado, el cual fue de 9,57 kDa.

Para determinar el valor de la K_i se determinó el tipo de inhibición hallado en el acápite 3.5.1. y el peso molecular calculado. El ejemplo de cálculo para determinar el valor de la K_i se encuentra en el Anexo V.

En la Tabla 3.14., se muestran los valores de K_i para el permeado y para el retenido con sus respectivas desviaciones.

Tabla 3.14. Resultados de la K_i para el permeado y para el retenido

Fración	Constante de inhibición (K_i), (μM)
Permeado	$0,094 \pm 0,004$
Retenido	$0,088 \pm 0,004$

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 3)

El valor de K_i para el inhibidor presente en el retenido de quinua fue de $0,088 \pm 0,004 \mu\text{M}$ y para el inhibidor del permeado fue de $0,094 \mu\text{M} \pm 0,004$. Estos valores fueron analizados en el software Statgraphics Centurion XV a través de un análisis de varianza (ANOVA) con el 95 % de confianza y se realizó el gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD que se presenta en la Figura 3.15. En la Figura 3.15. se observa que la K_i del retenido y la K_i del permeado son estadísticamente iguales.

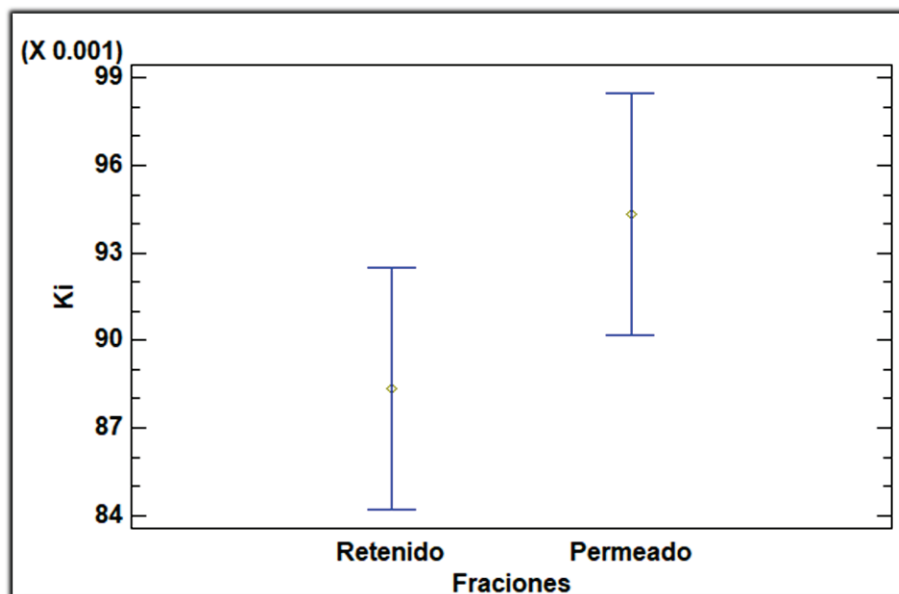


Figura 3.15. Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para la K_i del retenido y del permeado del extracto de quinua

Adicionalmente, con los valores expuestos en la Tabla 3.14., se determinó que los inhibidores encontrados en las fracciones del retenido y del permeado de quinua correspondían a un mismo inhibidor no competitivo con una K_i promedio de $0,091 \pm 0,005 \mu\text{M}$.

Se infiere que al tener la misma movilidad relativa para ambos lotes se trata del mismo inhibidor y se confirma una vez más que el inhibidor se ha repartido en el permeado y en el retenido del extracto de quinua, como se mencionó en el acápite 3.5.1.

Se han encontrado inhibidores no competitivos en el extracto de fréjol en la investigación realizada por Jácome (2015), quien encontró inhibición frente a papaína en fréjol (p. 154). De igual manera, Ruiz (2017) confirmó este tipo de

inhibición frente a papaína en el extracto de fréjol, con un K_i de $0,058 \mu\text{M}$.

Los resultados de la Tabla 3.13. concuerdan con la investigación realizada por Menon y Rao (2012), quienes estudiaron inhibidores de las aspártico proteasas provenientes de microorganismos y, entre otros, encontraron inhibidores no competitivos con una K_i de $(17 \pm 0,8) \times 10^{-9} \text{ M}$ frente a pepsina (pp. 12-15). Aunque la fuente es diferente, la naturaleza y el orden de magnitud de la K_i coinciden.

Estudios realizados a la inhibición que presenta una especie de alga (*Ecklonia cava*) frente a una aspártico proteasa, transcriptasa inversa VIH-1, mostraron que existe una inhibición no competitiva con un K_i de $0,78 \mu\text{M}$ (Ahn et al., 2004, p. 545).

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. Al evaluar la AIE de los extractos acuosos, se determinó que el extracto de quinua presentó la mayor inhibición frente a pepsina, seguido del amaranto y sangorache con un AIE de 9,67; 5,27 y 4,72 U/mg, respectivamente.
2. El pH escogido para inmovilizar pepsina fue el de 2,0 debido a que se obtuvo la mayor cantidad de enzima inmovilizada (24,72 mg), con la mayor retención de actividad funcional (728 U).
3. La cromatografía de afinidad en la matriz Pepsina-DEAE-Sepharosa CL-6B de los inhibidores presentes en el extracto de quinua logró mejorar el GP hasta 13,65 veces para el permeado y 13,72 veces para el retenido.
4. De acuerdo con la caracterización cinética, los inhibidores encontrados en el extracto de quinua correspondían a un mismo inhibidor no competitivo con una K_i promedio de $0,091 \pm 0,005 \mu\text{M}$. El peso molecular del inhibidor de pepsina encontrado en el permeado y en el retenido del extracto de quinua fue de aproximadamente 9,5 kDa.

4.2 RECOMENDACIONES

1. Evaluar la estabilidad de la retención de actividad funcional (RAF) con respecto al tiempo de almacenamiento del preparado inmovilizado.
2. Purificar selectivamente mediante la matriz DEAE-Sepharosa CL-6B los extractos acuosos de amaranto y sangorache que también presentaron AIE frente a pepsina.
3. Evaluar la efectividad del proceso de inmovilización por intercambio iónico mediante la inmovilización de otras enzimas por el mismo método.

4. Mejorar la resolución de los cromatogramas, por ejemplo, con el empleo de eluyentes aplicados con una gradiente de concentración.
5. Escalar el proceso para obtener cantidades suficientes de inhibidor que permita la realización de ensayos sobre la actividad biológica en microorganismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahn, M., Yoon, K., Min, S., Lee, J., Kim, J., Kim, T., Kim, S., Kim, N., Huh, H. y Kim, J. (2004). Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease by Phlorotannins from the Brown Alga *Ecklonia cava*. 27 (4), 544-547. doi: 10.1248/bpb.27.544.
2. Aitken, A. y Laermonth, M. (2002). *Protein determination by UV absorption*. En Walker, J. (Ed.). *Protocols Handbook*. Totowa, Estados Unidos: Humana Press Inc. Recuperado de: http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Protein%20workshop/Protein%20Handbook.pdf (Mayo, 2017).
3. Almécija, M. (2007). *Obtención de lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España. Recuperado de: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1721/1/17243518.pdf> (Mayo, 2017).
4. Antonov, V., Ginodman, L., Kapitannikov, Y., Barshevskaya, T., Gurova, A. y Rumsh, L. (1978). Mechanism of pepsin catalysis: General base catalysis by the active-site carboxylate ion. *FEBS LETTERS*, 88 (1), 87-90. doi: 10.1016/0014-5793(78)80613-9.
5. Arroyo, M. (1998). *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Recuperado de: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/125.pdf> (Septiembre, 2016).
6. Baynes, J. y Dominiczak, M. (2011). *Bioquímica Médica*. (3ra. Ed.). Barcelona, España: Elsevier.
7. Becerril, I. (2008). *Electroforesis*. Recuperado de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Exposicion_electroforesis_5087.pdf (Julio, 2017).
8. Berg, J., Tymoczko, J. y Stryer, L. (2007). *Bioquímica: Estrategias catalíticas*.

(6ta. ed.). Barcelona, España: Reverté.

9. Biasuatti, E., De Marco, L., Afonso, W., Silva, V., Lopes, D. Y Silvestre, M. (2006). Utilización de dos soportes para la inmovilización de la papaína. *Ars Pharmaceutica*, 47 (4), 425-435.
10. Bio-Rad, (2013). *Model 385 and 395 Gradient Former Instruction Manual*. Recuperado de: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1652000.pdf> (Abril, 2017)
11. Brandt, U., Anderka, O., Kieb, S., Ridinger, K. y Plenikowski, M. (2008). Cromatografía de afinidad. Bioquímica: *Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. (1era. ed.). Barcelona, España: Reverté.
12. Brenes, A. y Brenes, J. (1993). *Tratamiento tecnológico de los granos de leguminosas: influencia sobre su valor nutritivo*. Recuperado de: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/17272/1/CD-7778.pdf> (Octubre, 2017).
13. Burns, R. (2003). *Enlaces químicos: Enlace iónico*. (4ta. ed.). México: Prentice Hall México.
14. Guisan, J. (2006). *Immobilization of enzymes and cells: Immobilization of enzymes*. (2da. ed.). Madrid, España: Humana Press Inc.
15. Campos, L. y Sancho, J. (2003). The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH. *FEBS Letters*, 538 (1), 89-95. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00152-2.
16. Carrillo, W., Vilcacundo, R. y Carpio, C. (2015). Compuestos Bioactivos derivados de amaranto y quinua. *Actualización en nutrición*, 16 (1), 18- 22.

17. Castillo, F. (2005). *Biotecnología Ambiental: Tecnología enzimática*. (1ra. ed.). Madrid, España: Tébar, S. L.
18. Ceciliani, F., Bortolotti, F., Menegatti, E., Ronchi, S., Ascenzi, P. y Palmieri, S. (1994). Purification, inhibitory properties, amino acid sequence and identification of the reactive site of a new serine proteinase inhibitor from oil-rape (*Brassica napus*) seed. *FEBS Letters*, 342 (1), 221-224. doi: 10.1016/0014-5793(94)80505-9.
19. Chiche, L., Heitz, A., Gelly, J., Gracy, J., Chau, P., Ha, P., Hernandez, J. y Le-Nguyen, D. (2004). Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Current Protein and Peptide Science*, 5 (5), 341-349. doi: 10.2174/1389203043379477.
20. Coronato, S., Laguens, G. y Girolamo, V. (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina (Buenos Aires)*, 72 (1), 495- 502. Recuperado de: <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v72n6/v72n6a12.pdf> (Abril, 2017).
21. Cutiño, B., Gil, D., Aragón, C., Fernández, Y., Hernández, M., Salas, E., Chávez, M., Guisán, J., Díaz, J. y Del Monte, A. (2014). Computeraided design of bromelain and papain covalent immobilization. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16 (1), 19-28. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77631180002> (Julio, 2017).
22. Dev, K., Strugala, V. y Dettmar, P. (2011). Reflux Revisited: Advancing the Role of Pepsin. *International Journal of Otolaryngology*, 2012 (1), 1-13. doi:10.1155/2012/646901.
23. Devlin, T. (2004). *Bioquímica: Métodos para la caracterización, purificación y estudio de la estructura y la organización de las proteínas*. (4ta. ed.). Barcelona, España: Reverté S.A.

24. Di Cera, E. (2009). Critical review serine proteases. *IUBMB Life*, 61(5), 510-515. doi: 10.1002/iub.186.
25. Dueñas, Y., Narváez, E. y Sánchez, R. (2008). Búsqueda de las mejores condiciones para la extracción y medida de actividad de celulasa y xilanas extraídas de la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). *Acta Biológica Colombiana*, 13 (1), 217-228.
26. Dunaevsky, Y., Elpidina, E., Vinokurov, K., y Belozersky, M. (2004). Review and experimental articles. *Protease Inhibitors in Improvement of Plant Resistance to Pathogens and Insects*, 39(4), 608-613. doi: 10.1007/s11008-005-0076-y.
27. Duong, L. y Gabelli, S. (2014). Salting Out Of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in Enzymology*, 541, 86-94. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0.
28. Echeverría, P. (2014). Purificación y Caracterización de Inhibidores de Tripsina Provenientes de Semillas de Amaranto, Arveja, Chocho, Fréjol y Sangorache, mediante Cromatografía de Afinidad. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Química). Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.
29. Elizalde, A., Porrilla, Y. y Chaparro, D. (2009). Factores antinutricionales en semillas, *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7 (1), 45-54.
30. Errasti, M. (2013). Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromiliáceas y su comparación con bromelina. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional De La Plata. La Plata, Argentina.
31. Fan, S. y Wu, G. (2005). Plant proteinase inhibitors against phytophagous insects. *Botanical Studies, An International Journal*, 46 (1), 273–292.

Recuperado de: <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2005/4/Bot464-01.html> (Julio, 2016).

32. Félix, R. (2008). Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas de origen vegetal, a partir de muestras de hierba mora (*Solanum nigrum*) e Higuierón (*Ficus apollinaris*). (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico). Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.
33. Fersht, A. (1980). *Estructura y mecanismo de las enzimas: Pepsina*. (2da. ed.). Barcelona, España: Reverté S.A.
34. Fullana, N. (2014). *Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura*. (Tesis de maestría). Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
35. García, C. (2014). *Inhibidores de proteasas en leguminosas*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Nutricionista Humana y Dietética). Universidad de Valladolid, España.
36. García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-41.
37. García, A. y Sánchez, J. (1985). *Determinación de proteínas en hojas de Citrus. I. Métodos e interferencias*. Recuperado de: <http://revistas.um.es/analesumciencias/article/viewFile/100481/95851> (Agosto, 2017).
38. Garrido, A., Teijón, J., Blanco, D., Villaverde, C., Mendoza, C. y Ramírez, J. (2006). *Fundamentos de Bioquímica Estructural: Cinética e inhibición enzimática*. (2ed.). Madrid, España: Tébar S.L.
39. GE Healthcare Bio-Sciences AB. (2006). *DEAE Sepharose CL-6B*. Recuperado de: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20

Content/Files/1486400415621/litdoc71707400_20170206180007.pdf
(Septiembre, 2017).

40. González, M. (2009). Purificación y caracterización de una isoforma Calcio dependiente de proteína quinasa C en *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Galicia, España.
41. Greenwell, P., Knowles, R. y Sharp, H. (1969). The inhibition of pepsin-catalysed reactions by products and product analogues. *Biochemistry Journal*, 113 (2), 363-368.
42. Guijarro, L. (2013). *Química bioinorgánica del Riboswitch dependiente de coenzima B12 de la Klebsiella pneumoniae*. (Proyecto de titulación). Universidad de las Islas Baleares, <http://repositori.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/317/TFGGuijarroFerrerLlu%C3%ADs.pdf?sequence=1> (Septiembre, 2016).
43. Habib, H. y Majid, K. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology review*, 2 (3), 68-85. Recuperado de: http://www.academicjournals.org/article/article1380100578_Habeeb%20and%20Khalid.pdf (Septiembre, 2017).
44. Hernández, M., Carvajal, C., Márquez, M. y Chávez, M. (2004). Aislamiento de enzimas proteolíticas a partir de restos de cosecha de piña. *Cultivos tropicales*, 25 (4), 95- 102. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193225911013>.
45. Hernández, O., Compte, O., Quesada, L. y Rodríguez, A. (2009). *Caracterización electroforética y cromatográfica del veneno del alacrán *Rhopalurus junceus**. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102502552009000600002 (Septiembre, 2017).

46. Hill, R., Wyse, G. y Anderson, M. (2004). *Biología Animal: Conceptos fundamentales relacionados con las enzimas*. (3era. ed.). Madrid, España: Médica Panamericana S.A.
47. Iborra, J., Obón, J., Guardiola, J., Manjón, A. y Cánovas, M. (1992). Comparative study of reactor performance for the resolution of D, L-Amino acids. *Process Biochemistry*, 27 (1), 339-346. doi: [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)87012-6](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)87012-6).
48. INIAP. (2009). *Catálogo de variedades mejoradas de granos andinos para la Sierra de Ecuador*. Recuperado de: <http://www.iniap.gob.ec/nsite/imagenes/documentos/CATALOGO%20GRANOS%20ANDINOS.pdf> (Noviembre, 2009).
49. Jácome, G. (2015). Obtención de Extractos Clarificados y Concentrados de Inhibidores de Proteasas a partir de Semillas de Cereales y Leguminosas Seleccionadas. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
50. Jacobowski, H. (2017). *Uncompetitive inhibition*. Recuperado de: [https://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Biochemistry_Online_\(Jakubowski\)/06%3A_TRANSPORT_AND_KINETICS/C._Enzyme_Inhibition/C3._Uncompetitive_Inhibition](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Biochemistry_Online_(Jakubowski)/06%3A_TRANSPORT_AND_KINETICS/C._Enzyme_Inhibition/C3._Uncompetitive_Inhibition) (Julio, 2017).
51. Jamal, F., Pandey, P., Singh, D., y Khan, M. (2013). Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem Rev*, 12 (1), 1-34. doi: 10.1007/s11101-012-9231-y.
52. Jordan, J., Galindo, M., Ceña, V. y González, C. (2000). Cisteína proteasas y neurodegeneración. *Revista de Neurología*, 31 (4), 333-340. Recuperado de: <https://previa.uclm.es/profesorado/jjordan/pdf/review/1.pdf> (Abril, 2017).

53. Kakade, M., Swenson, D., y Liener, I. (1970). Note on the determination of chymotrypsin and chymotrypsin inhibitor activity using casein. *Analytical Biochemistry*, 33 (1), 255-258. doi: 10.1016/0003-2697(70)90294-0.
54. Klomklao, S., Kishimura, H., Yabe, M. y Benjakul, S. (2007). Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147 (1), 682- 689. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.04.008.
55. Koolman, J. y Röhm, K. (2004). *Bioquímica, texto y atlas: Aislamiento y análisis de proteínas*. (3era. ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A.
56. Kubota, N., Hashimoto, T. y Mori, Y. (2008). Microfiltration and Ultrafiltration. En Li, N., Fane, A., Winston, W. y Matsuura, T. (Ed.). *Advanced Membrane Technology and Applications*. (pp. 101-130). Hoboken, Estados Unidos: John Wiley & sons.
57. Labome. (2016). *Detergentes: Triton X-100, Tween-20, y más*. Recuperado de: <http://www.labome.es/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html> (Julio, 2017).
58. Labome. (2012). *Purificación de proteínas*. Recuperado de: <http://www.labome.es/method/Protein-Purification.html> (Septiembre, 2017).
59. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, p. 680.
60. Li, Y., Gao, F., Wei, W., Qu, J., Ma, G. y Zhou, W. (2010). Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66 (1), 182-189. doi:

10.1016/j.molcatb.2010.05.007.

61. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S. y Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS)*. (5ta. ed.). Buenos Aires: Argentina. Médica Panamericana.
62. Lomonte, B. (2002). *Electroforesis en gel de poliacrilamida*. Recuperado de: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/lab-bioq-gen/archivos/Lomonte%20-%20Cap13%20PAGE.pdf> (Julio, 2016).
63. Macarulla, J., Marino, A. y Macarulla, A. (2002). *Bioquímica Cuantitativa: Enzimas*. (2da. ed.). Barcelona, España: Reverté, S.A.
64. Martínez, R. y Gragera, R. (2008). *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica: Peptidasas*. (2da. ed.). Madrid, España: CSIC - CSIC Press.
65. Mateo, C., Palomo, J., Fernández, G., Guisán, J. y Fernández, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40.
66. Menon, V., y Rao, M. (2012). *Microbial aspartic protease inhibitors*. Recuperado de: http://ncl.csircentral.net/1135/1/Microbial_Aspartic_protease_inhibitors.pdf (Septiembre, 2017).
67. Meridor, D. y Gedanken, A. (2014). Enhanced activity of immobilized pepsin nanoparticles coated on solid substrates compared to free pepsin. *Enzyme and Microbial Technology*, 67 (1), 67-76. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.09.004.
68. Molina, D., Blanco, A., y Zamora, H. (2011). Inhibidores de proteasas de plantas efectivos contra las aspártico proteasas de *Hypothenemus hampei*.

Revista Colombiana de Entomología, 37 (2), 183–191. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielophp?script=sci_arttext&pid=S0120-04882011000200003 (Febrero, 2017).

69. Moran, L., Horton, H., Scrimgeour, K. y Perry, M. (2012). *Principles of Biochemistry: Reversible enzyme inhibitions*. (5ta. ed.). Estados Unidos: Pearson.
70. Muñoz, F. (2011). Aislamiento y Purificación de Inhibidores de Tripsina presentes en Semillas de Leguminosas o Gramíneas Producidas en el Ecuador. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial). Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.
71. Müller, W. (2008). *Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la vida*. (2da. ed.). Barcelona, España: Reverté.
72. Nelson, D. y Cox, M. (2013). *Principles of biochemistry: Kinetic parameters are used to compare enzyme activities*. (6ta. ed.). Nueva York, Estados Unidos: Freeman.
73. Nisha, S., Karthick, A. y Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme, *Chemical Science Review and Letters*, 1 (3), 148-155.
74. Ochoa, R., Osuna, J., Velásquez, C., Escalante, P. e Ibarra, V. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3 (6), 42-56.
75. Oliveira, V., Bezerra, R. y Dias, C. (2014). Fish Pepsin: Basic characteristics, extraction, determination and biotechnological applications. *Natural Resources*, 4 (1), 6-14. doi: 10.6008/SPC2237-9290.2014.001.0001.
76. Paiva, P., Pontual, E., Coelho, L. y Napoleão, T. (2013). Protease inhibitors from

plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. *Formatex*, 1 (1), 641-649. Recuperado de: <http://www.formatex.info/microbiology4/vol1/641-649.pdf> (Mayo, 2017).

77. Pascual, J., Moreno, J., Ros, M. y Vargas, M. (2015). *De residuo a recurso: Aspectos biológicos de la estabilización aeróbica*. (2da. ed.). Madrid, España: Mundi Prensa.
78. Patel, H. y Karhat, A. (2012). Comparative study of free enzyme and immobilized enzyme on BSA digestion. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3 (12), 5015-5023.
79. Peña, A., Arroyo, Á., Gómez, A., Tapia, R. y Gómez, C. (2004). *Bioquímica: Cinética Enzimática*. (2da. ed.). México D.F., México: Limusa S.A.
80. Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M. y Bañó, C. (2007). *Fundamentos de Bioquímica: Enzimología*. (1era. ed.). Valencia, España: Universitat de Valencia.
81. Prendes, L., Garzón, R. y Castillo, F. (2010). Bases moleculares de la vida: *Estructura y función de los aminoácidos*. (3era. ed.). Bogotá, Colombia: Editorial Universidad del Rosario.
82. Ramet, J. (2001). The Technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedaries*): *Ways of improving cheese made from camel milk*. (1era. ed.). Roma, Italia: Ilustrada.
83. Rege, A., Ambaye, R. y Chowdhary, A. (2014). Effect of *Costus pictus* D. Don. On Pepsin Enzyme. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (5), 178-180. Recuperado de: <http://www.ijppsjournal.com/Vol6Issue5/9182.pdf> (Enero, 2017).
84. Ritchie, C. (2012). Purificación de proteínas. *Labome. The world of laboratories*,

2 (134), 1-15. doi: 10.13070/mm.es.2.134.

85. Rocha, J. y García, F. (2008). Insecticidas clásicos y biopesticidas modernos: avances en el entendimiento de su mecanismo de acción, *BioTecnología*, 12(1), 50-62. Recuperado de http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2008_1/Insecticidas.pdf (Diciembre, 2016).
86. Rodríguez, J., Orbe, J. y Páramo, J. (2007). Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos. *Revista española de cardiología*, 60 (9), 959-967. doi: 10.1157/13109649.
87. Rodríguez, J., Perdomo, R. y Perera, E. (2012). Purificación de isoformas de proteasas tipo tripsina de crustáceos. *Revista de Investigaciones Marinas*, 32 (1), 1-8. Recuperado de: www.cim.uh.cu/rim/pdf/2012/1/1-8.pdf (Abril, 2017).
88. Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C. y Luque, M. (2005). *Bioteología ambiental: Inmovilización de enzimas*. Madrid, España: Tébar, S.L.
89. Romero, L., Mejía, C., Sánchez, A., Balagurusamy, N. y Luévanos, M. (2014). Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas, *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6 (11), 1-9. Recuperado de: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%2011/1.pdf> (Mayo, 2017).
90. Ruiz, T. (2017). Diseño de un sistema de purificación de inhibidores de papaína, provenientes de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua o sangorache, mediante cromatografía de afinidad. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

91. Ryan, C. (1990). Protease inhibitors in plants: *Genes for improving defenses against insects and pathogens*, 28 (1), 427-429. doi: 10.1146/annurev.py.28.090190.002233.
92. Salazar, A., Lizardi, J. Ramírez, C., García, G. y Ezquerro, M. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13 (1), p.129 - 150.
93. Sánchez, L., Cisternas, E. y Ponce, O. (1987). Partial purification of pepsins from adult and juvenile salmon fish *Oncorhynchus keta*. Effect of NaCl on proteolytic activities. *Comparative Biochemistry and physiology*, 87B (4), 793-797. doi: 10.1016/0305-0491(87)90390-7.
94. Schagger, H. y Von Jagow, G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166 (2), 368-379. doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
95. Serpa, A., Hincapié, G. y Álvarez, C. (2014). Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta Crantz*) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas L.*) y gmelina (*Gmelina arborea*). *Prospect*, (12) 1, 30-39. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/prosp/v12n1/v12n1a04.pdf> (Marzo, 2017).
96. Sjöberg, S. y Shi, G. (2011). Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysm. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 9 (1), 138-147. doi: 10.1007/s12018-011-9098-2.
97. Solari, A. (2004). *Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en Medicina: Fenómenos básicos y técnicas de genética molecular*. (3era. ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.

98. Takahashi, K. (1995). *Aspartic proteinases: Structure, function, biology, and biomedical implications*. (6ta. ed.). Tokyo, Japan: Springer Science and Business media, LLC.
99. Tramontin, G. (2014). *Producción de proteasas recombinantes de tripanosomátidos y su efecto sobre células del sistema inmune*. Recuperado de: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/5100/1/uy24-17231.pdf> (Octubre, 2017).
100. Turra, D. y Lorito, M. (2011). Potato type I and II proteinase inhibitors: modulating plant physiology and host resistance. *Current Protein and Peptide Science*, 12 (1), 374-385. doi: 10.2174/138920311796391151.
101. Unglaub, D., Ober, W., Garrison, C., Silverthorn, A. y Johnson, B. (2007). *Fisiología humana: Digestión y absorción*. (4ta. ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
102. Universidad Nacional de Quilmes. (2010). *Electroforesis en gel de poliacrilamida*. Recuperado de: <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp3.pdf> (Julio, 2017).
103. Velga, A. (2013). *Western Blot Introducción y Optimización*. Recuperado de: <http://docs.abcam.com/pdf/events/spanishwbwebinar.pdf> (Julio, 2017).
104. Verma, S., Dixit, R. y Pandey, K. (2016). Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in Pharmacology*, 7 (107), 1-12. doi: 10.3389/fphar.2016.00107.
105. Vioque, J., Sánchez, R., Clemente, A., Pedroche, J., Mar, M. y Millán, F. (2000). Alcalase Rapeseed Inhibitors: Purification and Partial Characterization. *Journal Enzyme Inhibition*, 16 (1), 81-87. doi: 10.1080/14756360109162357.

106. Vizoso, F., Vázquez, J., Martín, A., Lamelas, M., Rodríguez, J. y Alonso, C. (2002). Aspartil-proteasas y cáncer de mama. *Revista de senología y patología mamaria*, 15 (3), 123-132. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria-131-articulo-aspartil-proteasas-cancer-mama-13038930> (Mayo, 2017).
107. Voet, D. y Voet, J. (2006). *Bioquímica*. (3ra. ed.). Montevideo, Uruguay: Médica Panamericana.
108. Voet, D., Voet, J. y Pratt, C. (2013). *Fundamentals of Biochemistry: Enzyme Inhibition*. (4ta. ed.). Montevideo, Uruguay: Médica Panamericana.
109. Werner, M. (2008). *Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la vida*. (1era. ed.). Barcelona, España: Reverté.
110. Worthington Biochemical Corporation. (2017). *Pepsin*. Recuperado de: <http://www.worthington-biochem.com/pm/> (Agosto, 2017).
111. Xie, Z., Luo, M., Xu, W., y Chi, C. (1997). Two reactive site locations and structure-function study of the Arrowhead proteinase inhibitors, A and B, using mutagenesis. *Biochemistry*, 36 (1), 5846-5852. doi: 10.1021/bi962993c.
112. Zamisch, M. y Batista, F. (1999). B-Galactosidasa fúngica inmovilizada en un intercambiador aniónico: Obtención y caracterización del biocatalizador. En Valderrama, J. (Ed.). *Información tecnológica* (pp. 105-110). Montevideo, Uruguay: Editorial del Norte – Brasil 431.

ANEXOS

ANEXO I

DIAGRAMAS DE FLUJO DE PROCESOS REALIZADOS

AI.1 Medición de actividad proteolítica de pepsina

En la Figura AI.1 se detalla el proceso para determinar la actividad proteolítica de pepsina.

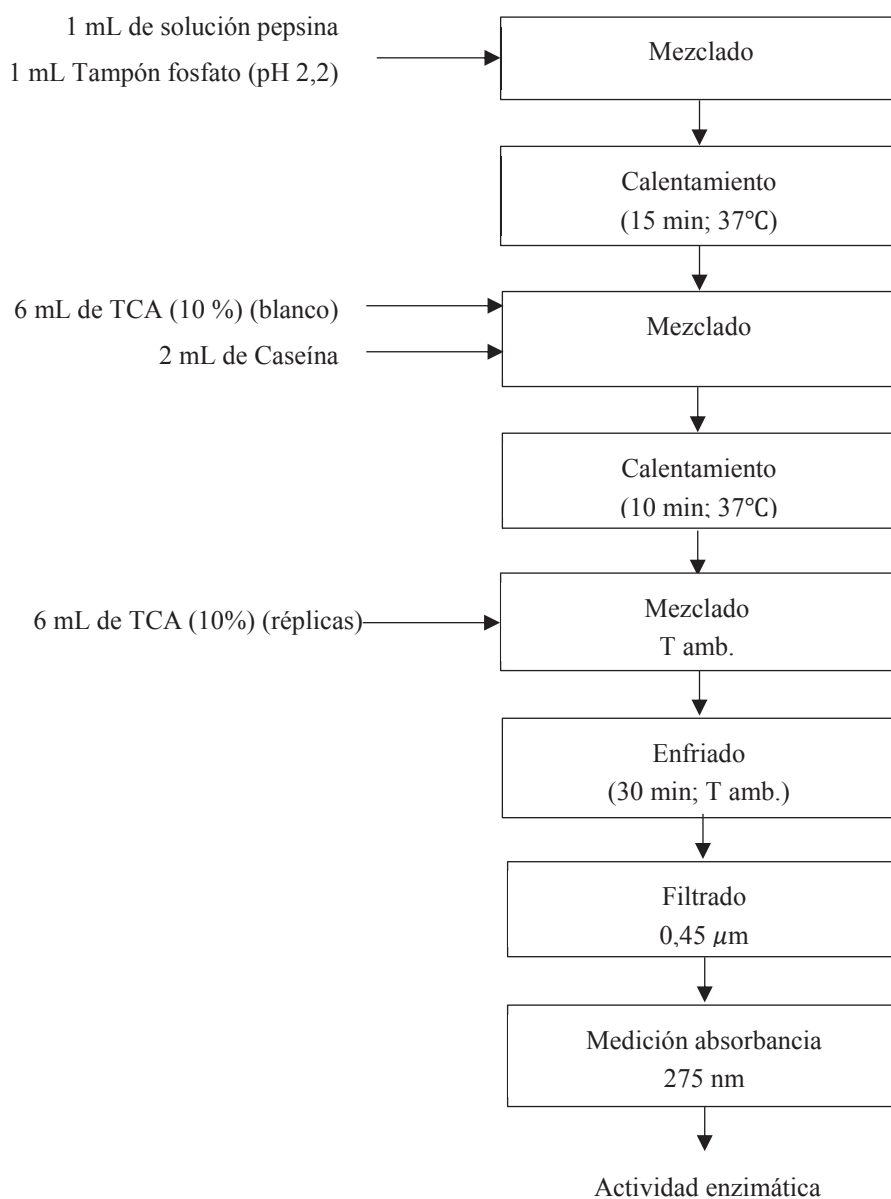


Figura AI.1. Esquema del proceso para la medición de actividad proteolítica

AI.2 Desengrasado de harinas

En la Figura AI.2., se puede observar el procedimiento utilizado para obtener harinas desengrasadas.

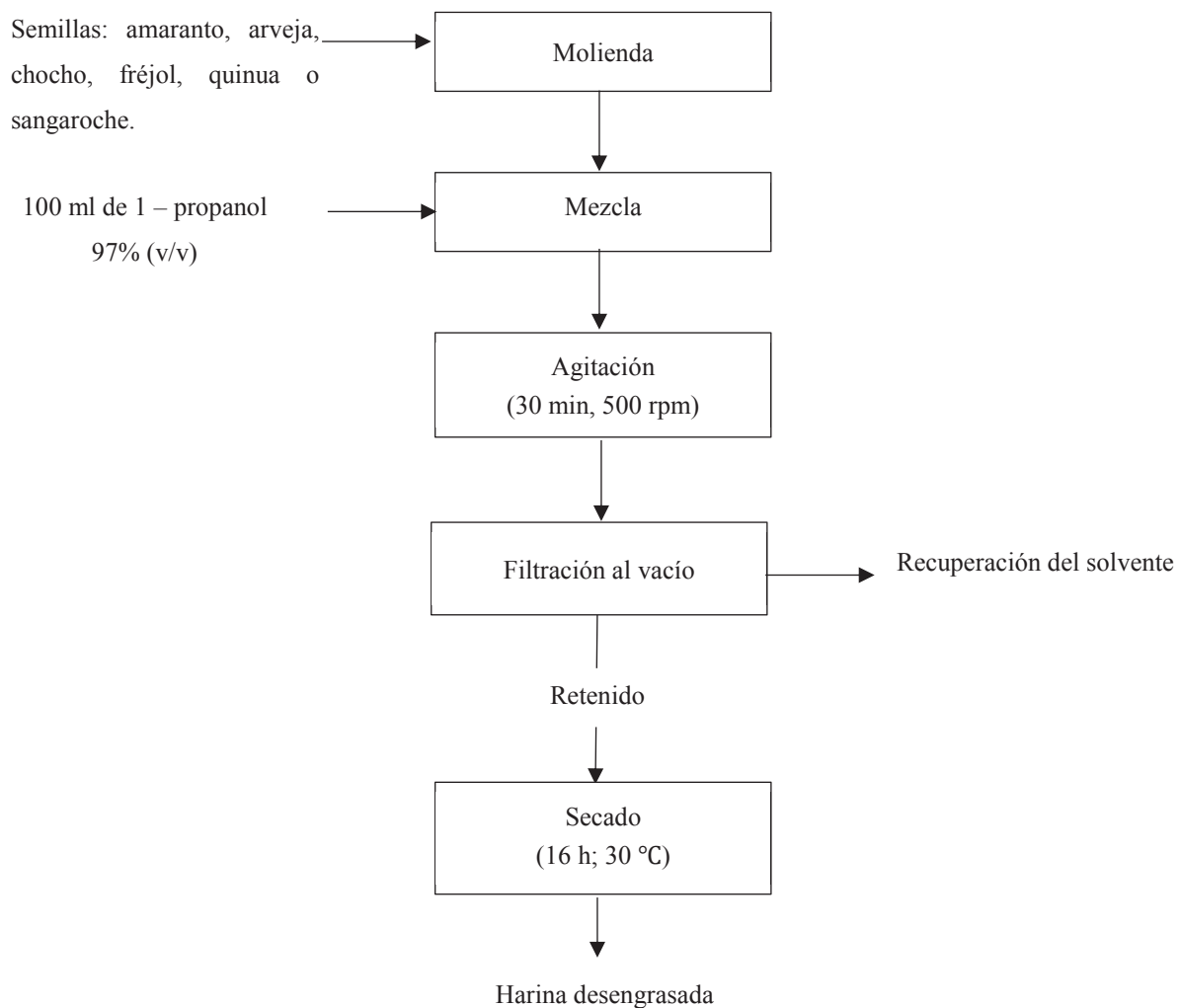
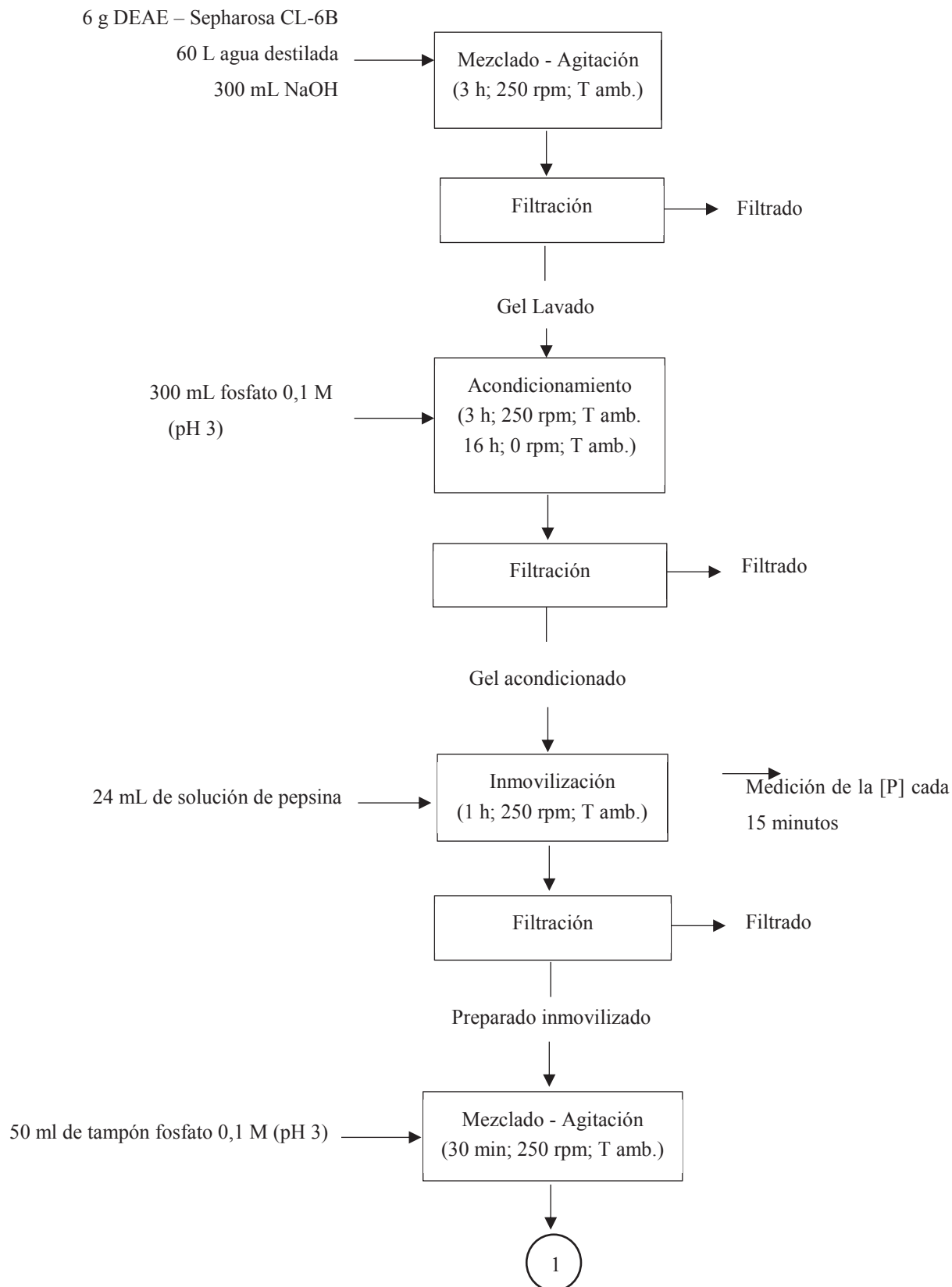


Figura AI.2. Esquema del proceso de desengrasado de harinas

AI.3 Inmovilización de pepsina en DEAE–Sepharsa CL–6B

En el siguiente esquema, se detalla el procedimiento para inmovilizar pepsina en DEAE–Sepharsa CL–6B.



Continuación....

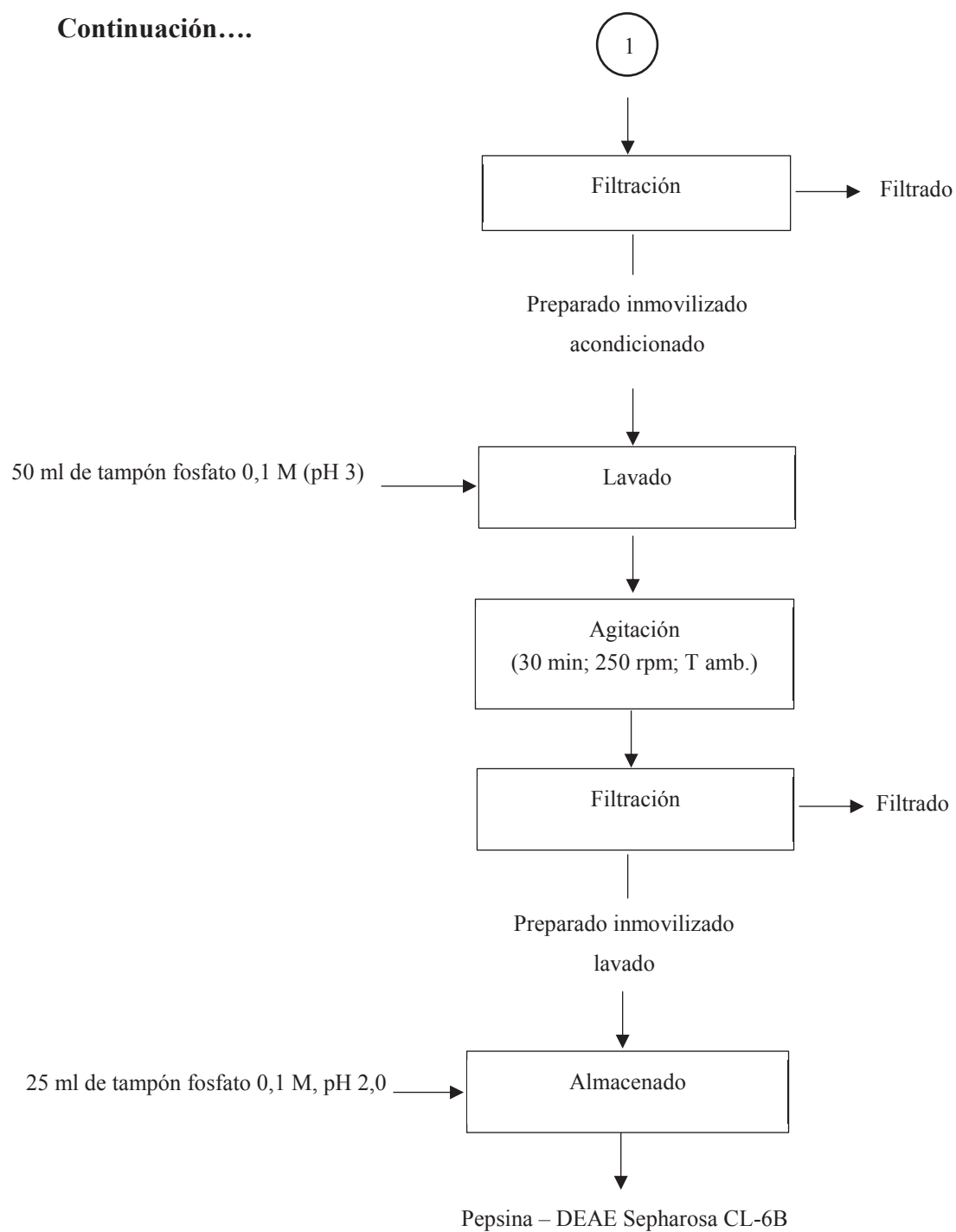


Figura AI.3. Esquema del proceso de inmovilización de pepsina

AI.4 Obtención de extractos acuosos

En la Figura AI.4., se detalla el procedimiento para obtener extractos acuosos a partir de semillas de amaranto, arveja, chocho, fréjol, quinua y sangorache.

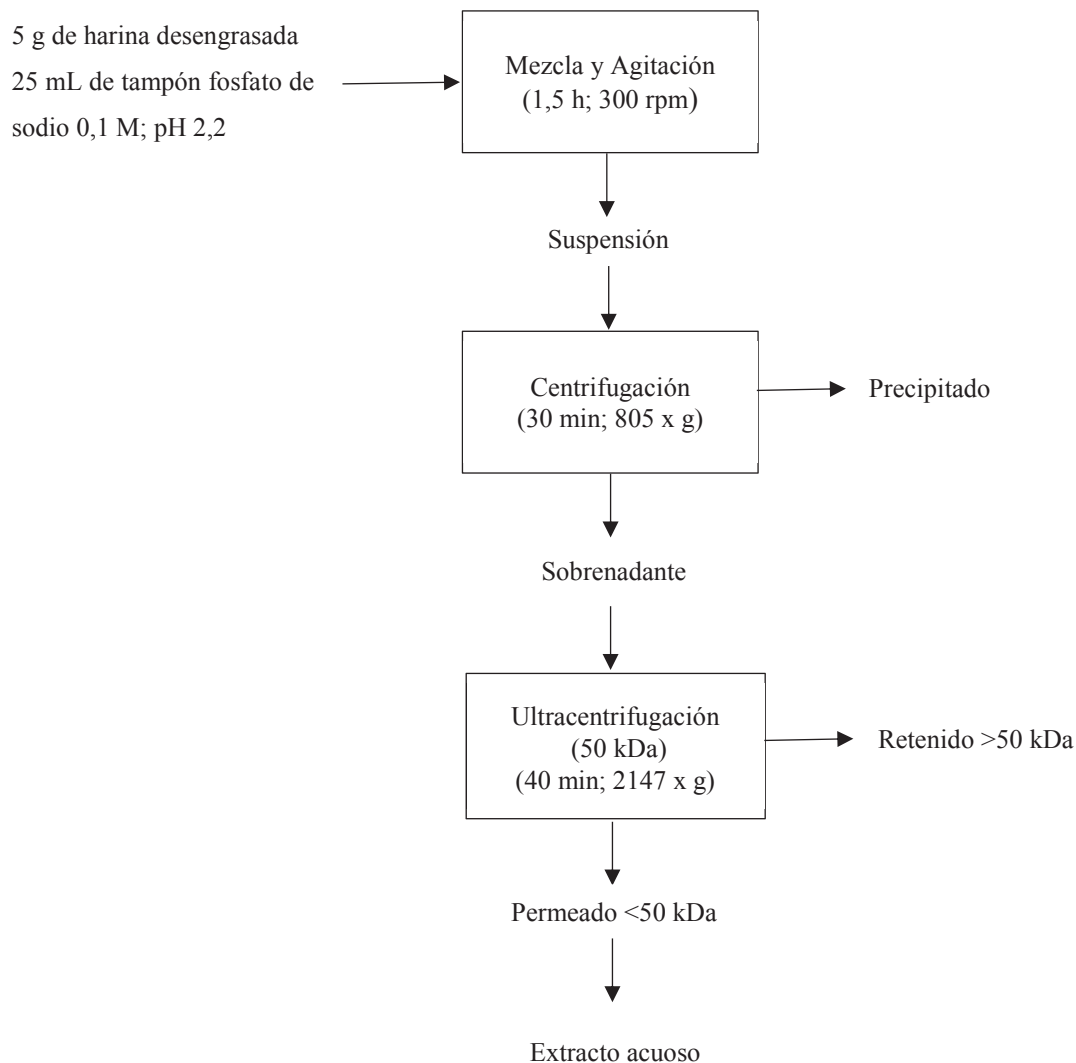


Figura AI.4. Esquema del proceso de obtención de extractos acuosos a partir de semillas seleccionadas

AI.5 Cromatografía de afinidad

En la Figura AI.5., se muestra el procedimiento para purificar selectivamente los extractos acuosos mediante cromatografía de afinidad.

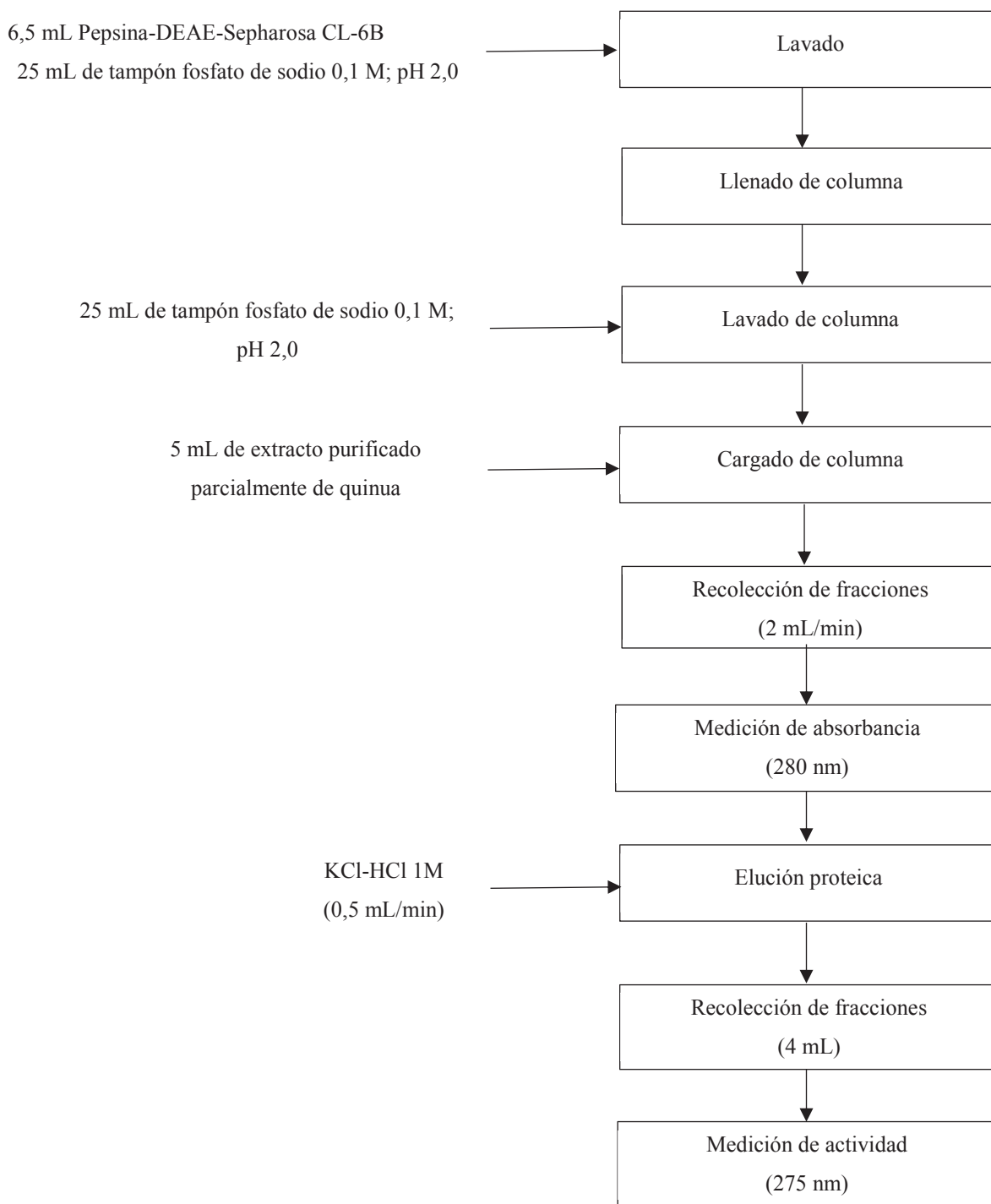


Figura AI.5. Cromatografía de afinidad para purificación del extracto de quinua

ANEXO II

EJEMPLO DE CÁLCULO DEL VALOR TOTAL Y PORCENTAJE DE ENZIMA INMOVILIZADA, DE ACTIVIDAD DE ENZIMA INMOVILIZADA, DE RETENCIÓN DE ACTIVIDAD FUNCIONAL Y DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA ESPECÍFICA

Para la cuantificación de las diferentes variables de respuesta esperadas en esta investigación se presenta ejemplos de cálculo con los datos experimentales obtenidos a pH 2,0.

AII.1. Cálculo del valor total de enzima inmovilizada (EI)

En primer lugar, se determinó el porcentaje de enzima inmovilizada con la ecuación [A.1] establecida por Biasuatti et al. (2006, p. 428)

$$\%EI = \frac{m_{p.inicial} - m_{F+L}}{m_{p.inicial}} \times 100 \quad [A.1]$$

Donde:

$m_{p.inicial}$: masa de pepsina presente en la solución proteica inicial, en mg

F+L: masa de pepsina presente en el filtrado y lavados, en mg

Para determinar la masa inicial de pepsina presente en la solución proteica, se utilizó la ecuación [A.2].

$$m_{p.inicial} = [E] \times V_s \quad [A.2]$$

Donde:

[E]: Carga enzimática de pepsina en el soporte, en mg/mL

Vs: Volumen del soporte

Aplicando la ecuación [A.2] se tiene la masa de pepsina inicial es:

$$m_{p.inicial} = 5 \frac{\text{mg}}{\text{mL de soporte}} \times 6 \text{ mL de soporte}$$

$$m_{p.inicial} = 30 \text{ mg de pepsina}$$

Para determinar la masa de pepsina presente en los lavados y en el filtrado se procedió a medir la absorbancia a 280 nm para poder calcular la concentración de proteína en cada una de las muestras. Se aplicó la ecuación [A.3], tomando como coeficiente de extinción para la pepsina un valor arbitrario de $1 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Aitken y Laermonth, 2002, p. 3).

$$[P] = \frac{DO_{280} \times \frac{f}{L}}{\varepsilon} \quad [A.3]$$

Donde:

[P]: Concentración de proteína en cada una de las muestras, en mg/mL

DO_{280} : Densidad óptica a 280 nm

f: Factor de dilución

L: Longitud del paso de luz en la celda, en cm

ε : Coeficiente de extinción de la enzima, en $(\text{mg/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Aplicando la ecuación [A.3] se tiene una concentración de proteína de:

$$[P] = \frac{0,382 \times \frac{1}{1 \text{ cm}}}{1 \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)^{-1} \text{cm}^{-1}} = 0,382 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

Una vez calculada la concentración de proteína y conocido el volumen de cada muestra se puede determinar la masa de pepsina tanto del filtrado como de los lavados. En este caso, se calculará como ejemplo la masa presente en el filtrado.

$$m_F = 0,382 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 24,5 \text{ mL} = 9,36 \text{ mg}$$

En la Tabla AII.1 se puede visualizar la masa del filtrado y de los lavados realizados a la matriz de inmovilización.

Tabla A II.1. Concentración de proteína, volumen y masa del filtrado y lavados en la inmovilización a pH 2,0

Muestra	[P] (mg/mL)	V (mL)	Masa (mg)
Filtrado	0,382	24,5	9,36
Lavado 1	0,124	49	6,08
Lavado 2	0,052	48,5	2,52
TOTAL			17,96

*Los lavados fueron realizados con tampón fosfato 0,1 M; pH 2,0.

El porcentaje de enzima inmovilizada se calculó con la ecuación [A.1].

$$\%EI = \frac{30 \text{ mg} - 17,96 \text{ mg}}{30 \text{ mg}} \times 100 = 40,14 \%$$

Para la determinación del valor absoluto de EI se aplicó la ecuación [A.4].

$$EI = [P]_o \times V_{s.e.} - [P]_F \times V_F - ([P]_{L1} \times V_{L1} + [P]_{L2} \times V_{L2}) \quad [A.4]$$

Donde:

[P]_o : Concentración de proteína inicial de la solución proteica, en mg/mL

- $V_{s.e.}$: Volumen de la solución enzimática inicial, en mL
 $[P]_F$: Concentración del filtrado, en mg/mL
 V_F : Volumen del filtrado, en mL
 $[P]_{L1}$ y $[P]_{L2}$: Concentración de proteína en el lavado 1 y en el lavado 2, en mg/mL
 V_{L1} y V_{L2} : Volumen del lavado 1 y del lavado 2, en mL

Reemplazando los datos experimentales en la ecuación [A.4].

$$EI = 1,816 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 23,5 \text{ mL} - 0,382 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 24,5 \text{ mL} - (0,124 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 49 \text{ mL} + 0,052 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 48,5 \text{ mL})$$

$$EI = 24,72 \text{ mg}$$

AII.2. Cálculo del valor total de actividad de enzima inmovilizada (AEi)

Para la determinación del AEi se requiere del cálculo de AE, valor que se obtiene mediante la ecuación [2.1]. Por otro lado, el porcentaje de AEI se calcula con la ecuación [A.5].

$$\% AEi = \frac{AE_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} - AE_{F+L} \times V_{F+L}}{AE_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}}} \times 100 \quad [A.5]$$

Donde:

- AE_{inicial} : Actividad enzimática de la solución proteica inicial, en U/mL
 V_{inicial} : Volumen de la solución enzimática inicial, en mL
 AE_{F+L} : Actividad enzimática del filtrado y de los lavados, en U/mL
 V_{F+L} : Volumen del filtrado y de los lavados

Utilizando los datos experimentales, a pH 2,0 se tiene:

$$\% AEI = \frac{AE_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} - AE_{F+L} \times V_{F+L}}{AE_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}}} \times 100$$

$$\% AEI = \frac{50,9 \frac{U}{mL} \times 23,5 \text{ mL} - 5,8 \frac{U}{mL} \times 24,5 \text{ mL} - 3,3 \frac{U}{mL} \times 49 \text{ mL} - 1,6 \frac{U}{mL} \times 48,9 \text{ mL}}{50,9 \frac{U}{mL} \times 23,5 \text{ mL}} \times 100$$

$$\% AEI = 68,11$$

Para determinar el valor absoluto de AEi se aplica la ecuación [A.6].

$$AEi = A_o \times V_o - A_F \times V_F - (A_{L1} \times V_{L1} + A_{L2} \times V_{L2})$$

[A.6]

Donde:

AE_o : Actividad enzimática inicial, en U/mL

V_o : Volumen de solución enzimática inicial, en mL

AE_F : Actividad enzimática del filtrado, en U/mL

V_F : Volumen de filtrado, en mL

AE_{L1} y AE_{L2} : Actividad enzimática del lavado 1 y del lavado 2, en U/mL

V_{L1} y V_{L2} : Volumen del lavado 1 y del lavado 2, mL

$$AEi = 50,9 \frac{U}{mL} \times 23,5 \text{ ml} - 5,8 \frac{U}{mL} \times 24,5 \text{ mL} - (3,3 \frac{U}{mL} \times 49 \text{ mL} + 1,6 \frac{U}{mL} \times 48,5 \text{ mL})$$

$$AEi = 814,75 \text{ U}$$

AII.3. Cálculo del valor total de retención de actividad funcional (RAF)

Para el cálculo del porcentaje de RAF se aplica la siguiente ecuación, propuesta por Li, Gao, Wei, Qu, Ma y Zhou, (2010, p. 183).

$$\% \text{RAF} = \frac{AE_{\text{directa}} \times V_{\text{pi}}}{AE_{\text{inicial}} \times V_{\text{se}}} \times 100 \quad [\text{A.7}]$$

Donde:

AE_{directa} : Actividad enzimática del preparado inmovilizado, en U/mL de preparado inmovilizado

V_{pi} : Volumen del preparado inmovilizado, en mL

AE_{inicial} : Actividad enzimática de la solución proteica, en U/mL

V_{se} : Volumen de la solución enzimática inicial, en mL

La AE_{directa} se midió tomando 3,5 g del preparado inmovilizado junto a 1,5 mL de tampón fosfato 0,1 M, pH 2,0. Se siguió el protocolo expuesto en el acápite 2.2.2. se mantuvo agitación constante para asegurar la reacción.

Adicionalmente, como el preparado inmovilizado fue una suspensión se procedió a calcular la RAFT en unidades totales mediante la ecuación [A.8].

$$\text{RAFT} = \frac{AE_{\text{directa}}}{V_{\text{gel}}} \times V_{\text{gel}} \quad [\text{A.8}]$$

$$U_{\text{totales}} = 121,33 \frac{\text{U}}{\text{mL de gel}} \times 6 \text{ mL de gel} = 728 \text{ U}$$

ANEXO III

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA (AI), ACTIVIDAD INHIBIDORA ESPECÍFICA (AIE) Y GRADO DE PURIFICACIÓN (GP)

En el presente anexo se desarrolla un ejemplo de cálculo para la caracterización del retenido de quinua.

AIII.1. Cálculo de la actividad inhibidora (AI)

Para la cuantificación de la AI en primera instancia se midió la actividad proteolítica de pepsina en ausencia del inhibidor y después en presencia del mismo siguiendo el procedimiento detallado en el acápite [2.2.2] con la ecuación [2.1]. La AI fue el resultado de la diferencia entre la AE sin inhibidor y la AE en presencia del inhibidor (Muñoz, 2011, p. 27).

Aplicando la ecuación [2.1] se obtiene la actividad enzimática en ausencia del inhibidor:

$$AE = \frac{0,3740}{(0,1)^2} = 37,40 \frac{U}{\text{mL de solución enzimática}}$$

Para determinar la AE en presencia del inhibidor, se reemplazó el tampón fosfato por el inhibidor y de esta manera se obtuvo:

$$AE = \frac{0,1980}{(0,1)^2} = 19,80 \frac{U}{\text{mL de solución enzimática}}$$

Con estos resultados se procedió a cuantificar la AI mediante la ecuación [A.10]

$$AI = AE_{SI} - AE_{CI}$$

[A.10]

Donde:

AE_{SI} : Actividad enzimática sin inhibidor, en U/mL de solución proteica

AE_{CI} : Actividad enzimática con inhibidor, en U/mL de solución proteica

Reemplazando se tiene:

$$AI = (37,40 - 19,80) \frac{U}{mL} \text{ de solución proteica}$$

$$AI = 17,60 \frac{U}{mL} \text{ de solución proteica}$$

AIII.2. Cálculo de la actividad inhibidora específica (AIE)

Una vez calculada la AI y con la cuantificación de la concentración de proteína determinada mediante la ecuación [A.3], se determinó la AIE.

La actividad inhibidora específica es la relación que existe entre la AI y la [P] y se representa mediante la ecuación [A.11].

$$AIE = \frac{AI}{[P]} \quad [A.11]$$

$$AIE = \frac{17,60 \frac{U}{mL \text{ de solución proteica}}}{3,854 \frac{mg}{mL \text{ de solución proteica}}}$$

$$\text{AIE} = 4,57 \text{ U/mg}$$

AIII.3. Grado de purificación (GP)

El grado de purificación se calculó mediante la ecuación [A.12], que representa la relación entre la AIE después del tratamiento de purificación y la AIE inicial.

$$\text{GP} = \frac{\text{AIE}_{\text{Después de la purificación}}}{\text{AIE}_{\text{inicial}}} \quad [\text{A.12}]$$

$$\text{GP} = \frac{22,25 \frac{\text{U}}{\text{mg}}}{9,31 \frac{\text{U}}{\text{mg}}}$$

$$\text{GP} = 2,39 \text{ veces}$$

ANEXO IV

FRACCIONES MÁS ACTIVAS PRESENTES EN LA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON SUS RESPECTIVAS MEDICIONES DE [P], AI, AIE Y GP

En la Tabla AIV.1 se detalla los valores de concentración de proteína, actividad inhibidora, actividad inhibidora específica y grado de purificación para las fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad correspondiente al retenido del extracto de quinua. Estos valores se muestran a partir de la elución ácida y se han omitido las fracciones que no aportaron al GP.

Tabla AIV.1. Concentración de proteína, AI, AIE y GP de las fracciones más activas del retenido del extracto de quinua

# Fracción	[P]	AI	AIE	GP
	mg/mL	U/mL	U/mg	veces
9	0,095	4,480	47,158	5,063
10	0,201	7,980	39,701	4,262
11	0,230	13,980	60,783	6,525
12	0,206	14,480	70,291	7,546
13	0,023	3,080	133,913	14,376
14	0,626	23,080	36,869	3,958
15	0,682	24,480	35,894	3,853
16	0,690	26,980	39,101	4,198
17	0,429	11,980	27,925	2,998
18	0,244	10,580	43,361	4,655
19	0,221	10,280	46,516	4,994
21	0,103	4,480	43,495	4,669
22	0,090	3,980	44,222	4,747
23	0,066	2,180	33,030	3,546
24	0,053	1,980	37,358	4,011
31	0,018	1,380	76,667	8,230
32	0,127	8,380	65,984	7,084
33	0,026	9,480	364,615	39,143
36	0,017	0,480	28,235	3,031

La concentración de proteína, actividad inhibidora, actividad inhibidora específica y grado de purificación para las fracciones más activas presentes en el permeado del extracto de quinua se detallan en la Tabla AIV.2. Estos valores se muestran a partir de la elución ácida y se han omitido las fracciones que no aportaron al GP.

Tabla AIV.2. Concentración de proteína, AI, AIE y GP de las fracciones más activas del permeado del extracto de quinua

# Fracción	[P]	AI	AIE	GP
	mg/mL	U/mL	U/mg	veces
5	0,14	2,16	15,77	1,69
6	0,11	1,86	17,55	1,88
7	0,09	2,66	30,23	3,25
8	0,11	2,46	22,36	2,40
9	0,41	10,16	25,02	2,69
10	0,69	20,16	29,34	3,15
11	0,66	17,16	26,04	2,80
12	0,68	18,66	27,32	2,93
13	0,68	17,86	26,26	2,82
14	0,69	16,66	24,22	2,60
15	0,50	18,16	36,32	3,90
16	0,39	3,76	9,77	1,05
17	0,48	15,66	32,63	3,50
18	0,64	9,26	14,38	1,54
19	0,55	7,16	12,99	1,40
20	0,41	6,06	14,82	1,59
30	0,31	12,86	40,96	4,40
33	0,06	0,66	11,79	1,27
34	0,04	0,66	15,00	1,61
35	0,04	0,36	10,00	1,07
44	0,09	1,36	15,45	1,66
45	0,07	0,66	9,17	0,98
47	0,08	0,76	10,13	1,09

ANEXO V

EJEMPLOS DE CÁLCULOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL INHIBIDOR PURIFICADO

En la Tabla AV.1 se detalla los datos experimentales del inhibidor presente en el retenido del extracto de quinua. De esta manera, se ejemplifica el cálculo de los parámetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ y K_m). Además, se presenta la cuantificación de la constante de inhibición (k_i).

Tabla AV.1. Actividad proteolítica de pepsina en ausencia del inhibidor y en presencia del Lote P, medidas a diferentes concentraciones de caseína

Concentración de caseína		Actividad proteolítica (U/mL)	
mg/mL	mM	Pepsina	Lote P
3	0,252	14,80 ± 1,31	12,70 ± 2,28
5	0,420	23,70 ± 0,45	20,40 ± 2,67
7	0,588	29,10 ± 2,38	25,40 ± 1,23
11	0,924	38,30 ± 2,69	32,40 ± 2,57
15	1,260	45,00 ± 1,86	39,40 ± 4,16

Con estos datos experimentales, se linealizó según el modelo de Lineweaver-Burk y se determinó la K_m y la $V_{m\acute{a}x}$. Para ello, se presenta la Figura AV.1.

La Figura AV.1 representa el gráfico del inverso de la actividad proteolítica de pepsina con y sin inhibidor versus el inverso de la concentración de sustrato.

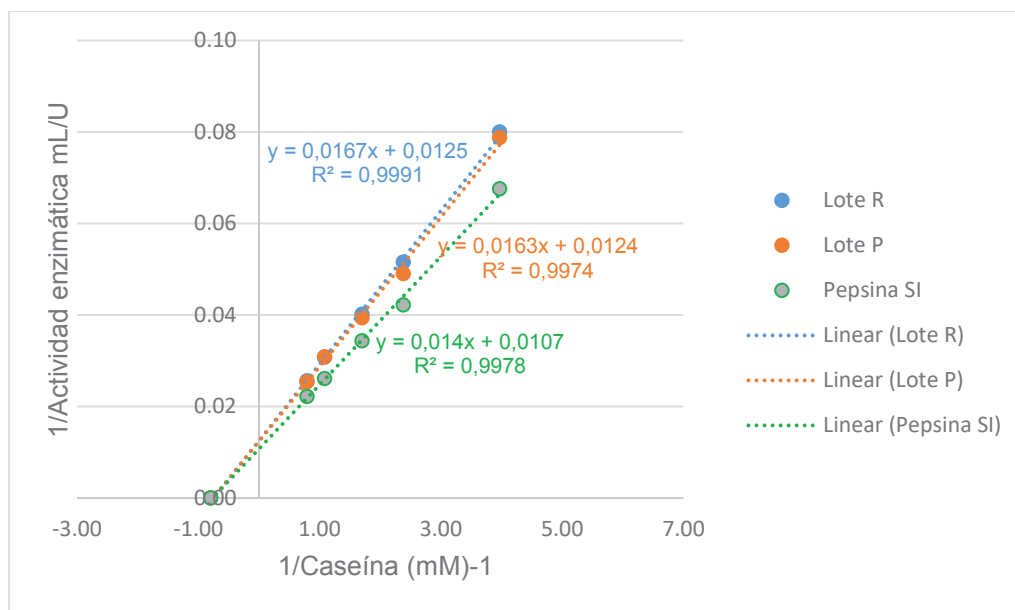


Figura AV.1. Linealización del modelo Michaelis-Menten para la pepsina con y sin inhibidor.

Para calcular la $V_{m\acute{a}x}$ se procedió a tomar el valor del punto de corte generado en el eje de las ordenadas (b) y se aplicó la ecuación [A.13].

$$b = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad [A.13]$$

Tomando de la Figura AV.1. el valor de b se tiene que la $V_{m\acute{a}x}$ para la pepsina sin inhibidor es igual a:

$$0,0107 = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

$$V_{m\acute{a}x} = 93,46$$

Mientras que para la pepsina en presencia del Lote P es igual a:

$$0,0124 =$$

$$V_{m\acute{a}x} = 80,65$$

Por otro lado, la K_m se calculó mediante la ecuación [A.14].

$$m = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \quad [\text{A.14}]$$

$$0,0140 = \frac{K_m}{93,46}$$

$$K_m = 1,31 \text{ mM (Sin inhibidor)}$$

$$0,0163 = \frac{K_m}{80,65}$$

$$K_m = 1,31 \text{ mM (En presencia del Lote P)}$$

De acuerdo con estos resultados se determinó la presencia de un inhibidor no competitivo para el Lote P. Aplicando la ecuación [A.15] se calculó el factor α (Nelson y Cox, 2013, p. 208).

$$V_{\text{máx}}_{\text{aparente}} = \frac{V_{\text{máx}}}{\alpha}$$

[A.15]

$$\alpha = \frac{V_{\text{máx}}}{V_{\text{máx}}_{\text{aparente}}}$$

$$\alpha = \frac{93,46}{80,65}$$

$$\alpha = 1,16$$

Por último, se calculó el valor de k_i a través de la ecuación [A.16].

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

[A.16]

$$K_i = \frac{[I]}{\alpha - 1}$$

$$K_i = \frac{1,49 \times 10^{-5}}{1,16 - 1} = 8,89 \times 10^{-5} \text{ mM}$$

$$K_i = 0,088 \text{ } \mu\text{M}$$

ANEXO VI

PREPARACIÓN DE LOS GELES Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA ELECTROFORESIS

En la Tabla AVI.1. se detalla el contenido en porcentaje de cada solución utilizada en la electroforesis con su respectivo valor de pH.

Tabla AVI.1. Soluciones utilizadas en la electroforesis realizada para la caracterización molecular del inhibidor presente en el extracto acuoso de quinua

Tipo de solución	Contenido	pH
Poliacrilamida	48 % acrilamida 1,5 % bisacrilamida	-
Desnaturalizante	SDS al 4 % Tris-HCl 50 mM Glicerol al 12 % 2-mercaptoetanol Azul de bromofenol	- 6,80 - - -
Tampón cátodo	Tris 0,03 M Glicina 0,93 M SDS al 0,10 %	8,25 - -
Tampón ánodo	Tris 0,20 M	8,90
Solución fijadora	250 ML metanol 35 mL de ácido acético 215 mL de agua destilada	-
Solución de tinción	0,625 mg de azul de Coomasie 227 mL de metanol 23 mL de ácido acético	-
Solución de decoloración	215 mL de metanol 37,5 mL de ácido acético	-

En la Tabla AVI.2. se indica la cantidad de las soluciones que conformaron tanto el gel concentrador como el separador.

Tabla AVI.2. Composición de los geles separador y concentrador utilizados en la electroforesis para caracterizar los extractos acuosos

Solución	Gel Separador	Gel Concentrador
Poliacrilamida	10 mL	6,1 mL
Gel Buffer	10 mL	10 mL
Glicerol	3,14 mL	-
Agua Destilada	6,82 mL	13,9 mL
Persulfato de amonio	150 μ L	150 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L