



CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA β -GLUCOSIDASA DE ALMENDRA

Isabel Fraile Gutiérrez, Sandra Hermida Vázquez

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid.

INTRODUCCIÓN

Las β -glucosidasas (β -D-glucósido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace O- β -glicosídico en el extremo terminal no reductor de oligosacáridos de cadena corta, disacáridos y aril- o alquil- β -D-glucósidos, liberando β -D-glucosa. En condiciones forzadas, la enzima es capaz de catalizar la reacción inversa (reacción de transglicosilación) [1]. Están implicadas en diferentes funciones biológicas [2] en bacterias, hongos, plantas, mamíferos y humanos. La clasificación más aceptada se basa en similitudes de secuencia y plegamiento, y clasifica las glicosido hidrolasas en más de 100 familias [3,4], perteneciendo las β -glucosidasas generalmente a las familias 1 (GH1) y 3 (GH3). Estas enzimas presentan interés como catalizador industrial.

El objetivo es la caracterización cinética de la β -glucosidasa de almendra con el fin de proponer un modelo para su mecanismo catalítico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material biológico se utiliza una preparación comercial de la enzima β -glucosidasa aislada a partir de emulsina de almendras dulces (*Prunus dulcis*), proporcionada por la casa FLUKA. Como reactivos químicos: pNP (p-nitrofenol), pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucósido), glucosa y δ -gluconolactona, que fueron suministrados por la casa FLUKA. NaOH, HCl, ácido cítrico y sales de fosfato por PANREAC.

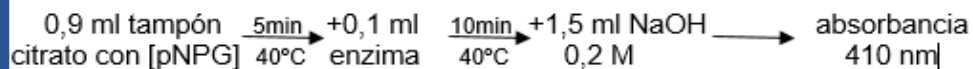


Figura 1. Diseño del ensayo enzimático

RESULTADOS

1. Estandarización del ensayo

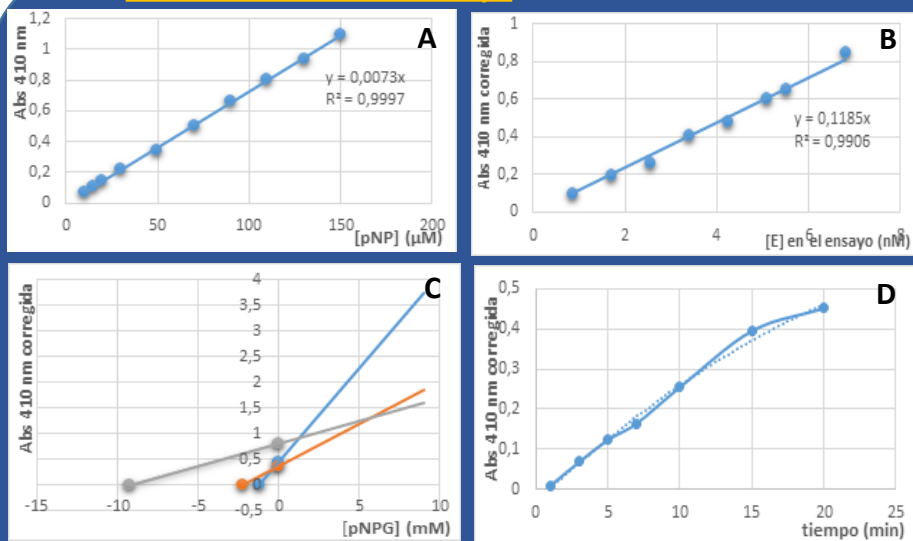


Figura 2. A) Curva patrón para el pNP. B) Concentración óptima de enzima. C) Km aproximada. D) Linealidad con el tiempo

2. Parámetros cinéticos

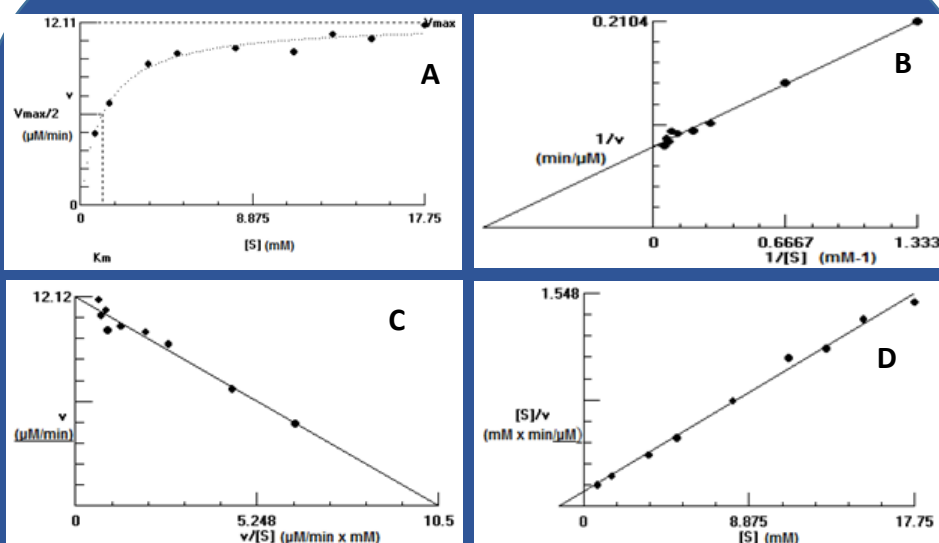


Tabla 1. Parámetros cinéticos para cada una de las representaciones.

	Km (mM)	Vm _{ax} ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Regresión hiperbólica	1,146 \pm 0,3211	12,11 \pm 0,6372
Lineweaver-Burk	1,164	12,13
Eadie-Hofstee	1,155	12,12
Hanes-Woolf	1,297	12,31
Eisenthal y Cornish-Bowden	1,13	12,32

Figura 3. A) Representación hiperbólica. B) Representación de Lineweaver-Burk. C) Representación de Headie-Hofstee. D) Representación de Hanes-Woolf. E) Representación de Eisenthal y Cornish-Bowden

3. Efecto de la temperatura

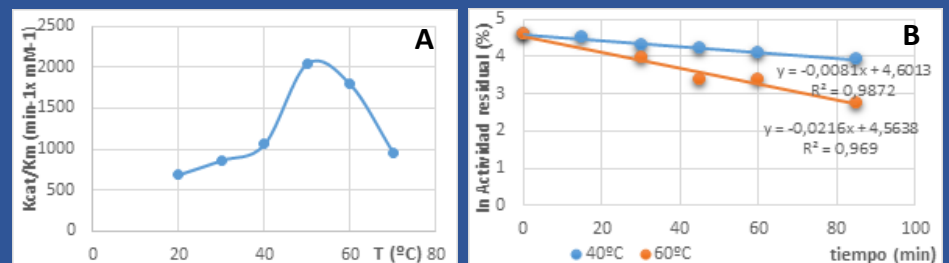


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad (A) y sobre la estabilidad (B) de la β -Glucosidasa.

4. Estudios de inhibición

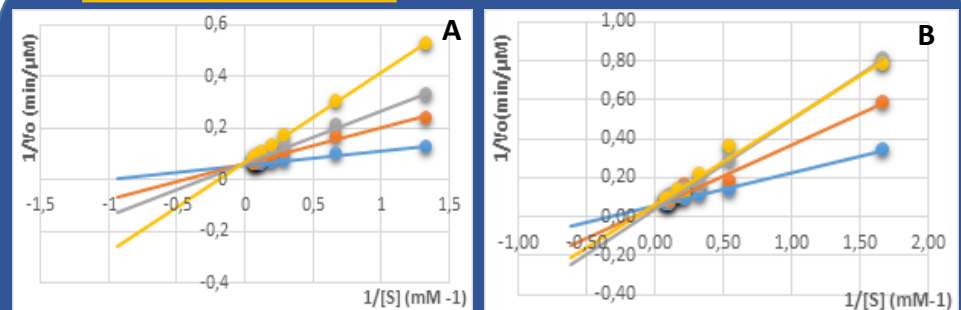


Figura 5. Inhibición de la hidrólisis del pNPG con δ -gluconolactona (A) y con glucosa (B). La K_i para δ -gluconolactona es 0,051 mM y para glucosa 545 mM.

CONCLUSIÓN

La temperatura óptima de la enzima es aproximadamente 50°C. Sin embargo, el ensayo es mejor realizarlo a 40 °C, ya que a esta temperatura la enzima es completamente estable. Los estudios de inhibición muestran que la δ -gluconolactona y la glucosa dan lugar a una inhibición competitiva, pero la δ -gluconolactona es mejor inhibidor porque tienen una constante de inhibición menor. Por último, la enzima presenta un mecanismo ping-pong escondido con salida ordenada de productos como se muestra en el esquema de Cleland.

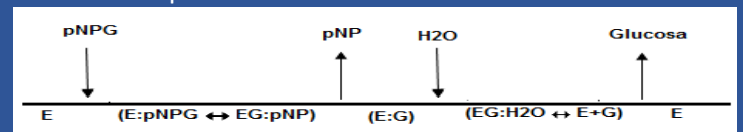


Figura 6. Esquema de Cleland

REFERENCIAS

- Mladenoska I, Grey C. E, Winkelhausen E, Kuzmanova S, Adlercreutz P. Competition between transglycosylation and hydrolysis in almond beta-glucosidase-catalyzed conversion of p-nitrophenyl-beta-D-glucosidase in monophasic water/alcohol mixtures. Biocatalysis and Biotransformation 2007, 25, 382-385.
- Bhatia Y, Mishra S, Bisaria V. S. Microbial beta-glucosidasas: Cloning, properties, and applications. Critical Reviews in Biotechnology 2002, 22, 375-407.
- Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. Biochemical Journal 1991, 280, 309-316.
- Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Current Opinion in Structural Biology 1997, 7, 637-644.