

## INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA TIROSINASA CON EDTA, QUITOSANO Y PAPAÍNA

J. Cjuno H.<sup>1</sup> y J. Arroyo C.<sup>2</sup>

### RESUMEN

Con el objetivo de controlar el pardeamiento enzimático de las frutas, se ha desarrollado una secuencia de experimentos de inhibición enzimática basado en el sistema enzima-sustrato-inhibidor (tirosinasa-pirocatecol-inhibidor). La actividad enzimática de la tirosinasa se ha visto sustancialmente afectada por los inhibidores de quelatación (EDTA), polimérico (quitosano) y enzimático (papaína). La efectividad inhibitoria de la papaína se ha atribuido a su acción hidrolítica sobre los sitios activos 176G y 182E de la tirosinasa. Una aproximación para la constante de Michaelis ( $K_m$  a 25°C) ha dado el valor de 2,0.

**Palabras clave:** Actividad, tirosinasa, pirocatecol, EDTA, quitosano, papaína.

### INHIBITION OF ENZYME ACTIVITY OF TYROSINASE WITH EDTA, CHITOSAN AND PAPAIN

#### ABSTRACT

With the objective of the browning controlling enzymatic in fruits, a sequence of experiments of enzymatic inhibition has been developed based on the system enzyme-sustrato-inhibitor (tyrosinase-pyrocatechol-inhibitor).

The enzymatic activity of the tyrosinase has been substantially affected by the chelating inhibitors (EDTA), polymeric (chitosane) and enzymatic (papain). The inhibitory effectiveness of the papain has been attributed to its hydrolytic action on the active places 176G and 182E of the tyrosinase. An approach for the constant of Michaelis ( $K_m$  at 25°C) has given the value of 2,0.

**Keywords:** Activity, tyrosinase, pyrocatechol, EDTA, chitosane, papain.

### INTRODUCCIÓN

En la madurez y envejecimiento de las especies vegetales, uno de los procesos naturales más importantes es el pardeamiento causado por la enzima polifeniloxidasas (PPO) [1].

La posibilidad de controlar el pardeamiento de los vegetales tendrá importancia en el control de la maduración, almacenamiento, transporte y en la calidad final de los productos naturales exportables con un apreciable valor agregado.

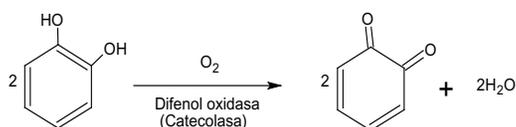
El sistema basado en la tirosinasa resultó ser útil y práctico para los estudios del pardeamiento y madurez debido a las PPOs [1, 2].

La enzima tirosinasa o catecolasa presente en especies vegetales y en particular en especies nativas peruanas, corresponde a la clasificación de oxidoreductasas y tiene como cofactor al cobre (II). La oxidación de sustratos difenólicos a quinonas es catalizada por la difenoloxidasas (una PPO); las quinonas son conocidas también como pigmentos de maduración y pardeamiento [2,3,4].

1 Departamento de Físicoquímica, FQIQ, UNMSM, amecj@infinitem.com.pe

2 Departamento de Físicoquímica, FQIQ, UNMSM, jlarroyo16@gmail.com

La reacción de la oxidación enzimática del difenol (pirocatecol) a la quinona queda representada según la ecuación siguiente:



#### Oxidación enzimática del difenol a quinona

La enzima tirosinasa, aun cuando tiene especificidad sobre la tirosina, es también una fenoloxidasas por lo que se la agrupa con las PPO y se relaciona con la ecuación 1. Según la clasificación internacional de las enzimas, se encuentran dentro del número 1, clase de las oxidoreductasas y de acuerdo al tipo de reacción catalizada son los que transfieren electrones, iones o átomos de hidrógeno. Debido a que la tirosinasa presenta el cofactor Cu<sup>2+</sup>, se las puede relacionar también con las enzimas del tipo citocromo oxidasas.

El modelo utilizado para la detección y la actividad enzimática de la tirosinasa basado en la ecuación 1 está generalizado por ser un procedimiento sencillo y útil para estudios y experimentos del pardeamiento enzimático. El modelo permite estudios con inhibidores, lo que ha posibilitado plantear los esquemas experimentales para este trabajo.

En los estudios realizados por Chunchua Shi, Ya Dai y colaboradores<sup>[5]</sup>, la purificación y propiedades espectroscópicas de la PPO de la *Nicotiana tabacum*, les permitió determinar espectros de absorción del catecol (como sustrato) transformado a quinona luego de la acción enzimática. Los espectros presentan picos de absorción máxima comprendidos entre 400 y 425 nm y para las enzimas aisladas del tabaco y champiñones alrededor de 235 y 350 nm ambos siguiendo un patrón de absorción similares.

En el documento de la FAO (2000)<sup>[1]</sup>, desarrollado por M. R. Marshall, J. Kim y Cheng-I Wei, se han sistematizado diversos tipos de

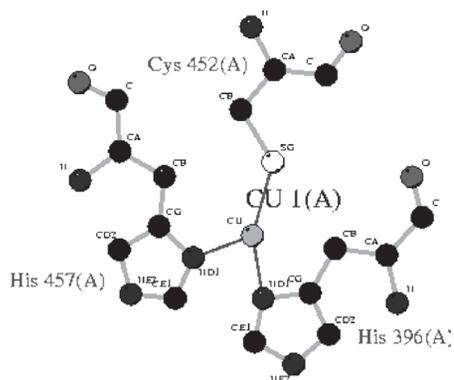
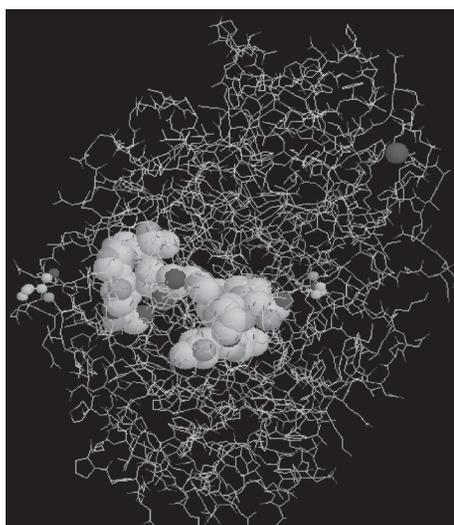
inhibidores y en la misma dirección, Y. Jiang y J. Fu mostraron sus investigaciones con el uso de glutatión y ácido cítrico. De hecho estos trabajos, tienen en común, la búsqueda de alternativas del control de pardeamiento a través de la inhibición enzimática mas no por la sustracción de oxígeno disuelto, necesario para desencadenar el proceso del pardeamiento en los vegetales.

Los patrones cinéticos de la actividad enzimática de las PPO de las especies vegetales, estudiadas en un proyecto previo<sup>[7]</sup>, han abierto las posibilidades de controlar el pardeamiento de tales especies. La inhibición puede efectuarse por el uso de agentes reductores, quelatantes, acidulantes, inhibidores enzimáticos, tratamientos con otras enzimas o por el uso de agentes complejos como las ciclodextrinas o quitina. También es posible inhibir por procedimientos térmicos o de altas presiones. De todos estos, el uso de quelatantes como el EDTA, la quitina (que posee propiedades antimicrobianas y biodegradables) así como la papaína han cobrado especial interés en el control del pardeamiento enzimático de los vegetales.

Existe una gran cantidad de investigaciones realizadas sobre el control del pardeamiento enzimático de los vegetales; sin embargo, no se han profundizado aún en el uso de productos naturales como la quitina o la papaína, posibles de ser obtenidos a partir de recursos marinos o de productos propios como la papaya.

En este trabajo se estudia la inhibición enzimática basado en el sistema enzima-sustrato-inhibidor (tirosinasa-pirocatecol-inhibidor), utilizando tres tipos de inhibidores: por quelatación sobre el cobre (II) con EDTA, complejo como el quitosano y de desnaturalización de la tirosinasa con la papaína. Se plantea que este último –una proteasa- posee una alta capacidad inhibitoria sobre la tirosinasa.

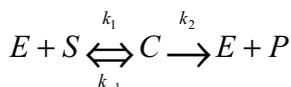
En la Figura N.º 1, se muestra la estructura secundaria de una PPO (lacasa) y el cofactor con el ligando metálico Cu (II)<sup>[1,6]</sup>.



**Figura N.º 1.** Estructura terciaria PDB (Protein Data Bank), de la cadena A y el cofactor con el ligando Cu (II).

### CINÉTICA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La tirosinasa se comporta según el modelo de Michaelis-Menten, de acuerdo con las ecuaciones químicas siguientes:



$$\frac{dS(t)}{dt} = -k_1 S(t)E(t) + k_{-1} C(t) \dots (1)$$

$$\frac{dE(t)}{dt} = -k_1 S(t)E(t) + k_{-1} C(t) + k_2 C(t) \dots (2)$$

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_1 S(t)E(t) - k_{-1} C(t) - k_2 C(t) \dots (3)$$

$$\frac{dP(t)}{dt} = k_2 C(t) \dots (4)$$

$$E_T = E(t) + C(t) \dots (5)$$

Cuyas soluciones conducen a:

$$\frac{dC(t)}{dt} = C'(t) = 0 \dots (6)$$

(5) en (3):

$$C'(t) = k_1 S(t) [E_T - C(t)] - k_{-1} C(t) - k_2 C(t)$$

$$C'(t) = k_1 E_T S(t) - [k_{-1} S(t) + k_{-1} + k_2] C(t) \dots (7)$$

en el estado estacionario se cumple que:  $C'(t) = 0$ , luego:

$$C(t) = \frac{E_T S(t) k_1}{k_1 S(t) + k_{-1} + k_2} = \frac{E_T S(t)}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + S(t)} \dots (8)$$

$$k_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \dots (9)$$

$$v_{Rx} = v = \frac{dP(t)}{dt} = -\frac{dS(t)}{dt} = k_2 C(t) \dots (10)$$

(8) y (9) en (10):

$$v = \frac{k_2 E_T S(t)}{k_m + S(t)} \dots (11)$$

(11) es la ecuación de Michaelis-Menten. Si la concentración del sustrato es alta,  $K_m \ll S(t)$ , entonces:

$$v \approx k_2 E_T$$

Esta velocidad no puede ser superada, por lo que se denomina:

$$v_{max} = k_2 E_T \dots (12)$$

Introduciendo (12) y (10) en (11), se tiene:

$$S'(t) = \frac{dS(t)}{dt} = -\frac{v_{max} S(t)}{k_m + S(t)} \dots (13)$$

De (13) se tiene:

$$S'(t) [k_m + S(t)] = -v_{max} S(t)$$

$$k_m \frac{dS(t)}{S(t)} + \frac{dS(t)}{dt} = -v_{max} \dots (14)$$

integrando (14):

$$\int_{S(0)}^{S(t)} k_m \frac{dS(t)}{S(t)} + \int_{S(0)}^{S(t)} dS(t) = -v_{max} \int_0^t dt$$

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S(0)}{S(t)} = -\frac{1}{k_m} \left[ \frac{S(0) - S(t)}{t} \right] + \frac{v_{max}}{k_m} \dots (15)$$

La ecuación (15) se comporta linealmente y se puede graficar

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S(0)}{S(t)} \text{ frente a } \left[ \frac{S(0) - S(t)}{t} \right]$$

con lo que se encuentra  $K_m$  y  $V_{max}$ .

Asumiendo este modelo, se han desarrollado trabajos experimentales<sup>[6,7,8]</sup> conducentes a la identificación y evaluación de la CINÉTICA y actividad enzimática de los sistemas tirosinasa-difenol-inhibidor.

## EXPERIMENTAL

Se han desarrollado las siguientes etapas:

- Obtención del espectro visible de la quinona producida por acción de la tirosinasa.
- Estudio cinético del sistema tirosinasa-pirocatecol.
- Estudio cinético de los sistemas tirosinasa-pirocatecol-inhibidores.

Las condiciones de trabajo han sido las siguientes:

Solución de enzima tirosinasa (SIGMA: 5370 units/mg): 3,11 micromolar bufferado a pH 7,00.

Tirosinasa:|

Código PDB 1wx2

(1cadena A y 2 cadenas B)

cadena A = 32089,9 g/mol

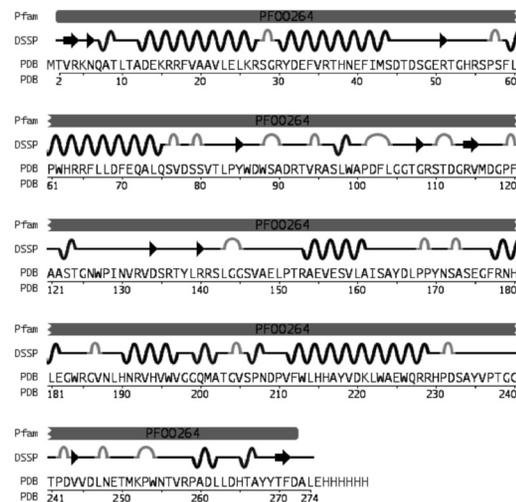
cadena B = 14204,0 g/mol

Peso molecular total = 60498 g/mol.

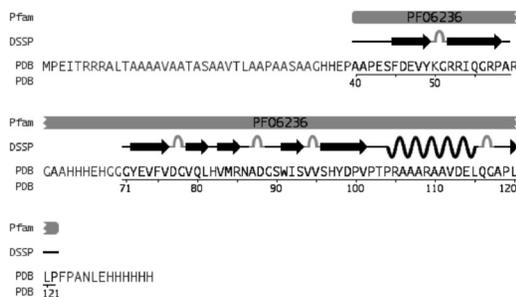
## Aislamiento de la papaína de látex de papaya

Método 715 descrito en C.A. Rojahn (1942): precipitación de la papaina con sulfato amónico, disolución y reprecipitación con etanol del 96% y secado al vacío.

Datos PDB para la tirosinasa:



**Figura N.º 2.** Estructura secundaria de la cadena A de la tirosinasa, con los centros activos en los residuos 176G y 182E. Posee 281 residuos con 40% de  $\alpha$ -hélices y 4% de hojas beta.



**Figura N.º 3.** Estructura secundaria de la cadena B con 134 residuos, 8% de  $\alpha$ -hélices y 24% de hojas beta.

Soluciones de pirocatecol, EDTA y quitosano: 0,100 molar. Solución de papaína 0,01% (p/v).

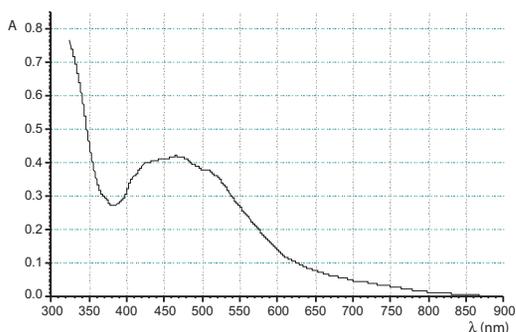
**Tabla N.º 1.** Plan experimental en la inhibición comparativa de la actividad enzimática de la tirosinasa con EDTA, quitosano y papaína.

Tubo	Pirocatecol (µL)	Quitosano (µL)	Papaína (µL)	Tirosinasa (µL)	Agua (µL)
1	-	-	-	10	9890
2	100	-	-	10	9790
3	-	100	-	10	9790
4	-	-	-	10	9790
5	-	-	100	10	9790
6	-	-	-	10	9790
7	-	-	-	-	9900
8	-	-	-	10	9990

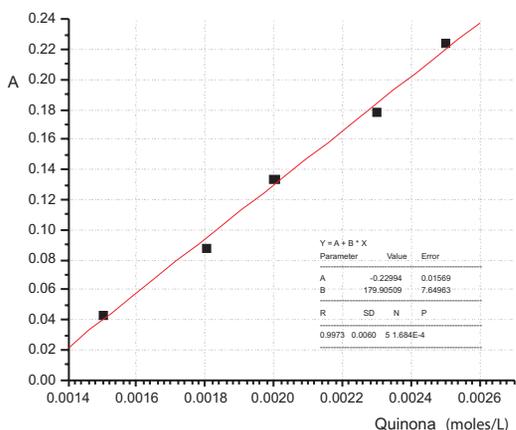
Cada prueba con saturación de oxígeno de 9,70 mgO<sub>2</sub>/L y tubo cerrado.

Tubo 1 (con el tubo 7 de blanco) hasta tiempo infinito para la obtención del espectro VIS de la quinona.

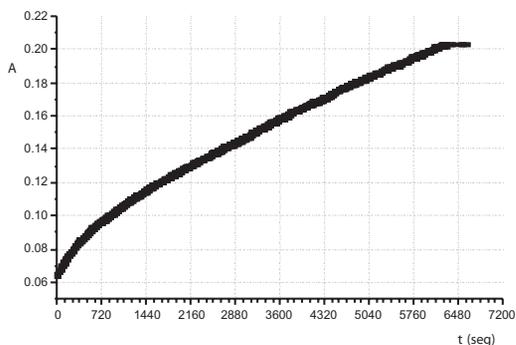
Tubos 2 - 6 para las determinaciones cinéticas y actividades comparativas a 25°C.



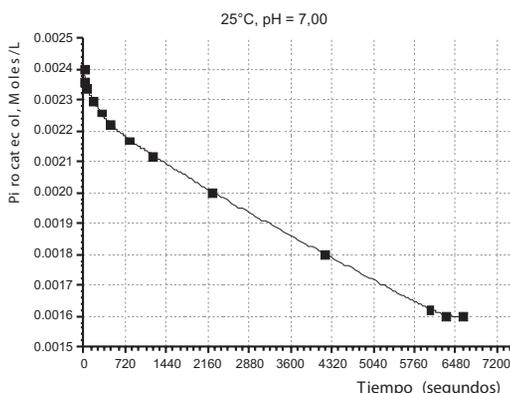
**Figura N.º 4.** Espectro visible de la quinona ( $\lambda_{max} = 467 \text{ nm}$ ) producida por acción de la tirosinasa sobre el pirocatecol a tiempo infinito.



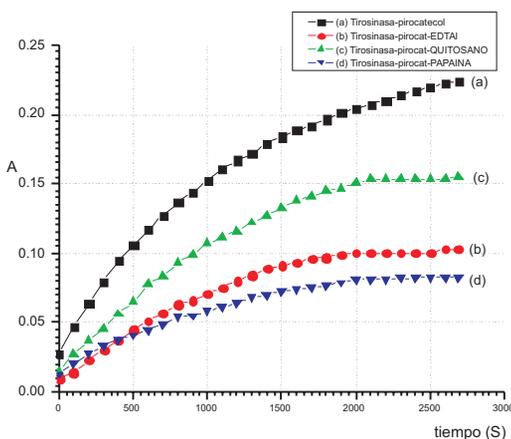
**Figura N.º 5.** Curva de calibración de la quinona a 467 nm, para la determinación de las concentraciones de quinona y pirocatecol en la cinética y actividad enzimática de la tirosinasa.



**Figura N.º 6.** Comportamiento cinético de la tirosinasa frente al pirocatecol a 25°C.



**Figura N.º 7.** Patrón de disminución de la concentración del pirocatecol debido a la acción de la tirosinasa.



**Figura N.º 8.** Inhibición de la actividad enzimática de la tirosinasa (a) con EDTA (b), quitosano (c) y papaína (d).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha definido un modelo experimental como el propuesto en la Tabla N.º 1, a partir del cual se han obtenido: el espectro visible de la quinona (Figura N.º 4) producida por la acción de la tirosinasa sobre el pirocatecol; una curva de calibración (Figura N.º 5) para la cuantificación de la quinona en los ensayos cinéticos (Figuras N.º 6 y 7); así como los de la inhibición de la actividad enzimática con adición de EDTA, quitosano y papaína (Figura N.º 8).

El espectro visible presenta un máximo a 467 nm a pH bufferado de 7,00 la misma que difiere en relación al reportado por Chuchua Shi et al.<sup>[5]</sup> Quienes registran el valor para el máximo alrededor de 410 nm a pH de 6,5.

El comportamiento cinético Michaelino (Figuras N.º 6, 7 y 8) tiene semejanza con los obtenidos por J. Casado V.<sup>[8]</sup> quién utilizó 4-metil catecol y ter-butilcatecol en vez del pirocatecol utilizado en este trabajo.

Los estudios de inhibición de la tirosinasa muestran que los tres compuestos elegidos inhiben sustancialmente la actividad enzimática de la tirosinasa frente al pirocatecol. Resalta la papaína como uno de los inhibidores más eficaces en este trabajo, seguido por el EDTA y el quitosano.

La efectividad inhibitoria de la papaína es concordante con los estudios mostrados por M. R. Marshall J. Kim y Cheng-I Wei; mientras que para el quitosano aun cuando la referencias indican una efectividad alta en la inhibición del pardeamiento debido a la formación de películas poliméricas sobre las superficies de los vegetales, en solución no presenta tal eficacia.

## CONCLUSIONES

La actividad enzimática de la tirosinasa se ha visto sustancialmente afectada por los tres inhibidores seleccionados, siendo el más eficaz la papaína seguido por el EDTA y en menor medida por el quitosano. La efectividad inhibitoria de la papaína se atribuye a su acción hidrolítica sobre los sitios activos 176G y 182E de la tirosinasa.

Una aproximación para la constante de Michaelis ( $K_m$  a 25°C) ha dado el valor de 2,0.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Maurice R. Marshall, *et al.* Enzymatic Browning in fruits, vegetables and seafoods, FAO (2000).
- [2] Coseteng, M.Y. y Lee, C.Y. "Change in apple polyphenol concentrations in relation to degree of browning", J. Food Sci. Vol. 52, N° 4, pp. 985-98 (1987).
- [3] Jiang, Yueming y Fu, Jiarui. "Inhibition of polyphenol oxidase and the browning

control of litchi fruit by glutathione and citric acid", food chemistry, vol. 62, N° 1, pp. 49-52 (1998).

- [4] Huang, S., Hart, H., Lee, H y Wicker, L. "Enzymatic and Color Changes During Post-harvest Storage of Lychee Fruit", J. Food Sci. vol. 55, N° 6, pp. 1762-1763 (1990).
- [5] Chunhua Shi, Ya DAI, Bingle Xia, *et al.* Plant Molecular Biology Reporte, 19: 381a-381h, Dec. 2001.
- [6] [www.pdb.org](http://www.pdb.org)
- [7] J. A.Cjuno H. y J. Arroyo. Informe del proyecto de investigación CSI - UNMSM, (2006).
- [8] J. Casado Vela. Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de podredumbre apical en frutos de tomate. Implicación de PPO y enzimas antioxidantes. Tesis Doctoral, Universidad de Alicante (España), 2004.
- [9] Langdon T.T. Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. Food Technology 5: 64-67 (1988).
- [10] McEvily AJ, Iyengar R, Otwell WS. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. Critical Rev. in Food Sci. and Nutrition 32: 253-273 (1992).
- [11] Moon KD, Kim HK, Jo KS, Park MH. Prediction of shelf life and changes in quality attributes in packaged composite seasoning during storage. J. Korean Agricultural Chemical Soc. 35: 281-285 (1992).
- [12] Parada Arias E. CYTED. The iberamerican cooperative research program in food technology. Food Res. Internat. 28: 343-346(1995).
- [13] Sapers GM. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. Food Technology 10: 75-84 (1993).
- [14] Cheftel, Jean-Claude y Cheftel Henri. "introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos". vol. 1, editorial

- Acribia, Zaragoza España, pag. 309-317 (1988).
- [15] Sapers, Gerald y Ziolkowski, Michael. "Comparison of Erythorbic and Ascorbic Acids as inhibitors of Enzymatic Browning in Apple". J. Food Sci. vol.52, N° 6, pp 1732-1733 (1987).
- [16] Ducros, V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Brown, S. H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D. S., Pedersen, A. H., Davies, G. J. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. Nat Struct Biol 5 pp. 310 (1998).
- [17] McEvily AJ, Iyengar R, Otwell WS. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverage. Critical Rev. inf Food Sci, and Nutrition 32: 253-273 (1992).