

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE PEPSINOGENO Y PEPSINA
DE *MERLUCCIUS GAYI*.Purification and properties of *Merluccius gayi* pepsinogen and pepsin.

LETICIA SANCHEZ-CHIANG y OSCAR PONCE P.*

RESUMEN

Se ha purificado y caracterizado a partir de mucosa gástrica de *Merluccius gayi* un zimógeno y su respectiva enzima con características sumilares a pepsinógeno y pepsina de especies superiores. Por ello, se ha denominado al zimógeno pepsinógeno de *Merluccius gayi* y a la enzima que se origina pepsina.

Para la purificación del zimógeno se utilizó fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa y DEAE Sephadex. Su purificación se controló por electroforesis en gel de acrilamida.

Por activación ácida del zimógeno y cromatografía en Amberlita IRC-50 se obtuvo una enzima con características de pepsina de mamíferos. Por ejemplo: igual pH óptimo; conducta cromatográfica semejante y porque por acetilación se produce una disminución de la actividad proteásica y un incremento de la actividad peptidásica. Entre las características diferenciales con pepsina de mamíferos se ha encontrado que es activada considerablemente por halogenuros mono y bivalentes; es más activa que pepsina de cerdo frente a hemoglobina; no tiene actividad sobre el sustrato fibrinógeno; presenta menor actividad para coagular la leche y es más estable a pHs alcalinos.

ABSTRACT

A zymogen and its corresponding enzyme has been purified and characterized from *Merluccius gayi* gastric mucosa. Both have similar characteristics to pepsinogen and pepsin from higher species. Based on this similarity, the zymogen and the enzyme have been named *Merluccius gayi* pepsinogen and pepsin respectively.

The zymogen was purified by ammonium sulfate fractionation and ion exchange chromatography on DEAE-cellulose and DEAE-sephadex columns. The purification was followed by polyacrylamide gel electrophoresis.

The enzyme obtained after acid activation of the zymogen and chromatography on amberlite IRC-50 is similar to mammalian pepsins in its pH optimum, chromatographic behavior, the enhancement of its peptidase activity and decrease in its proteolytic activity after treatment with N-acetyl imidazole. It differs from porcine pepsin in that the fish enzyme is more active towards bovine hemoglobin, it has no activity towards fibrinogen, it is activated by mono and divalent halides and in its marked stability at alkaline pH values.

Keywords: Pisces. Merluccidae. Enzyme purification. Biochemistry.

*Departamento Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción. Chile.

INTRODUCCION

Se ha reportado en una gran variedad de mamíferos la existencia de zimógenos gástricos que originan enzimas proteolíticas acídicas denominadas pepsinas y gastricsinas. Ryle et al. (1966:176; Lang et al. (1971: 2296); Richmond et al. (1958:453); Chiang et al. (1967:3098) y Ward et al. (1978:499). La caracterización de esta multiplicidad de zimógenos y enzimas en general ha sido poco precisa.

Muy poca información existe en relación a la presencia de zimógenos y enzimas gástricas en aves y peces.

Bohak (1969:4638) comunica la purificación y caracterización de un pepsinógeno y la enzima que origina, a partir de mucosa gástrica de pollo.

Dos zimógenos denominados Z-I y Z-II con características de gastricsinógenos y pepsinógenos fueron aislados de estómago de sapo *Caudiverbera Caudiverbera*. Ward et al. (1978:491).

Tres pepsinógenos denominados A, C y D según la nomenclatura de Ryle, se aislaron y caracterizaron parcialmente desde mucosa de estómago de *Mustelus mento* (*dog fish*). Merret et al. (1969:3696).

Dos zimógenos y sus respectivas enzimas se han purificado y caracterizado desde mucosa gástrica de *Merluccius gayi*. Sánchez-Chiang et al. (1979). Ellos presentan características similares de gastricsinógenos y gastricsinas humana y de cerdo.

El objetivo de este trabajo es reportar el aislamiento y caracterización de un zimógeno y la enzima a que da origen, a partir de mucosa gástrica de *Merluccius gayi* (*Gadiformes Merlucciidae*). El zimógeno presenta características similares a pepsinógeno A de *Mustelus mento* y pepsinógeno de cerdo y la enzima es semejante a pepsinas de esas especies. Por esto se ha denominado al zimógeno pepsinógeno y a la enzima pepsina de *Merluccius gayi*.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Los estómagos de *Merluccius gayi* se obtuvieron de la empresa Alimentos Marinos S. A. Talcahuano, Chile y colocados en hielo luego de ser vaciados de su contenido alimentario. Las mucosas fueron separadas de su capa muscular y conservadas a -18°C . No se pesquisó variación de la actividad proteolítica entre las muestras procesadas inmediatamente y las que se mantuvieron por varios días a esa temperatura.

REACTIVOS QUÍMICOS

Todos los reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico sin purificación posterior: pepsina de cerdo, dos veces cristalizada y liofilizada; N-acetil-Imidazol y N-acetil-L-Fenilalanil-L-Diyodotirosina ((APDT) fueron obtenidos de Sigma Chemical Company St. Louis, EE. UU., N-acetil-L-Fenilalanil-L-Tirosina (APT), Benciloxi-carbonil-L-tirosil-L-alanina; (Z-tirala) y Benciloxi-carbonil-L-triptofanil-alanina (Z-tri-ala) de Cyclo Chemical Corp., California. EE. UU.: hemoglobina

de bovino de Difco Laboratories, Detroit, EE. UU.; DEAE-Sephadex-A-50 de Pharmacia Fine Chemical Inc., Uppsala, Suecia; Carbowax 6.000 de Droguería Michelson S. A., Santiago, Chile.

MÉTODOS

ACTIVIDAD PROTEOLITICA

- a) *Hidrólisis de hemoglobina*. Se utilizó el método de Anson con modificaciones. Anson et al. (1932:59): la mezcla de incubación contenía 1 ml de hemoglobina al 2,5% acidificada a pH 2.0 y la enzima contenida en 1 ml de tampón citrato pH 2.0, 0.2 M. Esta mezcla se incubó por 10 minutos a 37°C y luego de este tiempo se agregó 1 ml de ácido tricloro acético al 10%. La mezcla se filtró a través de papel Whatman N° 2. La absorbancia del filtrado se midió a 280 nanómetros en un espectrofotómetro Beckman DU. El valor de la densidad óptica luego de restar la lectura del tiempo cero se utilizó como medida de proteolisis.
- b) *Hidrólisis de fibrinógeno*. El sustrato se preparó disolviéndolo en solución ClNa 0.15 M acidificada a pH 2. La mezcla de incubación contenía 1 ml de fibrinógeno al 1% y la enzima contenida en 1 ml de tampón citrato pH 2, 0.2 M. Las condiciones de hidrólisis fueron similares a las dadas para la hemoglobina.
- c) *Actividad peptidásica sobre sustratos sintéticos*. Los sustratos usados fueron N-acetil-L-fenilalanil-L-tirosina (APT); N-acetil-L-fenilalanil-L-diyodotirosina (APDT); benciloxycarbonil-L-triptofanil-L-alanina (Z-tri-ala) y benciloxycarbonil-L-tirosil-L-alanina (Z-tir-ala).

La hidrólisis de APT y APDT se determinó por el aumento de color con ninhidrina, de acuerdo al método de Rosen. La mezcla de reacción contenía 0.5 micromoles de sustrato sintético y 140 microgramos de enzima a pH 2, en un volumen final de 1 ml. El tiempo de incubación fue de una hora. Chiang et al. (1966:700).

La hidrólisis de Z-tri-ala y Z-tir-ala se determinó en la misma forma que para APT y APDT, sólo que el tiempo de incubación fue de 8 horas. Huang et al. (1969:1085).

ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA LECHE

Se utilizó la técnica de Berridge con modificaciones (1955:69). Se determinó la concentración de enzima que es capaz de coagular una determinada cantidad de leche de bovino a pH 5.6 en un baño iluminado, a 37°C.

El tiempo de reacción se determinó con el apareamiento de grumos en la mezcla.

DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente a 280 nm. La absorbancia de 1 mg por ml de pepsinógeno de cerdo fue determinada experimentalmente y corresponde a 1,53.

PURIFICACION DEL ZIMOGENO

El zimógeno se purificó mediante fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía con resinas de intercambio iónico. Rajagopalan et al. (1966:4940).

ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA

La electroforesis se efectuó de acuerdo al método de Ornstein y Davis (1964:321). La actividad proteolítica de la banda activa se detectó como sigue: el gel se sumergió en hemoglobina al 10% durante 15 minutos y luego se incubó en tampón citrato pH 2.0 durante 15, 30 y 60 minutos a 37°C. Al cabo de este tiempo se tiñó el gel en la forma usual. La banda proteolíticamente activa se colorea ligeramente dado que los productos de digestión proteica no se tiñen.

OBTENCION DE LA ENZIMA

La enzima fue obtenida a partir del zimógeno, por acidificación con HCL 0.2 N pH 2 y posterior cromatografía de intercambio catiónico.

ACETILACION DE LA ENZIMA

Se usó N-acetil imidazol como agente acetilante siguiendo el método de Perlmann (1966:153): Se colocaron 500 microgramos de proteínas por ml en ClNa 2 M a pH 5.8 ajustado con NaOH 0.001 N. A esta mezcla de incubación se agregó 100 veces exceso molar del agente acetilante. Un tubo control fue preparado en igual forma pero sin N-acetil imidazol.

De ambos tubos se retiraron alícuotas a diferentes tiempos deteniéndose la reacción por dilución de la mezcla.

Estas diluciones fueron utilizadas para la determinación de actividad proteolítica, actividad peptidásica y para su tratamiento con el agente deacetilante hidroxilamina.

La desacetilación se llevó a cabo de la siguiente manera: alícuotas de 0.1 ml de la enzima acetilada se utilizaron para determinar actividad y 0.1 ml de la misma enzima se mezclaron con 0.9 ml de hidroxilamina 2 M pH 5.8 por una hora. Al cabo de este tiempo se retiraron fracciones de 0.1 ml para verificar aquí la posible actividad proteolítica.

RESULTADOS

OBTENCION DE ZIMOGENOS DE MERLUCCIUS GAYI

Para la obtención de zimógenos se trabajó en cámara fría a 4°C. A partir de estómagos de *Merluccius gayi* se separaron 285 g de mucosa la que fue cortada finamente y suspendida en 590 ml de CO₂HNa 0.01 M. Esta suspensión se homogenizó en un desintegrador de tejidos durante 1.5 min. El sobrenadante de 12000 x g denominado extracto alcalino, se llevó a 70% de saturación con sulfato de amonio y luego de una hora de reposo se centrifugó a 12.000 x g por 20 min. a 0°C.

El sedimento se disolvió en un mínimo de volumen de NaHCO₃ 0.01 M, y se dializó contra el mismo medio por doce horas contra tampón Tris 0.01 M, pH 7.3 por el mismo tiempo.

El dializado que contiene la actividad proteolítica potencial, se cromatógrafió en una columna de DEAE celulosa y la elución se hizo con Tris 0.01 M pH 7.3 y un gradiente de ClNa 0-0.4 M. Se obtuvieron dos picos con actividad proteolítica potencial: uno que eluyó a concentración de cloruro de sodio 0.1 M (Z-I) y otro que eluyó a 0.25 M de cloruro de sodio (Z-II). Fig. 1.

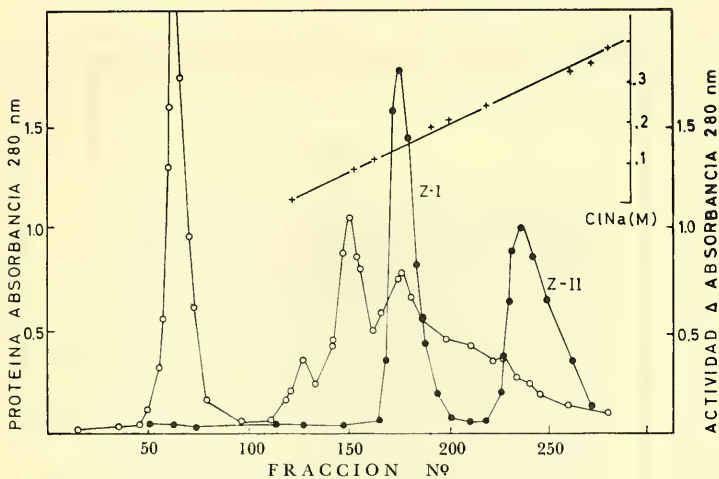


Fig. 1.- Cromatografía de los zimógenos en DEAE celulosa. La columna de 4.5 x 50 cm. fue equilibrada con Tampón Tris 10 mM a pH 7.3. La elución se efectuó con un gradiente de ClNa 0-0.4 M (+—+). La proteína (o—o) fue medida a 280 nm y la actividad proteolítica potencial expresada en delta absorbancia 280 nm (●—●).

Z-II se concentró contra Carbowax 6000, se dializó contra Tris 0.05 M pH 7.3 y se cromatógrafió en una columna de DEAE sephadex A-50 equilibrada con Tampón Tris 0.05 M pH 7.3-ClNa 0.2 M, haciéndose la elución con un gradiente de cloruro de sodio 0.2 - 0.4 M. Se obtuvo un pico de actividad proteásica (Fig. 2). Este pico se concentró, se dializó contra H₂O alcalinizada a pH 7 y posteriormente fue liofilizado y conservado a 4°C. Su actividad se mantuvo aproximadamente por 4 meses.

En la Tabla I se observa la purificación de este zimógeno. La purificación del zimógeno fue controlada por electroforesis en gel de acrilamida (Fig. 3).

OBTENCION Y PURIFICACION DE LA ENZIMA

El zimógeno fue activado con HCl 0.1 N durante 10 min. a 18°C y dializado contra H₂O destilada.

El zimógeno activado se cromatógrafió en Amberlita IRC-50 equilibrada con tampón acetato 0.4 M pH 4.4 y eluido con un gradiente de pH 4.4 - 5.6. La enzima se resolvió en un solo pico de proteína (Fig. 4).

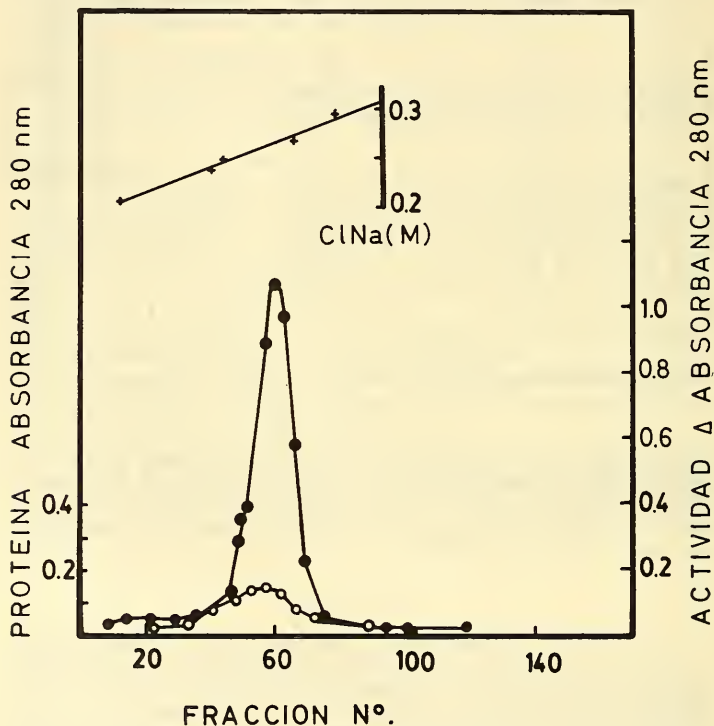


Fig. 2.- Cromatografía del zimógeno Z-II en DEAE Sephadex A-50. La columna de 2.5 x 40 cm fue equilibrada con Tampón Tris 0.01 M pH 7.3 ClNa 0.2 M. La elución se realizó con un gradiente de ClNa 0.2 - 0.4 M. (+---+). La proteína (o---o) fue medida a 280 nm y la actividad fue expresada en delta absorbancia 280 nm (●---●).

EFEECTO DE pH SOBRE LA ACTIVIDAD EN EL EXTRACTO ALCALINO Y EN LA ENZIMA PURIFICADA.

Para el extracto alcalino se obtienen dos óptimos de actividad: uno a pH 1.8 y otro a pH 3. Cuando el estudio se hizo con la enzima purificada el pH óptimo fue cercano a 1.8 (Fig. 5).

Por el hecho de presentar esta enzima una curva de actividad en función del pH similar a pepsina humana y de cerdo y además por su conducta cromatográfica también semejante a esas enzimas: se ha denominado pepsina y al zimógeno que le da origen pepsinógeno de *Merluccius gayi*. En relación al zimógeno Z-1 mostrado en la figura 1, se ha comunicado que por sus propiedades corresponde a gastricsinógenos I y II los cuales originan gastricsina I y gastricsina II respectivamente. Sánchez-Chiang et al. (1981).



Fig. 3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de pepsinógeno purificado. 50 microgramos de proteína en 0.1 ml fueron aplicados al gel. La electroforesis fue realizada a 1.5 mA por tubo por dos horas.

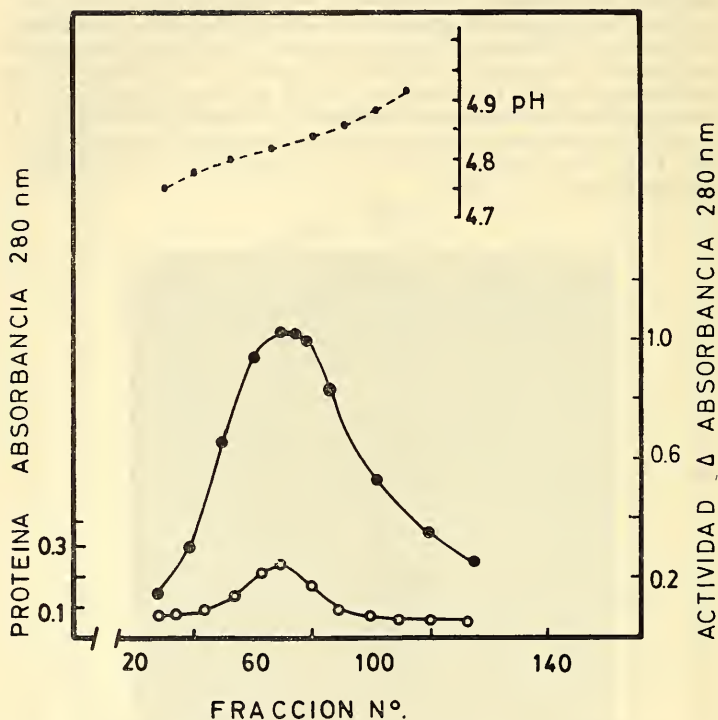


Fig. 4.- Cromatografía del producto de activación ácida de pepsinógeno en Amberlita IRC-50. La columna de 1.5 x 20 cm. fue equilibrada con tampón acetato 0.4 M pH 4.4 y la elución se hizo con un gradiente de pH con tampón acetato 0.4 M, pH 4.4-5.6 (●-----●). La proteína fue leída a 280 nm (o-----o) y la actividad fue expresada en delta absorbancia 280 nm (●-----●).

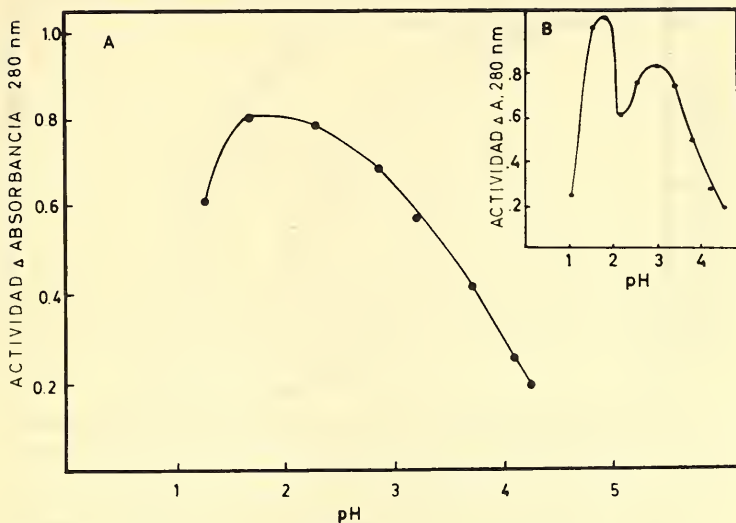


Fig. 5.- Efecto de pH en la actividad proteolítica. A: enzima purificada. B: extracto alcalino de mucosa gástrica de *Merluccius Gayi*. En ambos casos la mezcla de digestión contenía 2,5% de hemoglobina. El pH de 1.2 a 4.2 se ajustó con HCl y tampón citrato de sodio. La actividad proteolítica se expresó en delta absorbancia 280 nm (●—●).

ESTABILIDAD DE PEPSINOGENO Y PEPSINA DE MERLUCCIIUS GAYI Y DE CERDO A pHs NEUTROS Y ALCALINOS.

Los zimógenos y las enzimas se colocaron en tampones barbital sódico 50 mM a pHs desde 7 a 9 y en tampones carbonato bicarbonato de sodio 50 mM a pHs desde 10 a 11 durante 25 min y se les determinó actividad proteolítica remanente.

El pepsinógeno de *Merluccius gayi* es estable hasta pH 9, en cambio la pepsina a pH 8 conserva el 80% de su actividad y a pH 9 aún mantiene casi el 50% de ella. En cambio, el pepsinógeno de cerdo presenta una curva de estabilidad muy semejante a la de *Merluccius gayi*, sin embargo, la pepsina de cerdo es estable sólo hasta pH 7. (Fig. 6).

EFFECTO DE SALES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Al agregar ClNa a la mezcla de ensayo desde 0 a 70 mM, se incrementó la actividad proteolítica casi en un 250% para la enzima de *Merluccius gayi*. En cambio, no se vió ningún efecto sobre pepsina de cerdo. (Fig. 7). Del mismo modo se probó la influencia de otras sales sobre la actividad y todas ellas produjeron incremento de la actividad específica basal en la pepsina de *Merluccius gayi*. (Fig. 8).

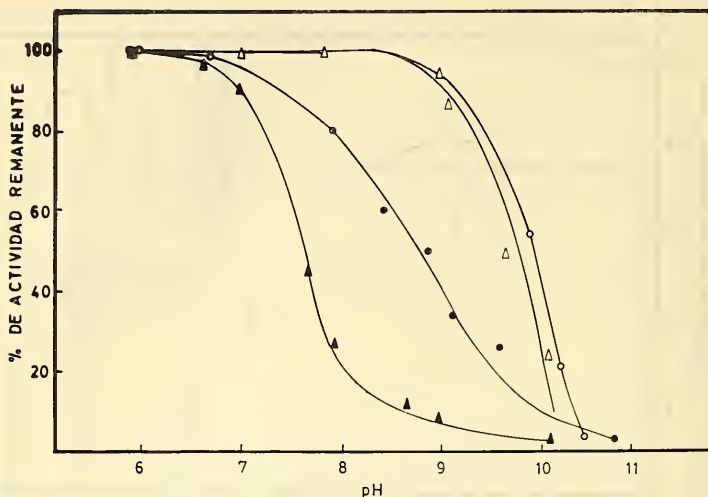


Fig. 6.- Estabilidad de pepsinógeno y pepsina de *Merluccius gayi* (○—○) (●—●) y de pepsinógeno y pepsina de cerdo (Δ—Δ) (triángulos en negro) en función de pH. La actividad está expresada en porcentaje de actividad remanente. Los tampones usados fueron Barbitol sódico HCl 50 mM pHs 7 a 9 y carbonato-bicarbonato 50 mM pHs 10 a 11 durante 25 minutos.

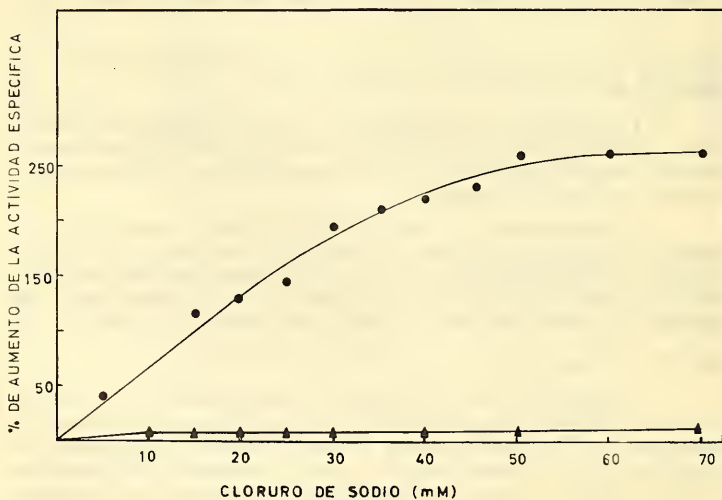


Fig. 7.- Efecto de ClNa sobre la actividad proteolítica de pepsina de *Merluccius gayi* (●—●) y pepsina de cerdo (triángulos en negro). Este efecto está expresado en porcentaje de aumento de la actividad específica.

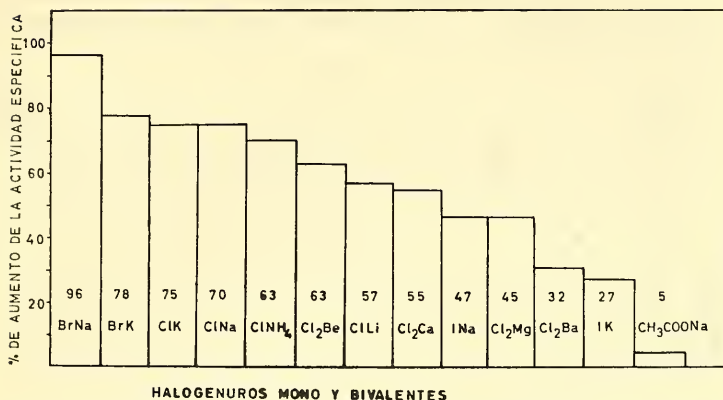


Fig. 8.- Efecto de cationes mono y bivalentes sobre la actividad de pepsina de *Merluccius gayi*. Las concentraciones adicionadas al medio de incubación fueron 70 mM. El efecto está expresado en % de aumento de la actividad específica.

HIDROLISIS SOBRE SUSTRATOS SINTETICOS.

Hay una marcada diferencia entre la actividad dipeptidásica entre pepsina de *Merluccius gayi* y de cerdo. En efecto, aquella no hidroliza APT y tiene una menor actividad frente a APDT, a diferencia de pepsina de cerdo. En cambio, frente a Z-tri-ala, pepsina de *Merluccius gayi* presenta mayor actividad que pepsina de cerdo. Además, esa enzima es activa frente a Z-tir-ala. (Tabla N° II).

EFFECTO DE ACETIL IMIDAZOL SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

El efecto del agente acetilante acetil imidazol se observa en la figura 9. En relación a la actividad proteolítica, a los 15 min. la enzima ha perdido un 70% de su actividad basal y a los 30 minutos sólo manifiesta el 18% de esta actividad. En cambio, la enzima sin el agente acetilante aún a los 120 minutos presenta el 90% de su actividad.

A diferencia de aquel efecto inhibidor se produce un notable incremento de la actividad peptidásica sobre APDT, a semejanza de lo que ocurre con pepsina de cerdo.

En el mismo gráfico se observa el efecto de hidroxilamina sobre la enzima acetilada, demostrándose que este efecto sobre la actividad es totalmente reversible.

ESPECIFICIDAD FRENTE A SUSTRATOS PROTEICOS Y ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA LECHE.

Esta propiedad se estudió comparativamente con pepsina de cerdo y el resultado se observa en la Tabla III. La pepsina de *Merluccius gayi* presenta mayor actividad específica frente a hemoglobina, en cambio, casi no es activa frente a fibrinógeno.

En relación a la actividad coagulante de la leche, de la tabla se deduce que pepsina de *Merluccius gayi* es 23 veces menos efectiva que pepsina de cerdo.

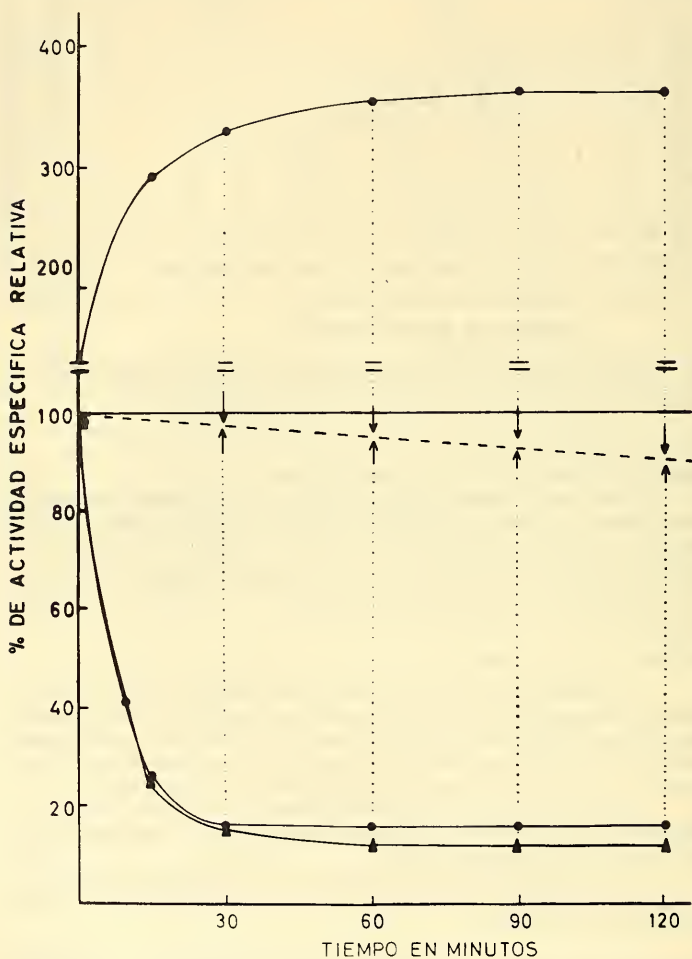


Fig. 9.- Efecto de acetilación sobre pepsina de *Merluccius gayi* (●—●) y pepsina de cerdo (triángulos en negro), sobre la actividad proteolítica(A) y peptidásica(B) de pepsina de *Merluccius gayi*. El efecto se midió a los 20, 60, 90 y 120 minutos. La actividad fue expresada en % de variación de la actividad específica. En el gráfico está indicada también la reversibilidad de este efecto por hidroxilamina (.....>) y el control de la actividad (-----).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A partir de mucosa gástrica de *Merluccius gayi* se ha logrado separar y purificar por cromatografía en DEAE celulosa y DEAE-Sephadex un zimógeno. Este zimógeno presenta características semejantes a pepsinógeno de otras especies. En efecto, presenta la propiedad cromatográfica de eluir a concentraciones altas de ClNa (0.25 M en DEAE-Celulosa y 0.25 M en DEAE-Sephadex). Merret et al (1969:3696) y Bohak (1969:4638). También es semejante su movilidad electroforética y su estabilidad en el rango de pH alcalino.

Al activar este zimógeno en medio ácido se origina una enzima con propiedades semejantes a pepsinas de especies superiores. Entre estas similitudes se pueden destacar: el originarse a partir de un zimógeno por activación ácida; su conducta cromatográfica. Rajagopalan et al. (1966:4940); su pH óptimo de acción; su actividad frente al sustrato sintético APDT. Baker (1951:809) y el efecto del acetilimidazol sobre la actividad proteolítica y peptidásica. Perlmann (1966:153).

Una de las características diferenciales más notables de esta enzima es el efecto activador de halogenuros mono y bivalentes. Al observar la figura N° 8 se destaca el mayor efecto activador de sales como BrNa, BrK, ClK y ClNa. Se puede concluir que este efecto de sales no es debido a fuerza iónica, número atómico ni peso atómico, por cuanto no hay relación entre estos parámetros físico-químicos y la magnitud del efecto activador. Esta propiedad de efecto de sales también se presenta en Gastricsina I y Gastricsina II de esta misma especie, destacándose, que el incremento de la actividad para estas enzimas en general, es significativamente mayor que para la pepsina y que el acetato de sodio produce una pequeña inhibición de la actividad. Sánchez-Chiang et al. (1981).

Esta característica que no ha sido descrita para ninguna otra especie sugeriría una probable influencia del habitat sobre el mecanismo de acción de estas enzimas. Existe en la naturaleza una serie interesante de ejemplos en que los organismos adaptan sistemas al medio ambiente. Así, por ejemplo, se puede mencionar el sistema transportador de sodio en el epitelio puro y glandular de la piel de sapo *Caudiverbera caudiverbera* como uno de los mecanismos más importantes de ingreso de este elemento a su organismo. Norris et al. (1972:38). Otro ejemplo lo constituye el sistema excretor de NH_3 de ciertos animales como la tortuga y mamíferos marinos que evolucionaron desde el mar a la tierra. El NH_3 es fácilmente excretable como tal cuando el habitat de la especie es acuoso, a diferencia de lo que ocurre cuando el animal debe vivir con un aporte limitado de agua. Así se justifica en aquellos animales un ciclo para eliminar el NH_3 a la forma de urea o ácido úrico. Grisolia et al. (1976:1).

En el caso que aquí se ha reportado, este pez adaptó en su sistema digestivo gástrico el componente enzimático al medio salino con el que llega toda su fuente nutritiva y para hacerlo más efectivo se deja incrementar notablemente con este medio.

En conclusión, el sistema pepsinógeno-pepsina está presente también en peces. Sus características son en general similares a las de mamíferos, destacándose la propiedad diferencial exclusiva de ser su actividad proteolítica notablemente incrementada por halogenuros de metales mono y bivalentes.

TABLA Nº 1.-

PURIFICACION DE PEPSINOGENO DE *MERLUCCIVS GAYI*

ETAPAS	Proteína Total (mg)	Actividad total (unidades)	Actividad específica	Rendimiento	Purificación
Extracto crudo alcalino	9490	26000	2,7	100	—
Sulfato de Amonio (0-70%)	3857	29000	7,5	110	2,77
DEAE Celulosa: Z-II	204	3776	27,8	13	10,30
DEAE Sephadex: Z-II	19,8	3105	156,0	11,9	57,70

Las actividades están expresadas en unidades de absorbancia a 280 nm que se producen en 10 min. a 37°C a pH 2. La actividad específica está expresada en unidades de absorbancia a 280 nm que se producen en 10 min. a 37°C a pH 2 por mg de enzima.

Z II corresponde a pepsinógeno de *Merluccius gayi*.

TABLA Nº 2.-

ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE PEPSINAS SOBRE DIPEPTIDOS SINTETICOS

Enzima	SUSTRATOS			
	APT	APDT	Z-TRI-ALA	Z-TIR-ALA
Pepsina de <i>Merluccius gayi</i>	0	1030	47	90
Pepsina de Cerdo	4000	7400	24	0

La actividad específica está expresada como nanomoles de tirosina, diyodotirosina o alanina por 60 minutos por miligramo de proteína.

TABLA Nº 3.-

EFECTO DE PEPSINA DE *MERLUCCIVS GAYI* Y DE CERDO FRENTE A SUSTRATOS PROTEICOS Y ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA LECHE

Enzima	Actividades específicas delta absorbancia 280 nm/mg de proteína	Actividad coagulante de la leche; ug de enzima para coagular la leche en un min. pH 5.6.37°C.
	hemoglobina	fibrinógeno
Pepsina de <i>M. gayi</i>	420	0.1
Pepsina de Cerdo	150	58
		7.0
		0.3

La actividad proteolítica se determinó en presencia de cloruro de sodio 70 mM.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados reportados en este trabajo han sido obtenidos a partir del Proyecto de Investigación Ng 20902 financiado por la Vicerectoría de Investigación de la Universidad de Concepción.

BIBLIOGRAFIA

- Anson, M. L. y A. E. Mirsky, 1932. The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 16: 59-63.
- Baker, L. E., 1951. New Synthetic Substrates for pepsin. *J. Biol. Chem.* 193: 809-819.
- Berridge, J. N., 1955. Purification and Assay of Rennin. *Methods in Enzymology*. Vol. 2: 69-72. Sidney P. Colowick y Nathan D. Kaplan.
- Bohak, Z., 1969. Purification and Characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *J. Biol. Chem.* 244: 4638-4648.
- Chiang, L., L. Sánchez-Chiang, J. N. Mills y J. Tang, 1967. Purification and properties of porcine gastricsin. *J. Biol. Chem.* 242: 3098-3102.
- Chiang, L., L. Sánchez-Chiang, S. Wolf y J. Tang, 1966. The separate determination of human pepsin and gastricsin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122: 700-704.
- Grisolia, S., 1976. *The Urea Cycle*. John Wiley and Sons. New York. 1-579.
- Huang, W. Y. and J. Tang, 1969. On the Specificity of Human Gastricsin and Pepsin. *J. Biol. Chem.* 244: 1085-1091.
- Lang, M. H. y B. Kassell. Bovine pepsinogens and Pepsins III. Composition and Specificity of the Pepsins. 1971. *Biochemistry*. 10: 2296-2301.
- Merrett, T. G., E. Bar-Eli y H. Van Vunakis, 1969. Pepsinogen A, C and D from the smooth dogfish. *Biochemistry*. 8: 3696-3702.
- Norris, B., J. Concha, C. González y J. Sánchez, 1972. Relation between the corium glands and the effects of catecholamines and acetylcholine on toad skin potential. *Acta Physiologica Latino Americana*. 1: 38-44.
- Ornstein, L. y E. J. Davis, 1964. *Disc. electrophoresis*. I. Background and theory. *N. Y. Acad. Sci.* 121: 321-343.
- Perlmann, G. E., 1966. Acetylation of pepsin and pepsinogen. *J. Biol. Chem.* 241: 153-157.
- Rajagopalan, T. G., S. Moore y W. H. Stein, 1966. Pepsin from pepsinogen. Preparation and properties. *J. Biol. Chem.* 241: 4940-4959.
- Richmond, V. J. Tang, S. Wolf, R. Capputo y R. Trucco, 1958. Chromatographic isolation of gastricsin. The proteolytic enzyme from gastric juice with a pH optima 3. 2. *Biochim Biophys. Acta*. 29: 453-461.
- Ryle, A. P. y M. P. Hamilton, 1966. Pepsinogen C. and pepsin C. Further purification and amino acid composition. *Biochem. J.* 101: 176-183.
- Sánchez Chiang, L., Ponce, O., 1981. Gastricsinogens and gastricsins from *Merluccius gayi*. Purification and Properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 68 B: 251-257.
- Tang, J., S. Wolf, R. Capputo y R. E. Trucco, 1959. Isolation and crystallization of gastricsin from human gastric juice. *J. Biol. Chem.* 234: 1174-1178.
- Ward, P., V. Neumann y L. Chiang, 1978. Partial characterization of Pepsins and gastricsins and their Zymogens from human and toad gastric mucosa. *Comp. Biochem. Physiol.* 61 B: 491-498.