

## **77TCA. NUEVOS INHIBIDORES DE PROTEASAS CON POTENCIAL UTILIZACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA OBTENIDOS A PARTIR DE PAPA ANDINA**

TELLECHEA, M.; COTABARREN, J.; CISNEROS, J. S.; CECCACCI, F.; OBREGÓN, W. D.

Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Dpto. de Cs. Biológicas,  
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

**Resumen:** En los últimos años, la biotecnología y sus aplicaciones industriales han experimentado grandes logros en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica. El empleo de productos vegetales para la conservación de alimentos es uno de los procesos que busca actualmente la “química verde” para tratar carnes, vegetales y productos envasados en general, para prolongar la vida útil del alimento. Dentro de estos productos bioactivos se encuentran los inhibidores de metalocarboxipeptidasas los cuales, entre otras acciones, inhiben el crecimiento bacteriano o fúngico. La regulación precisa de la actividad proteolítica es esencial para la fisiología de los microorganismos, como ser la producción de toxinas, entre otras, por esto la actividad de muchas proteasas se encuentra bajo estudio intensivo, ya que los inhibidores de proteasas (IP) son un tipo de regulador de las mismas. La tecnología y la creación de instrumentos para una fina purificación como la inmovilización de enzimas y la espectrometría de masas es lo que ha permitido detectar y caracterizar componentes individuales como los inhibidores de proteasas con posibles propiedades conservantes del alimento. Por otra parte, cabe destacar además que, en el caso de los inhibidores peptídicos de origen vegetal, son mínimos los estudios referidos al material botánico de la flora Argentina. Dada la gran biodiversidad vegetal existente en nuestro país resulta de sumo interés la implementación de una búsqueda de nuevas moléculas naturales capaces de modificar o modular la actividad biológica de proteasas y microorganismos que estén involucradas en la conservación de alimentos o en funciones nutricionales. En el presente trabajo se ha purificado y caracterizado un nuevo inhibidor de Carboxipeptidasa A de 4,3 KDa obtenido a partir de *Solanum Tuberosum* subespecie andigenum variedad Churqueña (Papa Andina). Los tratamientos térmicos del inhibidor muestran que conserva actividad luego de un proceso de 1 hora a 100°C.

### **1. Introducción:**

Las papas andinas se utilizan como uno de los alimentos principales en la región del noroeste de nuestro país. Entre los componentes alimentarios principales de la papa encontramos almidón, proteínas, fibras, vitaminas. Dentro de las proteínas encontramos un 40 % de las denominadas patatinas y en un porcentaje un poco menor encontramos inhibidores de proteasas. Se ha hablado principalmente de las partes verdes de la papa, por el efecto antinutricional de uno de sus componentes, solanina, un glucoalcaloide de sabor amargo y con propiedades tóxicas, que no es eliminado por tratamiento con calor. Pero la papa contiene también otros factores antinutricionales (Gilani GS 2005) a destacar, entre ellos, los inhibidores de proteasas (IPs), que están en gran cantidad en el tubérculo de la misma. Estos inhibidores enzimáticos interfieren con el proceso de digestión, pudiendo inhibir no sólo proteasas de estómago sino también las liberadas por el páncreas al intestino. Entre estas últimas podemos nombrar a la tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas, entre otras. Se ha observado que muchos de estos inhibidores, principalmente los inhibidores de carboxipeptidasas, tienen resistencia al calor durante varios minutos, incluso llegando a mantener su actividad biológica luego de tratamientos

térmicos de 100°C durante una hora. En este trabajo encontramos, estudiamos y caracterizamos un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A presente en tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Churqueña. Entre los resultados obtenidos se destaca la notable estabilidad que tienen estos nuevos inhibidores frente a tratamientos térmicos prolongados. Podría generarse una controversia entre los efectos benéficos de los inhibidores y los efectos antinutricionales de los mismos, tema que debe ser motivo especial de estudio. Se sabe que muchos inhibidores de proteasas se podrían utilizar potencialmente como aditivos alimentarios ya sea en la conservación de carnes como prevención de contaminantes de alimentos por hongos o bacterias (Santos 2011).

## 2. Objetivos:

- Obtener un extracto crudo con actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasa a partir de tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad “Churqueña”.
- Evaluar la estabilidad térmica de los inhibidores hallados.
- Diseñar y armar matrices de afinidad para inmovilizar proteasas diana, por ejemplo carboxipeptidasa A.
- Purificar los IPs mediante cromatografía de afinidad
- Caracterizar los inhibidores obtenidos por técnicas convencionales y/o proteómicas.

## 3. Metodología:

Preparación de los extractivos crudos: Tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Churqueña (papa andina) se pelaron y trituraron en agua fría a 4°C, en presencia de ditioneitol (DTT) 10 mM para prevenir la oxidación de polifenoles. Se sedimentó el almidón por incubación en la heladera y el sobrenadante se centrifugó diferencialmente a 5000 rpm y 11000 rpm por 60 min. a 4 °C., obteniéndose de este modo el extracto crudo (EC).

Determinación de actividad inhibitoria de proteasas: Determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA): La actividad es registrada por el descenso de la absorbancia a 350nm mediante medidas continuas durante 120 seg a 37°C. Buffer de reacción: Tris-HCl 0,1M; NaCl 0,2M; pH 7,5. Solución de enzima: CPA de páncreas bovino (Sigma-Aldrich). Concentración de enzima: 7,0x10<sup>-9</sup>M. Solución de sustrato: N-(4-metoxifenilazofornil)-Phe-OH 10mM.

Tratamiento térmico del extracto crudo: La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido identificados presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuro, esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas. Las muestras fueron tratadas térmicamente por calentamiento a 70 °C, 85 °C, y 100 °C durante 60 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11000 rpm por 90 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue analizado para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente.

Inmovilización de proteasas sobre gel de glioxil-agarosa: El soporte utilizado para la inmovilización de Carboxipeptidasa A fue agarosa 10 BLC. Dicho soporte debió ser previamente activado con grupos aldehído para que éstos reaccionen con los residuos aminoacídicos de la enzima, utilizando el protocolo de activación de (Soler, Bastida et al. 1997). El soporte activado se denomina glioxil-agarosa y es el que se utiliza para la inmovilización covalente de la enzima. La inmovilización se realizó a 25° C, pH 10, con bicarbonato de sodio 100 mM, glicerina al 25% (v/v), en una relación de 25 y 45 mg de enzima/g de glioxil-agarosa en un volumen total de 25 ml.

Purificación cromatográfica del extracto crudo: Se realizó una cromatografía de afinidad con CPA inmovilizada en glioxil-agarosa. 50 ml del EC fueron sembrados y eluidos a una velocidad de 1ml/min por la columna y luego se lavó la misma con buffer de reacción de CPA (Tris-HCl 0,1M, ClNa 0,2 M, pH 7,2). Este soporte conteniendo a la enzima inmovilizada, atrapada mediante uniones covalentes (base de Schiff entre el grupo amino libre de la proteína y el grupo aldehído de la glioxil-agarosa), puede ser reutilizado en muchas aplicaciones ya que se ha demostrado que la enzima permanece unida y activa.

Identificación mediante Intensity Fading MALDI-TOF/MS: La atenuación de la intensidad de la señal de espectrometría de masas con el método de ionización asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (IF MALDI-TOF MS: del inglés “intensity fading”, “matrix-assisted laser desorption ionization”, “time of flight”, “mass spectrometry”) posibilita detectar la formación de complejos entre moléculas, particularmente proteínas, mediante la utilización de la espectrometría de masas como transductor. El método fue desarrollado para identificar IPs a partir de mezclas naturales complejas mediante su capacidad de interacción con las proteasas que inhibe (Obregón 2011) La variante diseñada por nosotros incluye primariamente una etapa de afinidad con la proteasa inmovilizada en micropartículas poliméricas. El inhibidor retenido en la micropartícula puede ser eluido selectivamente y analizado mediante espectrometría de masas. De esta forma, la reaparición o el aumento de la intensidad de la señal en el espectro de la fracción eluida, corrobora la presencia de una molécula capaz de interactuar con la proteasa inmovilizada y descarta la posibilidad de interacciones inespecíficas. Esta metodología ha permitido identificar IPP en extractos heterogéneos que fueron posteriormente purificados y caracterizados por métodos convencionales.

Análisis de la huella peptídica: Se realizó la digestión triptica de las bandas de SDS-PAGE para el análisis de la huella peptídica o “peptide mass fingerprint” (PMF) que se empleó para la identificación de los inhibidores aislados. Para ello las bandas fueron cortadas, lavadas y decoloradas. Posteriormente se relucieron y alquilaron los grupos Cys libres y se incubaron en presencia de tripsina a 37°C durante 2 horas para la digestión de los inhibidores. Los péptidos generados fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS.

#### 4. Resultados

##### *Actividad inhibitoria del extracto crudo.*

El extracto crudo (EC) tuvo una concentración de proteínas de alrededor de 800 µg/ml. Se realizó una curva dosis-respuesta del extracto como primera prueba de la existencia de actividad inhibitoria en dicha muestra ( Fig 1). Se observa que a medida que aumenta la cantidad de extracto disminuye la actividad de la enzima carboxipeptidasa A, evidenciándose la presencia de un inhibidor de esta enzima en el EC obtenido.

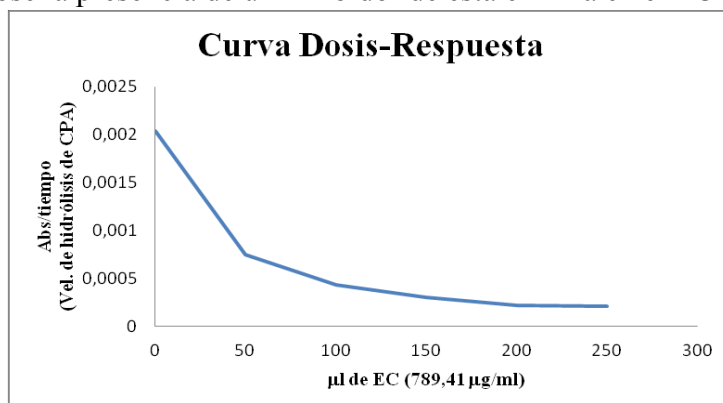


Figura 1: Curva dosis- respuesta del EC.

*Actividad inhibitoria de CPA frente a los diferentes tratamientos térmicos.*

Sabiendo que el inhibidor de CPA es un péptido termorresistente, el EC fue sometido a tratamiento térmico a 60°C, 70°C, 85°C y 100 °C. Este proceso bajó el rendimiento de proteínas, disminuyendo la concentración a 120 µg/ml cuando la muestra se incubó durante una hora a 60° C. El rendimiento proteico bajó aún más con los tratamientos de 70°C, 85°C y 100°C cayendo la cantidad de proteínas a valores de alrededor de 90 ug/ml. Sin embargo, la actividad inhibitoria de CPA se mantuvo incluso a 100°C.

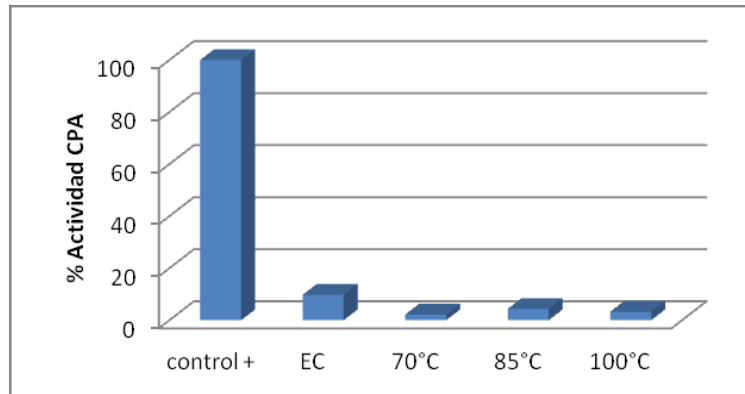


Figura 2: Actividad enzimática de CPA en presencia de los distintos tratamientos térmicos.

Se ve que la actividad inhibitoria de CPA se conserva con los diferentes tratamientos térmicos, a pesar de la gran pérdida de proteínas que se obtuvo debido a la desnaturalización de las mismas. Por lo tanto se puede observar que la disminución del contenido proteico se contrasta con la actividad inhibitoria obtenida, es decir, que el tratamiento térmico afecta a las demás proteínas que constituyen el EC excepto a los inhibidores, generando un tratamiento preliminar de muy alto rendimiento de purificación.

*Perfil electroforético del EC y los tratamientos térmicos de Churqueña*

La figura 3 muestra la distribución de masas moleculares de las proteínas constituyentes del EC y de los Tratamientos Térmicos (TT) a 60, 70, 85 y 100 °C. Se observan bandas intensas de 14 KDa., . y 2 bandas menores de 10 KDa. Entre las bandas menores a 10 KDa se encuentran los inhibidores de CPA,(Josep Vendrell 1999; V. Bártoová 2008), los cuales se conservan con los tratamientos térmicos, lo cual ya fue demostrado en las curvas de actividad inhibitoria anteriores.

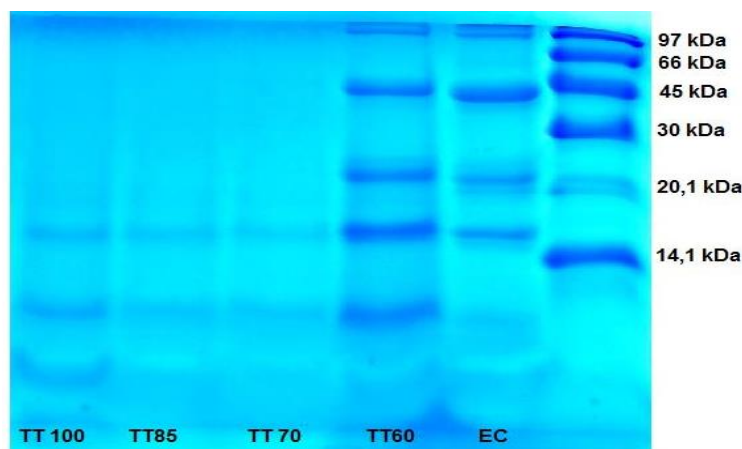


Figura 3 Electroforesis SDS-PAGE.

*Determinación de concentración proteica por el método de Bradford*

Muestra	concentración proteica ( $\mu\text{g/ml}$ )
EC	789,412
TT 60	112,588
TT 70	87,882
TT 85	92,588
TT 100	82,588

Tabla N°1

Puede observarse la gran pérdida de proteínas que se obtuvo debido a la desnaturalización térmica de las mismas. Las proteínas que quedan luego de estos tratamientos térmicos son principalmente inhibidores de proteasas presentes en el EC de Churqueña. Se destaca que los tratamientos a 70°C, 85°C y 100°C prácticamente no presentan diferencias en la concentración final de proteínas obtenidas.

*Purificación de los inhibidores mediante Cromatografía de Afinidad*

El EC y los TTs fueron sometidos a cromatografía de afinidad. Se observó que los TTs permiten una mejora en la obtención de moléculas más puras cuando son sometidos a cromatografía de afinidad, esto es debido a que la muestra es menos compleja y hay menos posibilidad de interacciones inespecíficas con el soporte de glioxil-agarosa. Como primer ensayo de pruebas se realizó una cromatografía de afinidad CPA-agarosa en Batch como control del proceso. Posteriormente el relleno de afinidad fue colocado en una columna para automatizar la purificación. En la figura 4 se observa uno de los cromatogramas obtenidos por el proceso de purificación, en este caso el de un extracto crudo proveniente de Churqueña, sin previo tratamiento térmico, para mostrar la relación entre la fracción no retenida (NR) y la fracción retenida. Pudimos observar que el pool del no retenido (NR: Tubos 1-14) no presenta actividad inhibitoria, mientras que hay un pico eluido a pH 5 (tubo 21 y 22) que muestra una fuerte inhibición, del 87% con respecto al control positivo.

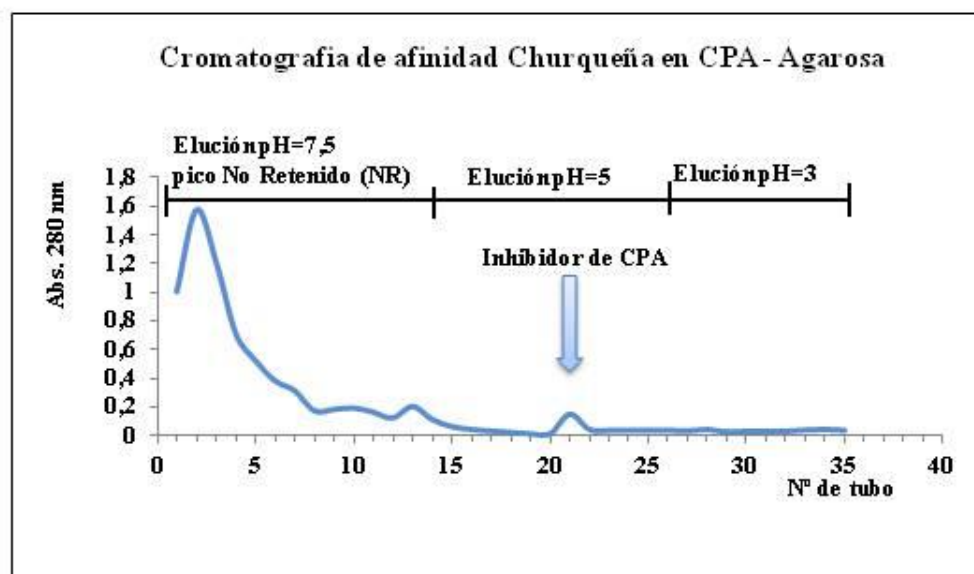


Figura 4: Cromatografía de afinidad de Churqueña en CPA – Agarosa

*Medida del Peso Molecular mediante espectrometría de masas MALDI TOF/MS.*

Por espectrometría de masas se verificó que en el eluyente obtenido a pH=5 existe una molécula inhibidora con una masa molecular de alrededor de 4309,8 Da.

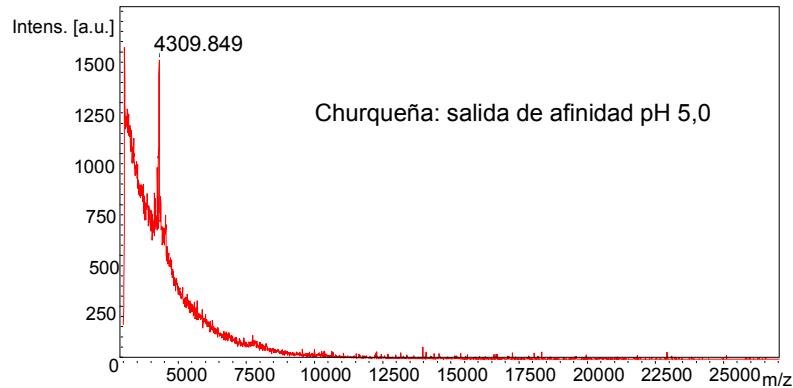


Figura 5: a) Espectro de masas MALDI-TOF/MS

*Huella peptídica (Peptide Mass Fingerprint).*

Se realizó una electroforesis SDS-page del eluido a pH=5, obteniéndose una banda que fue cortada y a la cual se le realizó una digestión triptica para posteriormente obtener la huella peptídica y compararla con la base de datos.

La obtención de la huella peptídica sin embargo no pudo determinar que este inhibidor sea hallado en bases de datos, por lo cual se confirmaría que se trata de un inhibidor nuevo, no estudiado hasta el momento.

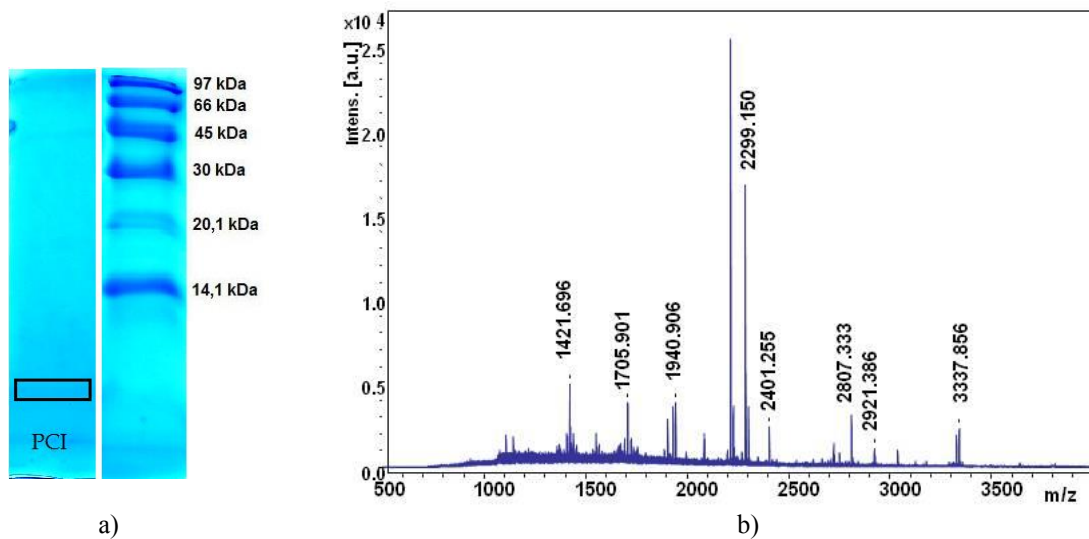


Figura 7: a) SDS-PAGE del pico eluido a pH5 en la cromatografía de afinidad b) Espectro de masas obtenido luego de la digestión triptica, de la banda PCI, también llamado huella peptídica del inhibidor de CPA aislado de papa andina.

**5. Conclusiones:**

Mediante los porcentajes de actividad residual de CPA se deduce que, en el caso del empleo de los tratamientos térmicos a 70, 85 y 100 °C de Churqueña, la actividad de la enzima es muy baja, lo cual demuestra la muy buena estabilidad térmica del inhibidor.

Estos resultados nos permiten observar el alto grado de purificación logrado luego de realizar los tratamientos térmicos y la cromatografía de afinidad, conservando en un gran porcentaje la actividad inhibitoria sobre CPA con respecto al extracto crudo.

La inmovilización de enzimas junto con el tratamiento térmico demostraron ser herramientas claves para la purificación y aislamiento de los inhibidores con alto grado de pureza. La espectrometría de masas es un método analítico con alto grado de precisión, lo cual permitió en nuestro trabajo la identificación concreta de las moléculas presentes en las muestras. Por último, se logró evidenciar que en los tubérculos de la variedad Churqueña se encuentra presente un inhibidor de metalocarboxipeptidasas el cual no ha sido estudiado aún, lo cual se determinó mediante el análisis de la Huella Peptídica. Dada la gran biodiversidad vegetal existente en nuestro país resulta de sumo interés la implementación de una búsqueda de nuevas moléculas naturales capaces de modificar o modular la actividad biológica de proteasas y microorganismos que estén involucradas en la conservación de alimentos o en funciones nutricionales.

## **6. Referencias**

- Gilani GS, C. K., Sepehr E. (2005). "Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods." *J AOAC Int.*
- Josep Vendrell, E. Q., Francesc X. Avilè's (1999). "Metallocoarboxypeptidasas and their protein inhibitors Structure, function and biomedical properties."
- Obregón, W. D. (2011). "Detection and characterisation of a new metallocoarboxypeptidase inhibitor from *Solanum tuberosum* cv. Desirée using proteomic techniques." *Food Chemistry.*
- Santos, A. L. S. d. (2011). "Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events." *World J Biol Chem.*
- Soler, G., A. Bastida, et al. (1997). "Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents." *Biochim Biophys Acta* 1339(1): 167-75.
- V. Bártová, J. B. (2008). "Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice."