



JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA A.U.G.M.

“CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA LA INTEGRACIÓN REGIONAL”

Universidad: Universidad Nacional de La Plata
Facultad/Instituto/Centro, etc: Facultad de Ciencias Exactas
Departamento Cátedra: LIPROVE, Dpto. de Ciencias. Biológicas
Curso de Posgrado (si fuera necesario) Alumno del último año de la Carrera de Bioquímica. Químico (ciclo básico de la carrera de bioquímica). Becario de Entrenamiento de la CICIPBA
Dirección: 47 y 115
Teléfono: (0221) 423-0121 int 57 Fax: (0221) 4226947 E-mail: strejo@biol.unlp.edu.ar
Autor: TREJO, Sebastián Alejandro
Título: "Fitoproteasas de aplicación en la industria alimentaria: purificación y caracterización de proteinasas de *Asclepias fruticosa* L."
Núcleo Disciplinario o Comité Académico: Farmacognosia de Productos Naturales (Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones)
Otros miembros del grupo (si fuera necesario): Dra Claudia Natalucci, Dra. Laura M. I. López
Palabra Clave: fitopeptidasa (Español) fitopeptidase (Portugués)



"Fitoproteasas de aplicación en la industria alimentaria: purificación y caracterización de proteinasas de *Asclepias fruticosa* L."

Qco. Sebastián Alejandro Trejo

Becario de Entrenamiento de la CICPBA

LIPROVE, Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, strejo@biol.unlp.edu.ar Casilla de Correo 711, B1900AVW, La Plata, Argentina

OBJETIVOS

- Aislar, purificar y caracterizar nuevas peptidasas presentes en plantas que crecen en nuestro país.
- Aplicar estas nuevas fitopeptidasas para hidrolizar parcialmente proteínas alimenticias con el objeto de mejorar sus propiedades funcionales.
- Contar con nuevas fuentes de enzimas proteolíticas que eventualmente reemplacen a las preparaciones comerciales importadas que actualmente se usan en biotecnología.

METODOLOGÍA

Obtención de preparaciones crudas

Se obtuvo el látex realizando incisiones sobre pecíolos, tallos y frutos de *Asclepias fruticosa*. Se recogió dicho látex en buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,0 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM y se centrifugó a 10.000 rpm por 3 horas a 4° C, el sobrenadante límpido fue almacenado en freezer a -20° C.

Determinación del contenido de proteínas

Se utilizó el método de Bradford (1976). Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 5-100 µg/ml para el microensayo.

Ensayo de la actividad proteolítica (López, 1995)

- Caseína: se utilizó al 1% en buffer Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,75 con el agregado de cisteína 20 mM.
- Azocaseína: se utilizó al 2% en buffer Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,75 con el agregado de cisteína 20 mM.
- Proteínas de soja:

El objetivo de este experimento fue determinar el grado de hidrólisis de las proteínas presentes en concentrados de soja por acción de una cantidad definida de la enzima estudiada y analizar los productos generados a lo largo del tiempo. El seguimiento de la hidrólisis se realizó con un "pH-stat" manual

empleando una microbureta tipo Bahn, un pH-metro, un vaso de doble camisa para termostatar la mezcla de hidrólisis y un baño de temperatura graduable. El pH se mantuvo constante por adición de NaOH 0,25 N cada vez que el mismo descendió 0,1 unidad y la reacción se detuvo por disminución del pH a 4,2. En todos los experimentos la temperatura fue fijada en 45°C y se utilizaron 20 ml de una dispersión de concentrado de soja al 8% en agua (5,3% en proteínas) que fue llevada con NaOH al valor de pH elegido (8,0-9,0 ó 10,0). En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco reemplazando la solución de enzima por una cantidad equivalente de agua destilada. El grado de hidrólisis (DH) se calculó de acuerdo a la fórmula de Adler-Nissen, 1986.

Efecto del pH sobre la actividad proteolítica

Se determinó utilizando caseína como sustrato en el rango de pH 6,0-11,0. Se emplearon soluciones 0,01 M de los siguientes buffers: Mes, Mops, Taps, Ampso y Caps (Sarath *et al.*, 1989). Adicionalmente se determinó la actividad caseinolítica a pH 2,8 utilizando buffer citrato-fosfato (0,2 M).

Estabilidad térmica

Las muestras fueron incubadas durante 0, 10, 30, 60, 90 y 120 minutos a 37°C, 45°C, 55°C, 60°C y 70°C, a pH 9,75. Finalizado el período de incubación, las muestras fueron mantenidas en un baño de hielo hasta que se midió la actividad caseinolítica residual.

Efecto de inhibidores

Con el objeto de determinar a qué grupo pertenece la proteasa en estudio (Salvesen, G. & H. Nagase,1989), las preparaciones enzimáticas fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C con cloruro mercúrico (1 mM), PMSF (1 mM), iodoacetato de sodio (1 mM), pepstatina 1µM y 1-10 fenantrolina (10 mM) en éste último caso utilizando azocaseína como sustrato pues el inhibidor absorbe a 280 nm.

Cromatografía de intercambio iónico

El extracto crudo fue purificado por cromatografía de intercambio catiónico. Se utilizó una columna (1,5 x 30 cm) rellena con CM-Sepharose Fast Flow, equilibrada con el buffer de partida (Tris-HCl 50 mM de pH 8,20). Se sembraron 18 ml del extracto crudo centrifugado, luego de lavar la columna con 60 ml del buffer de partida, se llevó a cabo la elución con 200 ml de un gradiente lineal de cloruro de sodio (0,20-0,45 M) en el mismo buffer. La cromatografía se desarrolló en cámara fría (4°C) y la velocidad de corrida fue de 12,6 ml/h. La obtención de enzima pura se logró luego de recromatografiar la fracción activa utilizando el mismo buffer y un gradiente lineal de NaCl (0,20-0,37 M).

Isoelectroenfoque

Se utilizó el equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio Rad) y anfolitos de rango 3-10. Las muestras se concentraron y desionizaron por precipitación con 3 volúmenes de acetona.

Zimograma (Westergaar et al., 1980)

Se prepararon placas de agarosa-caseína sobre una película de GelBond (Pharmacia) . El desarrollo del zimograma se realizó disponiendo el gel de poliacrilamida en el que se desarrolló el isoelectroenfoque, sin colorear, sobre la placa de agarosa-caseína. El conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda y llevado a estufa a 55°C durante 7 minutos.

Electroforesis en gradiente de poliacrilamida (Hames, 1981)

Las muestras obtenidas en los hidrolizados de soja se trataron con un buffer extractante (Tris-HCl 0,1 M de pH 8, conteniendo urea 9 M y 1,1% de SDS) y se agitaron durante una hora a temperatura ambiente. Las suspensiones se centrifugaron durante 5 minutos a 16.000 g, tomándose luego 0,5 ml de cada sobrenadante que se mezclaron con 0,5 ml de buffer de muestra y se llevaron a ebullición durante 3 minutos. Luego fueron sembradas en un gel de poliacrilamida en gradiente (5-20%).

Se utilizó un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad), la electroforesis se desarrolló durante 60 minutos a corriente constante (40 mA). Los geles fueron coloreados con Coomassie Brilliant Blue R-250. La estimación de los pesos moleculares se realizó por comparación con proteínas patrones de bajo peso molecular. Los perfiles proteicos se analizaron en base a sus densitogramas empleando un programa de análisis (Scion Image).

Electroforesis discontinua (Laemmli, 1970)

Se utilizaron geles de resolución al 12% de poliacrilamida. La corrida se llevó a cabo durante 45 minutos con una intensidad de corriente constante de 30 mA mientras se produce el apilado ("stacking"), incrementándose hasta 60 mA durante la corrida.

Análisis por espectrometría de masas

El equipo empleado fue un espectrómetro de masas MALDI-TOF BRUKER modelo BIFLEX, equipado con un láser de nitrógeno (337 nm), voltaje de aceleración: 19 kV y la matriz utilizada ácido sinapínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico).

Determinación de la secuencia N-terminal

El secuenciador empleado fue un Beckman LF3000 Protein Sequencer (basado en la técnica de Edman) equipado con un analizador de PTH-aminoácidos System Gold (Beckman).

RESULTADOS

Cuando se ensayó caseína como sustrato, el extracto crudo diluido 1:3 mostró linealidad hasta los 10 minutos de reacción y una actividad de 0,978 Ucas/ml, mientras que la actividad sobre azocaseína fue de 6,18 Uazocas/ml. El IEF-zimograma del extracto crudo muestra una fracción de pI alcalino con actividad proteolítica (Fig.1). El perfil de pH obtenido sobre caseína como sustrato demuestra que el 80% de la actividad máxima se manifiesta entre pH 7,5 y 10,5 (Fig.2). La preparación es sumamente estable luego de permanecer durante dos horas a 37°C y 45°C, pero es totalmente inactivada luego de 5 minutos a 80°C (Fig.3). Por tratamiento con ácido iodoacético 1 mM o con E-64 0,1mM durante 30 minutos a 37°C es inactivada total e irreversiblemente, además el cloruro mercúrico la inhibe reversiblemente. La actividad no es afectada por pepstatina A (1µM), PMSF (1 mM) y 1-10 fenatrolina (10 mM). Dicho extracto crudo se utilizó para hidrolizar enzimáticamente a las proteínas de concentrados de soja: la velocidad de hidrólisis aumenta de manera lenta pero constante a lo largo del tiempo para los tres valores de pH ensayados (8,0–9,0 y 10,0), el grado de hidrólisis máximo (7%) fue alcanzado a pH 10, 180 min de reacción y con el agregado de Cys 20 mM (Fig.5). Los hidrolizados fueron sometidos a electroforesis desnaturalizante (Fig.4A) en geles de poliacrilamida en gradiente (5-20%) y los perfiles proteicos se analizaron en base a sus densitogramas (Fig.4B) empleando un programa de análisis (Scion Image). Se observó una marcada degradación de los polipéptidos α' , α y β de la fracción 7S y en menor medida al polipéptido A de la fracción 11S, aparecen además nuevos péptidos de bajo peso molecular. La concentración de proteínas solubles se incrementó al doble del valor original.

Empleando cromatografía de intercambio catiónico y un gradiente de elución apropiado (Fig 6A y 6B) logra purificarse una proteasa que aparece homogénea por SDS-PAGE (Fig.7) y espectrometría de masas (MALDI-TOF); los valores de Mr obtenidos fueron 26000 y 23700, respectivamente. La secuencia N-terminal de la enzima (LPDSVDWREKGVVFPINQKGK) muestra un alto grado de homología con las secuencias de otras proteasas cisteínicas.

Figura 1: IEF y Zimograma del Extracto Crudo

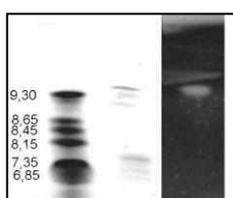


Figura 2: Efecto del pH sobre la actividad del Extracto Crudo

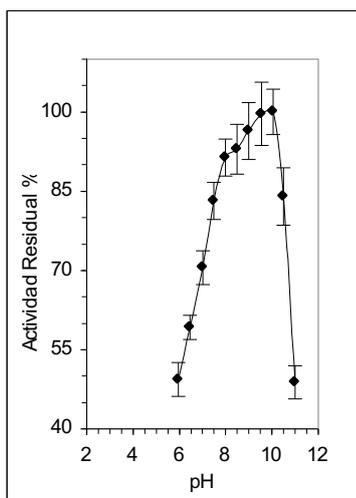


Figura 3: Estabilidad Térmica del Extracto Crudo

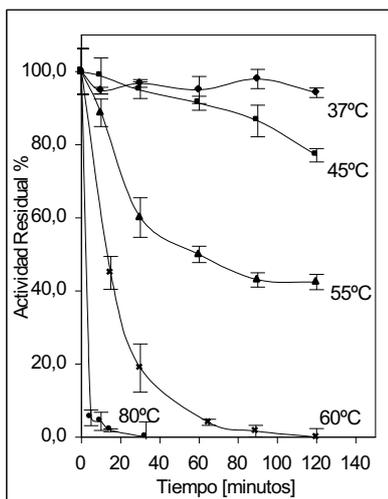


Figura 4A: Electroforesis de los hidrolizados de soja

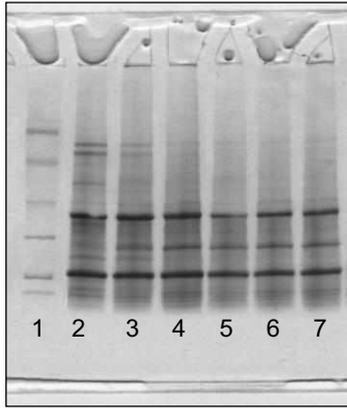
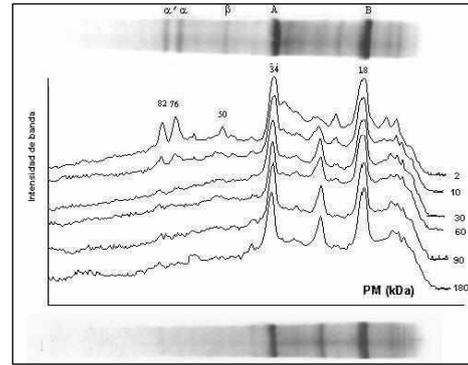


Figura 4B: Densitogramas de los hidrolizados de soja



Carril 1: patrones de peso molecular (Bio-Rad: Fosforilasa B 97,4 kDa; Albúmina bovina 66,2 kDa; Albúmina de huevo 45,0 kDa; Anhidrasa carbónica 31,0 kDa; Inhibidor de tripsina 21,5 kDa; Lisozima 14,4 kDa).
Carriles 2-7: hidrolizados de soja luego de 0, 2, 10, 30, 60, 180 minutos de reacción respectivamente.

Figura 5: Grado de Hidrólisis

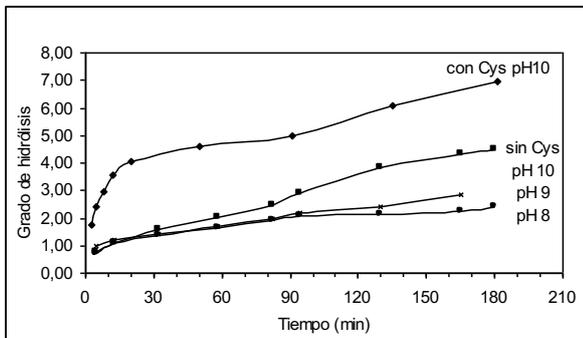


Figura 6A: Cromatografía de Intercambio Catiónico

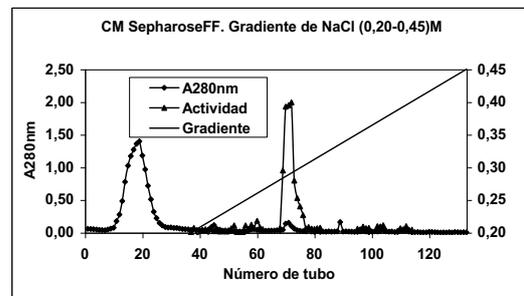


Figura 6B: Recromatografía de Intercambio Catiónico

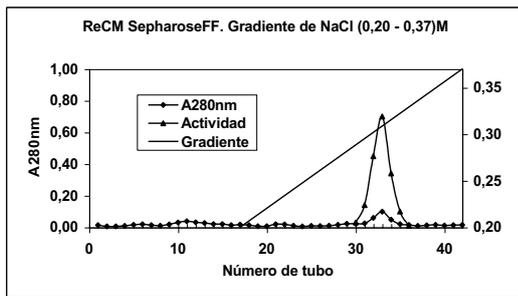
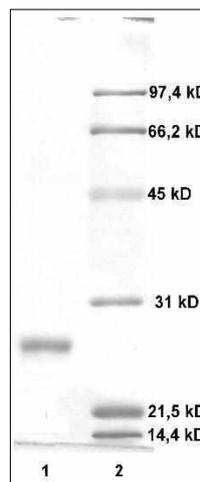


Figura 7: Electroforesis de la enzima pura



Carril 1: muestra
Carril 2: marcadores de bajo peso molecular (Bio-Rad: Fosforilasa B 97,4 kDa; Albúmina bovina 66,2 kDa; Albúmina de huevo 45,0 kDa; Anhidrasa carbónica 31,0 kDa; Inhibidor de tripsina 21,5 kDa; Lisozima 14,4 kDa).

CONCLUSIONES

- ✓ Se aisló, purificó y caracterizó una nueva fitoproteasa a partir del látex de *Asclepias fruticosa* L.
- ✓ Se ensayó la acción de esta fitopeptidasa cisteínica sobre las proteínas de concentrado de soja y se evaluaron los productos obtenidos. Dado el comportamiento hidrolítico diferencial que muestra la enzima ensayada en este trabajo con los distintos componentes del sustrato, se espera obtener modificaciones específicas de las propiedades funcionales de las proteínas de soja. Puede observarse que existe una degradación preferencial de algunas de las fracciones componentes de las proteínas de soja con respecto a otras a un determinado tiempo de hidrólisis, como también la aparición de nuevos péptidos.
- ✓ La hidrólisis enzimática de sustratos proteicos como soja es un proceso complejo, en el cual las fracciones componentes de cada sustrato se hidrolizan a velocidades diferentes frente a la enzima, hecho que resulta ventajoso cuando se desea obtener hidrolizados parciales de dichos sustratos, ya sea para eliminar fracciones no deseadas como para alterar las propiedades funcionales de sus componentes proteicos.
- ✓ La concentración de proteínas solubles se ve incrementada notablemente luego del tratamiento hidrolítico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adler-Nissen, J. (1986) "Enzymic hydrolysis of food proteins". Elsevier, London & NY, pág.122.
2. Bradford, M.M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* **72**:248-54.
3. Hames, B.D. (1981) "An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis en Gel electrophoresis of proteins. A practical approach" (D. Hames & D. Rikwood, eds.), IRL Press Ltd, London, págs. 1-86.
4. Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* **227**: 680-5 .
5. López, L.M.I.(1995) Tesis Doctoral.
6. Salvesen, G. & H. Nagase (1989) "Inhibition of proteolytic enzymes", en "Proteolytic enzymes, a practical approach" (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.), IRL Press, Oxford, págs. 83-104.
7. Sarath, G., R.S.Motte & F. Wagner (1989) "Protease assay methods" en "Proteolytic enzymes, a practical approach" (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.), IRL Press, Oxford, pág. 27.
8. Westwrgaard, J.L., C. Hackbarth. M.W. Treuhaft y R.C. Roberts (1980) "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures", *J.Immunol. Meth.* **34**: 167-75.