



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de CIENCIAS EXACTAS
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis - 2011

Fitoproteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica en medios acuoso-orgánicos

Carlos Rafael Francisco Llerena Suster

Directora: Nora Silvia Priolo

Codirectora: Susana Raquel Morcelle del Valle



**Laboratorio de Investigación de
Proteínas Vegetales**

Agradecimientos

Para comenzar con la presentación de este trabajo me resulta imprescindible nombrar aquellas personas e instituciones que hicieron posible que llegara hasta esta instancia.

Sobre las personas, puedo decir que tengo la suerte de que son muchas, pero, sin dudas la primera de la lista es mi mujer, Melina. Mi compañera en todo el sentido de la palabra durante más de 10 años, la mujer que me bancó y ayudó y que me dio las motivaciones y los objetivos de mi vida: Iru y Nico. En este párrafo también tengo que nombrar a mis viejos y mis hermanos, que siempre me apoyaron y contuvieron.

Por otra parte, dentro del laboratorio, tengo que agradecer profundamente a mi codirectora Susana que con su infinita paciencia y entusiasmo, logró que pudiera terminar esta etapa acompañándome cada día. También a mi directora, Nora que estuvo siempre con toda la ayuda y aliento que necesité.

También debo agradecer por un lado a David y Seba y por otro a las chicas del CINDECA, Laura B., Laura F. y Carla, ya que aportaron su valiosa y generosa colaboración en partes importantes de este trabajo.

También a Cacho, Claudia, Nora y Laura, quienes me convocaron apenas pudieron y me dieron un lugar en el LIPROVE, donde siempre me sentí cómodo y bienvenido.

El clima de compañerismo del laboratorio fue sin dudas un impulso fundamental en mi trabajo por lo que es necesario que nombre a aquellos compañeros becarios que siguen y a los que tomaron otros rumbos como Martín, Inés, Jose, Eugenia, Daniela y Laura. En ese mismo sentido nombro a Sandra, Constanza, Mariela, Marcelo y Cecilia. Y a los estudiantes que me dieron una mano: Elisa, Luis, Erika y Franco.

Sin embargo, el agradecimiento no se puede quedar en los ámbitos de ciencia. Todo mi transcurso en la facultad lleva un sello imborrable: la militancia en la agrupación estudiantil Suma y en la agrupación de graduados CCyP. Por eso es que este trabajo también va dedicado a todos los compañeros distintas generaciones de Suma y de CCyP con los que trabajamos codo a codo durante los largos años de estudiante de grado y doctorado.

Con respecto a las instituciones, agradezco sinceramente a quienes me becaron: ANPCyT y CONICET.

También a la UNLP y en particular, a la Facultad de Ciencias Exactas, que hace ya muchos años es mucho más que mi lugar de estudio o trabajo. Es el lugar donde me formé como persona, como militante, como docente y como investigador. Es el lugar donde conocí a mi mujer y mis mejores amigos. Y es el lugar en el que he depositado años y años de trabajo incondicional, miles de horas dando y tomando clases, centenares de reuniones en el centro, en el consejo, cientos de carteles, decenas de asambleas y marchas en su defensa, innumerables anécdotas y vivencias en sus pasillos...

Gracias a todos

Índice general

	Número de página
Objetivos e hipótesis	4
Organización de la tesis	5
Abreviaturas	7
Introducción	8
Capítulo 1. Estabilidad de peptidasas en mezclas de solventes. Medidas de actividad enzimática	68
Capítulo 2. Purificación de papaína. Estabilidad estructural de papaína en mezclas de solventes	92
Capítulo 3. Inmovilización de proteasas y caracterización de biocatalizadores	145
Capítulo 4. Síntesis de derivados peptídicos empleando fitoproteasas como biocatalizadores	182
Conclusiones generales y específicas	196
Publicaciones	200

Objetivo general:

- Aplicar fitoproteasas de vegetales autóctonos o comerciales en procesos biotecnológicos

Objetivos secundarios:

- Seleccionar y caracterizar bioquímica y estructuralmente enzimas proteolíticas vegetales.
- Preparar y caracterizar los biocatalizadores y los medios adecuados para las reacciones.
- Utilizar estas enzimas como biocatalizadores en la síntesis de compuestos sencillos en medios no-convencionales con potenciales aplicaciones industriales.

Hipótesis de trabajo:

Hipótesis principal:

- Las proteasas papaína y araujaína sirven como biocatalizadores en reacciones de síntesis orgánica.

Hipótesis auxiliares:

- Estas proteasas son estables en medios con alto contenido de solvente orgánico.
- Las proteasas se pueden inmovilizar sobre soportes y conservan su actividad luego de la inmovilización.

Hipótesis derivadas:

- Papaína y araujaína mantienen su actividad natural aún cuando fueran incubadas en mezclas acuoso-orgánicas.
- La estructura de las enzimas cambia al exponerse a los solventes.
- El cambio de estructura está relacionado con los cambios en la actividad.
- Las proteasas actúan “en reversa” cuando están en solventes orgánicos.
- Las enzimas inmovilizadas catalizan la síntesis de derivados aminoacídicos en medios de reacción adecuados.
- La factibilidad y especificidad de la catálisis están relacionadas con el tipo de sustrato utilizado.

Este trabajo de tesis está organizado en cinco secciones:

- La primera sección es la **Introducción**, en la misma se desarrolla el *marco teórico* en el que se enmarcan las distintas tareas abordadas en el trabajo. A su vez, la Introducción se subdivide en 5 partes:
 - *Proteasas*. Involucra la información sobre el *objeto de estudio* (las proteasas vegetales). Se realiza una descripción que abarca desde las enzimas proteolíticas en general hasta las proteasas específicas utilizadas en este trabajo en su ambiente natural (látex).
 - *Química verde*. Se describe brevemente esta esencial y relativamente nueva área de investigación. Es el área general en la que se enmarca el trabajo.
 - *Biocatálisis*. Se reseña el ámbito disciplinar más específico. Se incluyen, desde definiciones y características generales de la biocatálisis hasta algunos usos concretos de las proteasas en el área.
 - *Proteasas en síntesis orgánica*. En esta sección se comienza describiendo características generales del uso de enzimas en procesos de síntesis orgánica biocatalizados. Luego se describe más detalladamente el uso de proteasas en distintas reacciones de síntesis. Y, por último, se describen los mecanismos de reacción propuestos para las proteasas.
 - *Ingeniería de medios y de enzimas*. En esta sección se revisan las modificaciones efectuadas tanto en medios como en enzimas que permiten mejorar la eficiencia de los procesos biocatalíticos. Por un lado, se abarcan los posibles medios alternativos como solventes orgánicos, líquidos iónicos y otros. Y por otro, se analizan los procesos sobre las enzimas como inmovilizaciones, modificaciones genéticas entre otros.

A continuación se reseñan los cuatro capítulos en los que se describen los métodos experimentales empleados para cumplir con los objetivos y corroborar las hipótesis planteadas en este trabajo.

- El **Capítulo 1**, “*Estabilidad de peptidasas en mezclas de solventes. Medidas de actividad enzimática*”, describe el estudio realizado de la estabilidad enzimática en

solventes mediante medidas simples de actividad enzimática. Abarca desde la puesta a punto de las técnicas hasta los resultados de estabilidad analizando las variables tiempo, tipo de solvente y proporción del mismo.

- El **Capítulo 2**, "*Purificación de papaína. Estabilidad estructural de papaína en mezclas de solventes*", detalla, en primer término, un nuevo procedimiento de purificación de papaína y una gran variedad de métodos para analizar el grado de pureza alcanzado. Por otra parte, usando ese producto y uno de papaína pura comercial, se continúa con el análisis de la estabilidad de las enzimas en solventes orgánicos usando técnicas de fluorescencia y FTIR.
- El **Capítulo 3**, "*Inmovilización de proteasas y caracterización de biocatalizadores*", aborda el tema de inmovilización por adsorción de las enzimas sobre dos soportes distintos. Se detalla la preparación y caracterización de los biocatalizadores producidos.
- El **Capítulo 4**, "*Síntesis de derivados peptídicos empleando fitoproteasas como biocatalizadores*", describe los ensayos de síntesis de derivados peptídicos que se desarrollaron, la puesta a punto de las reacciones y las preferencias de sustrato de los biocatalizadores.

Abreviaturas

4-HCCA: Ácido 4-hidroxicinámico	IEF: Isoelectroenfoque
AcEt: Acetato de Etilo	MALDI-TOF/MS: Matrix assisted laser desorption/ionization-Time of flight / Mass spectrometry (desorción/ionización láser asistida por matriz – Tiempo de vuelo / Espectrometría de masas)
ACN: Acetonitrilo	MeOH: Metanol
ANS: Ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico	MPEG: Metoxipolietilenglicol
AOT: Aerosol bis 2-(etilhexil) sulfosuccinato de sodio	NC-IUBMB: Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
Ara: Araujiaína	PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida
ATEE: Éster etílico de N-acetil-L-tirosina	pap F: Papaína cruda comercial Fluka
ATR: Reflexión Total Atenuada	pap L: Extracto crudo de papaína obtenido en el LIPROVE
ATrEE: Éster etílico de N-acetil L-triptofano	PEG: polietilenglicol
BAEE: Éster etílico de N-benzoil-L-arginina	PFLNA: L-piroglutamil-L-fenilalanil-L-leucil <i>p</i> -nitroanilida
BSA: seroalbúmina bovina	pI: Punto isoelectrónico
buffer BB: Buffer ácido bórico-borato de sodio 0,1 M pH 8,5	PM: Peso molecular
CALB: Lipasa B de <i>Candida Antarctica</i>	PMF: Peptide Mass Fingerprint (Huella peptídica)
CICa: Cromatografía de intercambio catiónico	PPL: papaína purificada a partir de látex
CLEAs: Agregados enzimáticos entrecruzados	PPR: papaína pura comercial Roche
CLECs: Cristales enzimáticos entrecruzados	QV: Química verde
DMF: N,N-Dimetilformamida	SDS: Dodecil sulfato de sodio
DMSO: Dimetilsulfóxido	SSPS: Síntesis de péptidos en fase sólida
DTT: 1,4-ditio-D,L-treitól	TAGs: Triacilglicéridos
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	TCA: Ácido tricloroacético
EG: Etilenglicol	TFA: Ácido trifluoroacético
EM: Espectrometría de masas	Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
FDA: Agencia de alimentos y drogas de los EEUU	TT: Tetrionato sódico
FI: Fluorescencia intrínseca	Ucas: Unidades caseinolíticas
FRET: Transferencia de energía de fluorescencia (fluorescent resonance energy transfer)	UI: Unidades Internacionales
FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	Z: Carbobenzoxi
GndCl: Cloruro de guanidinio	λ_{\max} : Longitud de onda con máxima absorbancia
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography)	

Fitoproteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica en medios acuoso-orgánicos

ZOHCCDORINH



Índice

1. Proteasas.....	10
1.1. Enzimas proteolíticas: generalidades.....	10
1.1.1. Introducción	10
1.1.2. Interacción enzima-sustrato	11
1.1.3. Clasificación de las proteasas: mecanismos catalíticos	11
1.2. Proteasas vegetales	14
1.2.1. Proteasas secundarias.....	14
1.2.2. Látex: definición y funciones.....	15
1.2.3. Proteasas de látex	16
2. Química verde	18
3. Biocatálisis	22
3.1. Uso de enzimas vegetales en procesos biocatalíticos.....	24
3.1.1. Fitoproteasas en biocatálisis.....	26
4. Proteasas en síntesis orgánica	27
4.1. Generalidades.....	27
4.2. Proteasas como biocatalizadores	30
4.2.1. Proteasas en síntesis de péptidos.....	32
4.2.2. Otras aplicaciones de las proteasas en síntesis orgánica.....	35
4.3. Mecanismos de las proteasas en reacciones reversas	38
5. Ingeniería de medios y enzimática.....	40
5.1. Ingeniería de medios	41
5.1.1. Solventes orgánicos.....	41
5.1.2. Otros medios	46
5.2. Ingeniería enzimática. Biocatalizadores	48
5.2.1. Purificación	49
5.2.2. Inmovilización.....	49
5.2.3. Modificaciones enzimáticas de tipo químico.....	56
5.2.4. Modificaciones enzimáticas mediante ingeniería genética.....	57
5.3. Sustratos	58
6. Bibliografía	58

1. Proteasas

1.1. Enzimas proteolíticas: generalidades

1.1.1. Introducción

Este tipo de enzimas son conocidas bajo diversos términos: *proteasas*, *proteinasas* y *peptidasas*. Históricamente, estos términos poseen distintos significados, pero hoy se consideran como sinónimos. Quizás el término *enzimas proteolíticas* sea el más comprensible para el uso corriente, si bien el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) en 1984 recomendó utilizar el término *peptidasa* para el grupo de hidrolasas de unión peptídica asignándoles el código E.C. 3.4. (Barrett y col., 2004).

Las peptidasas a su vez comprenden dos grandes grupos de enzimas: las endopeptidasas y las exopeptidasas. Las mismas cortan uniones peptídicas y remueven secuencialmente aminoácidos desde el N-terminal o C-terminal, respectivamente (Bergman y Ross, 1936). Los términos proteasa y proteinasa, ampliamente usados, son también empleados como sinónimos de endopeptidasa.

Estas enzimas están involucradas en una gran variedad de procesos fisiológicos y, de acuerdo a su modo de acción, pueden dividirse en dos categorías diferentes:

1. proteólisis limitada, en la cual una proteasa corta sólo uno o un número limitado de enlaces peptídicos de una determinada proteína inicialmente inactiva o precursora, provocando de este modo su transformación en una proteína biológicamente activa, por ejemplo, conversión de prohormonas en hormonas.

2. proteólisis ilimitada, en la cual una proteína determinada es degradada a sus aminoácidos constituyentes. La degradación de las proteínas puede ser dependiente de la ubiquitina, polipéptido que se une selectivamente a la misma para constituir la forma conjugada ubiquitina-proteína, susceptible de ser rápidamente hidrolizada o bien mediante la compartimentalización de proteasas en vacuolas. Cuando las proteínas son transferidas a estos compartimientos vacuolares sufren una rápida degradación (Vierstra, 1996).

El análisis de los datos completos en alrededor de cien genomas ha demostrado que alrededor de un 2% de todos los productos génicos son peptidasas, evidenciándose así que se trata de uno de los grupos funcionales de proteínas más grandes e importantes (Barrett y col., 2004). Todas las plantas recambian proteínas en el curso de su desarrollo y por lo tanto contienen enzimas proteolíticas. Normalmente estas proteasas se encuentran presentes con actividades relativamente bajas y a menudo son de difícil detección. Sin embargo, algunas

especies vegetales poseen proteasas sumamente activas en ciertos tejidos, por ejemplo, en algunos látex obtenidos de plantas de diversas familias las enzimas proteolíticas constituyen más del 50% del total de proteínas y 10% o más del material fresco (Boller, 1986).

1.1.2. Interacción enzima-sustrato

En general, las peptidasas se unen al sustrato apropiado a través de los denominados sitios activos que permiten luego catalizar la hidrólisis de la unión peptídica específica (Mc Donald, 1985). Según la nomenclatura introducida por Schechter y Berger (1967) y hoy utilizada ampliamente, la zona de unión del sitio activo puede subdividirse en subsitios o sitios específicos (S), cada uno de los cuales permite la ubicación de un residuo aminoacídico del sustrato o péptido (P). Los subsitios se ubican a ambos lados del sitio activo y a partir del mismo se numeran en forma correlativa, bien respecto en dirección al N-terminal (S_1, S_2, S_3 , etc) o bien hacia el C-terminal (S'_1, S'_2, S'_3 , etc.). En cuanto al sustrato, los aminoácidos que interactúan con la proteasa son numerados (P_1, P_2, P_3 , etc.) en relación a los subsitios en los cuales se ubican respecto del N-terminal o (P'_1, P'_2, P'_3 , etc.) hacia el C-terminal (**Figura 1**).

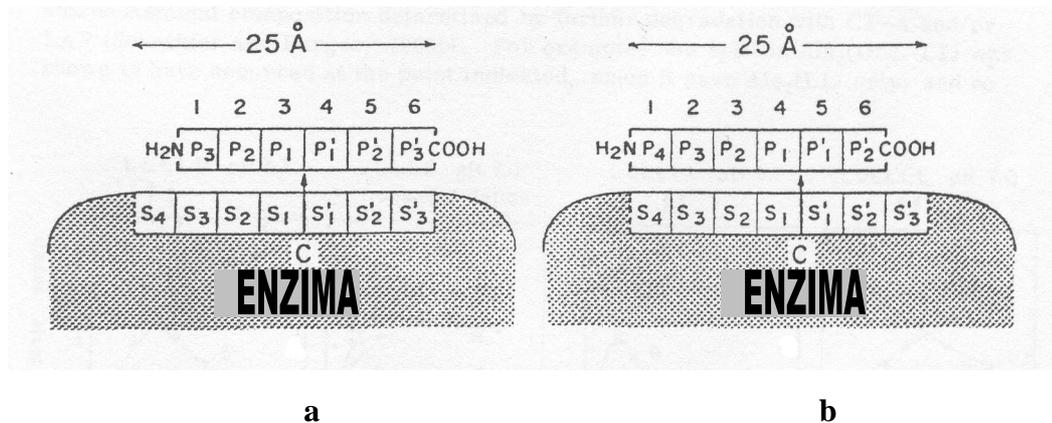


Figura 1. Interacción enzima-sustrato. El sitio activo de la enzima está compuesto de siete subsitios, ($S_1 - S_4$ y $S'_1 - S'_3$) localizados a ambos lados del sitio catalítico C. Las posiciones P del sustrato hexapeptídico se cuentan desde el punto de corte, teniendo así la misma numeración que los subsitios que ocupan. **a.** Este complejo enzima-sustrato libera como producto dos moléculas de tripéptido. **b.** Este segundo complejo libera una molécula de tetrapéptido y una de dipéptido. (Schechter y Berger, 1967).

1.1.3. Clasificación de las proteasas: mecanismos catalíticos

Las peptidasas difieren de casi todas las demás enzimas en que su especificidad de sustrato resulta extremadamente difícil de definir, hecho que llevó a clasificarlas en base a las características de sus respectivos mecanismos catalíticos (Hartley, 1960). Según el sistema

MEROPS, las proteasas pueden clasificarse siguiendo una jerarquía organizada según los conceptos de tipo catalítico, clan, familia y peptidasa (Rawlings y col., 2010). Estos términos se definen de la siguiente manera:

- Tipo catalítico: depende de la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis.
- Clan: contiene una o más familias que parecieran provenir de un mismo origen, basándose en la posesión de una estructura tridimensional similar, aunque también pueden ser reveladores la disposición de los residuos catalíticos en las cadenas polipeptídicas y las semejanzas limitadas en la secuencia de aminoácidos alrededor de aquellos que son catalíticos.
- Familia: conjunto de peptidasas homólogas. Se considera que hay homología cuando una peptidasa presenta una similitud significativa en la secuencia de aminoácidos o, con la peptidasa tipo de la familia, o con una peptidasa a la cual ya se le ha demostrado homología con la peptidasa tipo. Es un requisito que esta relación sea vista en la parte de la molécula que es responsable de la actividad peptidásica, llamada unidad peptidásica.
- Peptidasa: conjunto de proteínas que presenta una clase particular de actividad peptidásica y cercanamente relacionadas en su secuencia.

En la actualidad se reconocen siete tipos catalíticos de peptidasas (Rawlings y col., 2010), en las cuales el ácido aspártico (A), la cisteína (C), el ácido glutámico (G), la asparagina (N), la serina (S), la treonina (T) o los grupos metálicos (M) juegan roles primarios en la catálisis. Las peptidasas serínicas, treonínicas, cisteínicas y las recientemente clasificadas asparagínicas, son catalíticamente muy diferentes de las aspárticas, glutámicas y metalopeptidasas, en que en las primeras el nucleófilo del sitio catalítico es parte de un aminoácido, mientras que en las dos últimas es una molécula de agua la que actúa sobre el grupo carbonilo de la unión peptídica.

1.1.3.1. Peptidasas cisteínicas (EC 3.4.22)

Se describe en especial este tipo catalítico, dado que las endopeptidasas papaína y araujaína, objetos de estudio del presente trabajo, pertenecen al mismo.

Actualmente, las proteasas cisteínicas se han clasificado en 82 familias (Rawlings y col., 2010). Entre ellas están incluidas las proteasas vegetales más extensamente estudiadas tales como papaína, ficina, actinidina o bromelaína, también varias catepsinas de mamíferos, calpaínas citosólicas y algunas proteasas de parásitos como las de *Trypanosoma*. La mayoría

de las peptidasas de esta clase están incluidas dentro de la familia de la papaína (C1) que es la enzima cisteínica más ampliamente estudiada, responsable de los principales avances no solamente en el campo de las proteinasas cisteínicas sino en la enzimología en general (Domsalla y Melzig, 2008). Ha sido la primera proteinasa cisteínica a la que se le determinó la estructura tridimensional (Drenth y col., 1968) por lo que es considerada como el arquetipo de esta clase de peptidasas.

La catálisis en las proteasas cisteínicas ocurre a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo cisteína y un residuo histidina. La cisteína 25 y la histidina 159 (de acuerdo a la numeración de papaína). El nucleófilo en este caso es un tiolato que es estabilizado a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la histidina 159 (**Figura 2**). La cisteína catalítica está involucrada en un equilibrio tautomérico entre las formas neutra y dipolar (zwitterión). Se cree que el sulfuro aniónico está involucrado directamente en un ataque nucleofílico en el carbonilo del sustrato. La ruptura del mismo involucra el ataque del agua catalizado por la enzima.

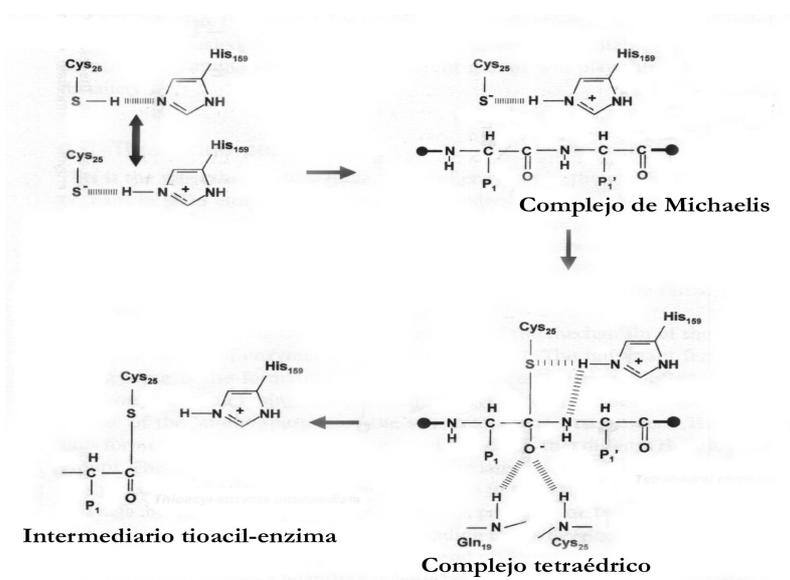


Figura 2. Mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas.

Dado que estas enzimas son inactivadas por reactivos bloqueantes de los grupos sulfhidrilo por conversión en puentes disulfuro y tienen la capacidad de reactivarse en presencia de agentes reductores, se las denominó *tiolproteinasas* (Hartley, 1960). Considerando que el único aminoácido que posee un grupo sulfhidrilo (tiol) en la cadena lateral es la cisteína, se sugirió sustituir el término *tiolproteinasas* por el de *proteinasas cisteínicas* (NC-IUBMB, 1984).

1.2. Proteasas vegetales

La proteólisis es esencial en muchos aspectos de la fisiología y desarrollo de los vegetales. Las proteasas normalmente están involucradas en el catabolismo proteico (el recambio de las proteínas existentes y su reemplazo por otras nuevas constituye la clave para la adaptación al medio ambiente), en la regulación de varios procesos, particularmente en la germinación de semillas (las proteínas de reserva son movilizadas para la construcción de las proteínas que requiere la plántula), en la formación de órganos reproductores y en la senescencia de algunos órganos como las hojas (en este proceso las proteínas se degradan y sus aminoácidos son transportados y almacenados en aquellos lugares donde se sintetizan nuevas proteínas). Aunque las proteasas usualmente están de este modo vinculadas al metabolismo primario de la planta, en la movilización de las reservas y en el recambio proteico, existen evidencias de que algunas proteasas cumplen otras funciones, por ejemplo actúan en interacción con otros organismos. Obviamente, las proteasas de plantas insectívoras actúan de este modo. Estas proteasas, con un pH óptimo de acción ácido, son capaces de digerir las proteínas de una presa capturada y obtener de esta forma nutrientes para su mantenimiento (Boller, 1986).

En definitiva, la proteólisis es responsable del mantenimiento celular, de la respuesta al estrés mediante la remoción de proteínas anormales y mal plegadas, aporta los aminoácidos necesarios para fabricar nuevas proteínas, ayuda en la maduración de zimógenos y hormonas peptídicas mediante escisiones limitadas, controla el metabolismo, la homeostasis y el desarrollo, disminuyendo la abundancia de enzimas claves y proteínas regulatorias, así como la muerte celular programada de ciertas células y órganos de la planta (Vierstra, 1996; Domsalla y Melzig, 2008).

1.2.1. Proteasas secundarias

Las enzimas proteolíticas normalmente se encuentran en cantidades relativamente bajas y a menudo son difíciles de detectar. La presencia de cantidades extremadamente altas de enzimas proteolíticas en algunos tejidos es difícil de explicar. Ellas podrían actuar como alomonas, en defensa contra agentes patógenos, parásitos y herbívoros (Dussourd, 1993).

A la clase de enzimas que se producen en cantidades que exceden el potencial necesario para el recambio proteico se las denomina *proteasas no indispensables* o *proteasas secundarias*, en analogía con los metabolitos secundarios de las plantas, y estarían destinadas

a interactuar con otras especies vegetales o animales con funciones de protección o de defensa (Boller, 1986).

Las proteasas presentes en el látex de algunas especies representan más del 50% del total de las proteínas. La principal proteinasa del látex de frutos de papaya, papaína (EC 3.4.22.2), se encuentra en una concentración tal que excede en dos veces la cantidad necesaria para el recambio de las proteínas del fruto (Glazer y Smith, 1971). También ficina (EC 3.4.22.4), presente en el látex de higos, se encuentra en cantidades abundantes. Asimismo, tanto en partes vegetativas como en frutos de varias especies pertenecientes a la familia *Bromeliaceae* se observan grandes cantidades de enzimas proteolíticas. A estas proteasas también se las llamó *proteínas prescindibles* (Adams y Rinne, 1981).

1.2.2. Látex: definición y funciones

El látex es un fluido lechoso compuesto por un suero líquido que contiene, en solución o en suspensión, una mezcla compleja de distintas sustancias. Puede contener una amplia variedad de componentes celulares, tales como núcleos, mitocondrias, partículas tales como ribosomas y análogos de lisosomas. Fueron identificados, como componentes químicos comunes de los látex, materiales aglomerantes de baja densidad, varias proteínas, terpenos, alcaloides, taninos, vitaminas, almidones, azúcares, lípidos y aminoácidos libres. La estructura secretora interna que contiene al látex es el laticífero, que puede ser una sola célula no articulada o una estructura multicelular articulada. La presencia de látex ha sido reportada en más de 20.000 especies vegetales pertenecientes a 40 familias. Sin embargo, se vio que no todos los géneros de una determinada familia poseen látex, lo que complica definir la función del mismo en las plantas (Lynn y Clevette-Radford, 1987; Domsalla y Melzig, 2008).

Muchos de los componentes presentes en el látex poseen propiedades biológicas que confieren protección contra los daños ambientales. El látex de *Carica papaya* L. contiene una mezcla de proteasas cisteínicas. El látex fresco o seco obtenido luego de dañar las hojas o los frutos de *C. papaya* contiene al menos alguna de estas enzimas proteolíticas. El sangrado del látex ocurre durante unos minutos hasta la formación de un coágulo alrededor del área dañada. El proceso de coagulación es vital para la defensa de la planta contra el posible ataque de los patógenos, sellando el área dañada y previniendo la entrada posterior de patógenos en el floema (Azarkan y col., 2004; Konno, 2011). Por otro lado, la presencia de ciertas enzimas en las vacuolas de látex, tales como quitinasas, sugiere que puede colaborar en la defensa de las plantas contra los patógenos, parásitos y herbívoros, atacando al invasor cuando la célula vegetal es lisada (Vierstra, 1996). Las quitinasas, junto a otras enzimas halladas en el látex

tales como glucanasas, tendrían función antifúngica (Bowles, 1990). Se ha comprobado que inmediatamente luego de la lesión, la coagulación del látex y la activación de las proteasas ocurren simultáneamente, indicando que la coagulación del látex es el proceso principal que contribuye al mecanismo de defensa de la planta sellando las áreas dañadas. Además, la lisis de la pared celular de los hongos requiere de la degradación de las proteínas allí presentes, junto a la de la quitina y el glucano, con lo cual parece razonable que las endopeptidasas presentes en el látex tuvieran también acción antifúngica (Azarkan y col., 2004; Konno, 2011).

1.2.3. Proteasas de látex

Se ha encontrado actividad proteolítica en el látex de más de 110 plantas de diferentes familias. Entre ellas, se distinguen las familias Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Caricaceae, Euphorbiaceae, Moraceae. Las proteasas altamente abundantes en látex son fundamentalmente de tipo catalítico cisteínico (EC 3.4.22) y serínico (EC 3.4.21) (Domsalla y Melzig, 2008). Las fuentes de proteasas de látex más estudiadas han sido las aisladas a partir de los frutos de *Carica papaya* (Caricaceae) y de ciertas especies de higos (Moraceae). Estas proteasas son las más producidas a escala comercial y las más explotadas en una variedad de aplicaciones ya vistas (Kimmel y Smith, 1957; Glazer y Smith, 1971). Sin embargo, la presencia de intensa actividad proteolítica no es una regla general de las plantas con látex.

1.2.3.1. Proteasas de *Carica papaya*. Papaína

Papaína es la proteasa de origen vegetal mejor conocida. Sus múltiples usos se basan, entre otras características, en su gran actividad enzimática y su notable resistencia ante cambios en los medios (temperatura, pH, solventes orgánicos, congelamiento, etc.), además es más económica que las enzimas de origen microbiano y posee un amplio rango de especificidad (Chamani y Heshmati, 2008). La papaína se obtiene del látex de frutos verdes de papaya (*Carica papaya*, Caricaceae), una especie originaria de las zonas tropicales y subtropicales de América, hoy presente en zonas tropicales de todo el mundo por su importancia económica.

El extracto crudo del látex, que contiene la actividad proteolítica, con todos sus componentes se denomina genéricamente *papaína*. A partir del mismo fueron aisladas cuatro endopeptidasas cisteínicas (Brocklehurst y col., 1981; Brocklehurst y Salih, 1983). Dichas peptidasas se conocen con los nombres de papaína, quimopapaína, caricaína y glicilendopeptidasa. La secuencia N-terminal de las cuatro peptidasas pudo ser determinada y

comparada, demostrando tener entre sí una gran homología e indicando una familia de genes íntimamente relacionados (Lynn y Yaguchi, 1979). Tienen pesos moleculares alrededor de 23 kDa, entre 212 y 218 aminoácidos, y pI muy similares (entre 8,75 y 11,3) (Barrett y col., 2004), lo que ocasiona que resulte difícil su purificación. Por otro lado, se diferencian por sus actividades relativas sobre distintos sustratos (Glazer y Smith, 1971) y por su basicidad (Brocklehurst y Salih, 1983). La papaína aislada constituye en fracción menor comparada con las otras proteasas (aproximadamente el 8%) pero es la más fácilmente purificable debido a su acidez (Azarkan y col, 2003) y por el hecho de no poseer isoformas como la quimopapaína (Buttle y Barrett, 1984) y la caricaína (Kyndt y col, 2007). Por otra parte, es la cistein proteasa más estudiada y da su nombre a una gran familia de cisteínproteasas (C1), es el modelo para las estructuras 3D y para estudios de los mecanismos catalíticos (Barrett y col, 2004).



a



b

Figuras 3. Frutos verdes de **a.** *Carica papaya* y **b.** *Araujia hortorum*

El uso tradicional de la papaína ha sido el tiernizado de carnes gracias a la amplia y poco específica hidrólisis de proteínas que es capaz de catalizar. En cuanto a sus usos industriales se pueden destacar el curtido del cuero, softener in bakery en la industria alimenticia, como agente clarificante de cervezas y vinos y en otros procesos donde se necesite hidrolizar proteínas. También encontramos papaína en jabones en polvo (Monge y col, 2008; Uhlig, 1998). Los usos medicinales de la papaína incluyen cápsulas digestivas, acción antiparasitaria, limpieza de tejidos muertos de úlceras y quemaduras, blanqueo de dientes, etc. (Telgenhoff y col, 2007). Sin embargo algunas drogas tópicas que contenían papaína fueron recientemente prohibidas por la FDA debido a reportes que mostraron reacciones alérgicas, hipotensión, taquicardia, pérdida permanente de la visión, etc. (FDA

News, 2008). Otros usos de la papaína son la disociación de células en el primer paso de cultivos celulares y la escisión de la porción Fc de las inmunoglobulinas (Luo y col, 2002).

Además de todos estos usos comunes, en numerosos trabajos de investigación ha sido ampliamente comprobada su utilidad en catálisis en medios no convencionales, demostrando una gran capacidad de formar enlaces amida y éster entre diversos derivados de aminoácidos y otros compuestos aminoacídicos (Nakaoka y col, 1998) y no aminoacídicos, tales como alquilaminas (Morcelle y col, 2009), alcoholes (Cantacuzène y col, 1987), aminoalcoholes y aminoacetales (Llerena Suster y col, 2009), entre otros.

1.2.3.2. Proteasas de *Araujia hortorum*. Araujiaína

Un rasgo común que puede hallarse en el látex de la familia Asclepiadaceae es la actividad proteolítica. Pero si bien dicha familia está constituida por 230 géneros y casi 2.000 especies que se caracterizan por desarrollar laticíferos, solamente han sido estudiadas las proteasas contenidas en el látex de algunas especies pertenecientes a cuatro géneros. Entre ellos se encuentra la *Araujia hortorum* Fourn., una planta trepadora que crece en el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. A partir del látex de la misma, se purificaron, mediante cromatografía de intercambio catiónico, tres endopeptidasas cisteínicas: araujaína h I, h II y h III. Araujaína h I y h III tienen pI > 9,3, mientras que araujaína h II tiene un pI algo más bajo (8,9). El análisis de las secuencias N-terminales ponen de manifiesto la gran homología existente de dichas proteasas entre sí y de las mismas con las proteasas del látex de *Carica papaya* (Priolo y col., 2000; Obregón y col., 2001).

En el presente trabajo se nombra al extracto crudo del látex de *Araujia hortorum* Fourn. como *araujaína*.

2. Química verde

La problemática medioambiental es una de las principales preocupaciones sociales en todo el planeta. Los preocupantes niveles de contaminación existentes hoy en día son producto del avance del sistema y los valores capitalistas a nivel global. El avance descontrolado de la industria y del imperio de la sociedad de consumo, principalmente durante el siglo XX, significó el aumento en la calidad de vida y beneficios económicos de un pequeño porcentaje de la población mundial mientras que dejó para el resto de la humanidad dolorosas secuelas: pobreza, marginación, desocupación, enfermedades, guerras, etc. Entre ellas surge una de difícil resolución: la contaminación a nivel planetario. Las consecuencias de ésta se extienden

en numerosos ejemplos: calentamiento global, cambio climático, escasa disponibilidad de agua potable, desertificación, etc.

Hace casi 20 años ya que se empezó a tomar nota de esta situación y se empezaron a mover los mecanismos internacionales para intentar frenarla. Ésta es una de las ideas centrales trazadas en la *Agenda 21*, un documento realizado durante la cumbre ambiental y del desarrollo que tuvo lugar en la ciudad de Río de Janeiro en junio de 1992 patrocinado por las Naciones Unidas, en vistas de la proximidad del nuevo siglo y la necesidad de encararlo bajo una nueva política global. A pesar de esto, poco se ha avanzado, entre otros motivos por el prácticamente nulo compromiso del mayor productor de contaminación tanto por actividades industriales como por el nivel de consumo desenfrenado de su población: Estados Unidos de Norteamérica.

A pesar de que la solución de este grave problema implica cambios políticos, económicos e ideológicos profundos, desde la “ciencia” se puede trabajar en este sentido. Esta concepción aparece explícitamente en la *Agenda 21*, ahí se enfatiza sobre la necesidad de la incorporación de la idea de un **desarrollo sustentable**. Se propone que *frente a las amenazas del daño irreversible del medio ambiente, se deben desarrollar métodos para unir los hallazgos de las ciencias establecidas con el conocimiento aborígen de las diferentes culturas, enfocándose particularmente en la divulgación y aplicación de los resultados a la protección ambiental y el desarrollo sustancial*. En cuanto al papel que debe jugar la biotecnología (capítulo 16), se hace referencia a *la promesa de contribuir mediante el desarrollo de, por ejemplo, un mejor cuidado en la salud, aumentar la seguridad de la alimentación a través de prácticas agrícolas sostenibles, mejorar la provisión de agua potable, un desarrollo de procesos industriales más eficientes para la transformación de materias primas, así como la detoxificación de residuos peligrosos*.

En cuanto al *aumento de la protección del medio ambiente*, se tiene en cuenta que *el objetivo es prevenir, detener y revertir la degradación ambiental mediante el empleo apropiado de la biotecnología junto a otras tecnologías, fomentando procedimientos seguros como componentes integrales del programa*. Se destaca el *desarrollo de alternativas ambientalmente confiables y mejoras a los procesos productivos que dañan el medio ambiente; el desarrollo de aplicaciones para reducir el requerimiento de compuestos químicos sintéticos no adecuados y aumentar el uso de productos ambientalmente apropiados, incluyendo productos naturales; el desarrollo de procesos dirigidos a la reducción de la generación de desechos, su tratamiento y uso de materiales biodegradables, así como la recuperación de la energía y la provisión de fuentes de energía renovables*,

alimento animal y materias primas del reciclado provenientes de los residuos orgánicos y de la biomasa.

1. Prevención	Es mejor prevenir la generación de desperdicios que tratarlos o eliminarlos luego de haber sido creados.
2. Economía atómica	Los métodos sintéticos deben diseñarse para maximizar la incorporación en el producto final de todos los materiales empleados durante su procesamiento.
3. Síntesis química menos peligrosa	Siempre que sea posible, los métodos sintéticos deben diseñarse para usar y generar sustancias que posean poca o ninguna toxicidad para la salud humana o ambiental.
4. Diseño de sustancias más seguras.	Los productos químicos deben diseñarse a los efectos de su función deseada reduciendo su toxicidad.
5. Solventes y sustancias auxiliares más seguras.	El uso de sustancias auxiliares (solventes, agentes de separación, etc.) debería ser innecesario siempre que sea posible, e inocuos cuando se empleen.
6. Diseño para la eficiencia energética	Los requerimientos energéticos de los procesos químicos deberían reconocerse por su impacto ambiental y económico y deben ser minimizados. Si fuera posible, los métodos sintéticos deberían llevarse a cabo a temperatura ambiente y presión atmosférica.
7. Uso de materiales renovables	Deben emplearse materias primas u otros materiales renovables, siempre que sea técnica y económicamente practicable.
8. Reducción de la derivatización	La derivatización innecesaria (uso de agentes bloqueantes, protección/desprotección de grupos, modificación temporaria de procesos físicos y químicos) debe reducirse o evitarse de ser posible, ya que estos pasos requieren de reactivos adicionales que pueden generar desperdicios
9. Catálisis	Los reactivos catalíticos (lo más selectivos posible) son superiores a los reactivos estequiométricos.
10. Diseño para la degradación	Los productos químicos deben diseñarse de tal forma que al fin de su vida útil se descompongan en productos de degradación inocuos y no persistan en el ambiente
11. Análisis en tiempo real para la prevención de la polución	Las metodologías analíticas necesitan desarrollarse aún más para permitir un monitoreo y control en tiempo real y durante el proceso antes de la formación de sustancias peligrosas.
12. Química segura para la prevención de accidentes.	Las sustancias y la forma de una sustancia empleada en un proceso químico debe elegirse para minimizar el potencial de accidentes químicos, incluyendo escapes, explosiones e incendios.

Tabla 1. Principios de la química verde (Anastas y Warner, 1998)

Dentro de la sociedad científica distintos grupos de investigadores tomaron este desafío, aún antes de la elaboración de este documento. Uno de éstos propuso el término de química verde (QV) (Green Chemistry), que fue definido como *la invención, el diseño y la aplicación de productos y procesos químicos para la eliminación o reducción del uso y generación de sustancias peligrosas* (contaminantes) (Anastas y Warner, 1998). Los términos *invención y diseño* promueven a un activo involucramiento de la comunidad científica en pensar nuevos productos y procesos y no sólo en la optimización de lo existente. El *uso y generación de sustancias peligrosas*, no sólo condiciona a que las sustancias producidas (productos y residuos) no contaminen sino también a que todas las sustancias usadas (reactivos, solventes) sean inocuas. Por último el término *sustancias peligrosas* (en el sentido

de contaminantes) limita el alcance de la QV a los *factores intrínsecos* de las mismas (Tundo y col, 2000). Para completar la definición de los conceptos de la QV se considera el *riesgo* de una sustancia como el producto de su peligrosidad (factores intrínsecos) por el grado de exposición, ésta es constituida por *factores circunstanciales*, los que se encuentran sujetos a regulaciones legales (Poliakoff y col, 2002).

Los principios de la QV fueron sintetizados por Anastas y Warner (1998) en 12 simples enunciados (**Tabla 1**). Estos mismos principios fueron listados usando una original regla mnemotécnica en inglés (**Tabla 2a**) (Tang y col, 2008).

A pesar de los esfuerzos hechos y el gran potencial que existe en este sentido para la QV, los resultados concretos sólo serán efectivos cuando éstos se apliquen a la industria química. En ese sentido, en analogía a los doce principios de la QV también se han elaborado principios para la “Ingeniería Verde” (ver **Tablas 2a y b**) (Tang y col, 2008).

Principles of Green Chemistry	
P	Prevent wastes / <i>Prevenir desechos</i>
R	Renewable materials / <i>Materiales renovables</i>
O	Omit derivatization steps / <i>Prescindir de pasos de derivatización</i>
D	Degradable chemical products / <i>Productos químicos degradables</i>
U	Use safe synthetic methods / <i>Usar métodos sintéticos seguros</i>
C	Catalytic reagents / <i>Catalizadores</i>
T	Temperature, pressure ambient / <i>Temperatura y presión ambientales</i>
I	In-Process Monitoring / <i>Monitoreo en tiempo real</i>
V	Very few auxiliary substances / <i>Muy pocas sustancias auxiliares</i>
E	E-factor, maximize feed in product / <i>Minimizar el factor E</i>
L	Low toxicity of chemical products / <i>Productos químicos de baja toxicidad</i>
Y	Yes it's safe / <i>Sí, es seguro</i>

a

Principles of Green Engineering	
I	Inherently non-hazardous and safe / <i>Esencialmente seguros y no peligrosos</i>
M	Minimize material diversity / <i>Minimizar la diversidad de los materiales</i>
P	Prevention instead the treatment / <i>Prevención en lugar de tratamiento</i>
R	Renewable material and energy inputs / <i>Energía y materiales renovables</i>
O	Output-led design / <i>Producción dirigida por el diseño</i>
V	Very simple / <i>Muy simple</i>
E	Efficient use of mass, energy, space and time / <i>Uso eficiente de la masa, la energía, el espacio y el tiempo</i>
M	Meet the need / <i>Encontrar las necesidades</i>
E	Easy by separate by design / <i>Diseñado para facilitar la separación</i>
N	Networks for exchange of local mass and energy / <i>Redes locales de intercambio de masa y energía</i>
T	Test the life cycle of the design / <i>Evaluar el ciclo de vida del diseño</i>
S	Sustainability throughout product life cycle / <i>Sustentabilidad a lo largo del ciclo de vida del producto</i>

b

Tablas 2a y 2b. Principios de la Química e ingeniería verdes expresados como reglas mnemotécnicas en inglés (Tang y col, 2008).

Para medir el grado de “*enverdecimiento*” la industria química cuenta con algunos parámetros, entre ellos se encuentran la eficiencia atómica (principio 2) y el ampliamente usado factor E publicado por Roger Sheldon en 1992. El factor E es el cociente entre la masa de residuos y la masa de producto obtenidos en un proceso. Siguiendo este parámetro se comprobó que las industrias químicas más contaminantes son las de química fina y la farmacéutica (ver **Tabla 3**). El gran factor E de estas ramas así como la relativamente baja producción convierten a las mencionadas industrias en blancos de las políticas de “*enverdecimiento*” (Sheldon, 2007).

El desarrollo de la QV está en expansión aunque falta mucho para llegar a los niveles necesarios para reducir la contaminación. Una de las principales fallas está en la incorporación de estas nuevas tecnologías a la industria. La incorporación de las mismas puede ser “desventajosa” según la lógica capitalista de máximo lucro, por eso para lograr un desarrollo sustentable se necesitará de una fuerte intervención estatal, en ese marco el aporte de las Universidades Nacionales y del sistema científico nacional tendrá un valor insustituible.

Industria	Producción (ton)	Factor E
Refinado de petróleo	10^6 - 10^8	Aprox 0,1
Productos químicos a granel	10^4 - 10^6	< 1 a 5
Química fina	10^2 - 10^4	5 a 50
Farmacéutica	1 - 10^3	25 a >100

Tabla 3. Factor E y niveles de producción en distintas ramas de la industria química.

3. Biocatálisis

Revisando el potencial rol que puede tener la biotecnología como herramienta para disminuir los niveles de contaminación, es que el presente trabajo se ha enfocado particularmente en la biocatálisis. La biocatálisis aprovecha las enzimas que naturalmente cumplen funciones vitales en los seres vivos para catalizar la obtención de distintos productos orgánicos. Los biocatalizadores pueden ser, por lo tanto, un extracto enzimático más o menos purificado o todo el ámbito natural de las enzimas: células, tejidos u órganos.

Las enzimas son el núcleo de los procesos biocatalíticos, deben ser extraídas y caracterizadas para ser utilizadas en reacciones en ambientes controlados. Las enzimas se pueden encontrar tanto en el interior de las células como en espacios extracelulares, pueden estar en gran abundancia o en cantidades mínimas, pueden estar asociadas a ciertas organelas o membranas o formando complejos enzimáticos o estar libres, pueden estar como proenzimas

o pueden necesitar cofactores. Según el caso se tendrá que encontrar métodos adecuados para poder extraerlas, acondicionarlas y usarlas en biocatálisis.

Por otra parte, el ambiente artificial o medio de reacción (sustratos, medio, temperatura, etc.) donde se usan estos biocatalizadores genera la potencialidad para que utilicen y produzcan sustancias distintas a las naturales, incluso para que actúen usando otros mecanismos catalíticos, ampliando de esa manera su rango de acción.

Los beneficios del uso de enzimas y de otros biocatalizadores, comparado con su contraparte química, están ampliamente descritos en la bibliografía. La biocatálisis tiene especial importancia cuando las sustancias producidas mediante estos procesos no se pueden hacer de otra forma o cuando muestran ventajas económicas y/o ambientales con respecto a métodos de producción exclusivamente químicos. Se pueden evitar las variadas fuentes contaminantes que podemos encontrar en una reacción estequiométrica química tradicional (exceso de reactivos, solventes contaminantes, altas temperaturas y presiones, residuos en abundancia, mezclas racémicas, etc.). Las enzimas tienen altas enantio y regioselectividades, operan bajo condiciones suaves de reacción, por lo que hay un menor gasto de energía, permiten la reducción de los pasos de una síntesis orgánica y la disminución en la producción de desechos, entre otras ventajas (Anastas y Warner, 1998; Guzmán y col, 2007). La incorporación de procesos biocatalizados en la industria, involucra, por lo tanto, a varios de los principios de la QV (**Tabla 1**), especialmente a la catálisis (principio 9), a la eficiencia energética (principio 6) y a la menor derivatización (principio 8). En la industria se pueden, además, combinar pasos biocatalizados con pasos químicos en la síntesis de un compuesto químico determinado.

Existe un interés particular en el empleo de biocatalizadores para crear nuevas rutas que disminuyan el uso de reactivos costosos, así como para obtener moléculas genéricas y/o complejas (Pollard y Woodley, 2007) empleadas en la producción de reactivos químicos, de intermediarios farmacéuticos y agroquímicos, principios activos farmacéuticos e ingredientes alimentarios (Adamczak y Hari Krishna, 2004). Por otro lado, otras oportunidades han aparecido debido a nuevos requerimientos industriales: limitada vigencia de las patentes de los fármacos, rápida elaboración de procesos para compensar los altos costos de desarrollo que deben afrontar las empresas farmacéuticas y la promoción de soluciones ecológicas que dejen rastros mínimos en el medio ambiente (Bruggink, 2001; Woodley, 2008). La convergencia de la biología y la química ha abierto una gran cantidad de oportunidades a las que se puede apuntar, en tanto que los descubrimientos realizados a partir del estudio de la biodiversidad y

los aportes de la biología molecular están extendiendo el espectro de los biocatalizadores disponibles que pueden adaptarse a los requerimientos industriales (Bull y col, 1999).

Se han empleado biocatalizadores en procesos tan diversos como en la producción de compuestos quirales, en la síntesis de polímeros, de péptidos, de antibióticos como la amoxicilina (Sheldon y col., 2001), de edulcorantes como el aspartamo (Shin y col., 2003) de ciclodextrinas; en biorremediación y la lista se sigue ampliando a diario (Morcelle, 2004).

3.1. Uso de enzimas vegetales en procesos biocatalíticos

La utilización de vegetales en este tipo de procesos tiene una larga historia (Cordell y col., 2007), sin embargo en comparación a otras áreas de la biocatálisis, como la del uso de microorganismos, tiene un menor grado de desarrollo, por lo que resulta útil profundizar en su investigación y aplicación. Se han usado como biocatalizadores enzimas y células libres o inmovilizadas, tejidos y hasta órganos (raíces, por ejemplo). Por otra parte, se sabe que en el interior de las células vegetales, se producen enzimas que no pueden encontrarse en otros seres vivos y por lo tanto se espera que catalicen distintas reacciones y formen distintos productos (Giri y col, 2001).

Los biocatalizadores de origen vegetal han resultado muy importantes en algunos casos como en la producción de nuevos fármacos, así como en la modificación de los existentes para mejorar su actividad (Giri y col, 2001).

Las enzimas, en particular, poseen varias ventajas comparativas. a) Las enzimas catalizan una reacción específica o un número limitado y esperable de ellas; las células o tejidos, en cambio, por su complejidad, pueden dar productos diversos. b) Las enzimas pueden usarse en medios que destruirían a los biocatalizadores vivos. c) Tienen una alta eficiencia por masa de biocatalizador. d) Se inmovilizan fácilmente de formas variadas permitiendo su versatilidad y reutilización. A su vez también tienen algunas de desventajas: a) La relativa simpleza de las reacciones en las que se usan. b) No cuentan, en general, con sistemas multienzimáticos ni tienen la presencia de cofactores o sustratos naturales que proveen las células, usualmente muy costosos para agregarlos en el medio de reacción. En este sentido hay algunos estudios hechos que los podrían regenerar sin necesidad de la maquinaria celular (Thayer, 2007). c) Es necesario el paso de extracción y purificación (parcial o completa) que puede encarecer el proceso y puede ocasionar la pérdida de parte de la actividad original.

Muchos tipos diferentes de enzimas de origen vegetal se han empleado en procesos biocatalíticos:

- Las **proteasas** son las enzimas más utilizadas en estos procesos, se describirán en detalle en la próxima sección.

- Las **lipasas**. Aunque las lipasas más conocidas, estudiadas y aplicadas, sin duda, son las de levaduras (*Candida sp*), se pueden encontrar en las lipasas vegetales algunas características diferenciales que las pueden hacer interesantes. Una de las lipasas vegetales con más aplicaciones es la lipasa de *Carica papaya* (CPL) (Domínguez de María y col., 2006). Se la ha utilizado en modificación de grasas y aceites, por ej. en síntesis de triacilglicéridos (TAGs) de bajas calorías, en esterificación y transesterificaciones de distintos TAGs, alcoholes y ácidos grasos. También ha resultado importante en la resolución asimétrica de alcoholes, aminas, etc. tanto por esterificaciones como por hidrólisis estereoselectivas (Domínguez de María y col., 2006).

-Las citocromo p450 **hidroxilasas** vegetales muestran una potencialidad para hidroxilar y oxidar regioselectivamente gran cantidad de sustancias muy diversas. Se las ha aplicado, por ejemplo en la biotransformación del limoneno (Duetz, 2003). Esto no sólo se ha descrito para extractos enzimáticos sino, primariamente, se han usado cultivos celulares y células inmovilizadas (Vanek y col., 1999).

- Las **hidroxinitriloliasas**, que estereoselectivamente unen un ácido cianhídrico sobre un aldehído, han sido usadas para sintetizar cianohidrinas quirales que sirven como precursores sintéticos de varias sustancias. Estas enzimas se han encontrado en almendras amargas (*Prunus amygdalus*), en mijo (*Sorghum bicolor*), en gomero (*Hevea brasiliensis*), en mandioca (*Manihot esculenta*), entre otras plantas. (Giri y col., 2001; Thayer, 2007)

- Otros tipos de enzimas también han sido estudiadas como biocatalizadores, tales como **ciclasas**, que ciclan dienos y epóxidos, fueron encontradas en achicoria (*Cichorium intybus*); **fenoloxidasas**, que catalizan la hidroxilación de monofenoles con regioespecificidad produciendo catecoles, fueron extraídas de cultivos de *Mucuna pruriens*; **haloperoxidasas**, que usan haluros y agua oxigenada para halogenar diversos compuestos orgánicos; **lipooxigenasas**, que incorporan peróxidos sobre dobles enlaces de ácidos grasos, se encontraron en porotos de soja (*Glycine max*). (Giri y col., 2001).

En la mayoría de estos casos las enzimas se han aislado, no del material vegetal directamente, sino de los medios de cultivos de células del vegetal. También hay trabajos que describen el uso de **glicosidasas**, sin embargo es preferible en ese caso el uso de células o tejidos, dada la necesidad de estas enzimas por cofactores.

Además de las nombradas también se han obtenido enzimas para procesos biocatalíticos en especies tan diversas como *Morinda citrifolia* (Mora de la India), *Rubia*

tinctorum, *Hyoscyamus niger* (beleño negro), *Medicago sativa* (alfalfa), *Papaver somniferum* (amapola), *Taxus chinensis* (conífera), *Coleus blumei*, *Digitalis lanata*, *Zea mais* (maíz), etc. (Giri y col., 2001).

Resulta evidente que las plantas en su totalidad tienen la potencialidad de ser fuente de nuevos biocatalizadores. Sería entonces esperable encontrarlos en abundancia en las especies que nos rodean. Eso nos plantea el desafío de buscarlos y utilizarlos.

3.1.1. Fitoproteasas en biocatálisis

Hacia 2002, un análisis de 134 biotransformaciones industriales revelaba que las hidrolasas ocupaban la categoría más prominente (44%) junto a los biocatalizadores redox (30%) (Straathof y col., 2002). Aunque dentro de las hidrolasas, las lipasas son las enzimas más empleadas, las peptidasas ocupan el segundo lugar.

Entre las proteasas más citadas dentro del terreno de la biocatálisis figuran subtilisina, quimotripsina, termolisina, tripsina y papaína. Esto no es casual, ya que son peptidasas muy empleadas en procesos industriales y sus propiedades bioquímicas y fisicoquímicas, así como sus estructuras, son muy conocidas. Por otro lado, están disponibles comercialmente en grandes cantidades y no son costosas. Entre ellas, además de la mencionada papaína, la bromelaina es otra fitoproteasa de importancia en la industria, ambas forman parte de la familia papain-like C1 (Vallés y col., 2007; Rawlings y col., 2010).

En este trabajo se enfoca la búsqueda y caracterización de proteasas vegetales, como biocatalizadores, debido a que estas enzimas pueden mantenerse activas en un amplio rango de temperaturas y pHs. Además poseen características que las capacitan como catalizadores altamente estereoespecíficos y regioespecíficos, capaces de actuar en condiciones suaves con valores de pH óptimo entre 6 y 8, son fáciles de manejar, no necesitan cofactores costosos, son estables, y son relativamente simples en su arquitectura molecular (Bordusa, 2002). Algunas proteasas presentan la característica de permanecer activas en medios no acuosos o en mezclas acuoso-orgánicas. Incluso se ha conseguido que actúen en reacciones reversas, esto es, formando enlaces en lugar de escindirlos. Ejemplos de esto son la formación de enlaces amida o enlaces ésteres entre muy diversos sustratos.

Entre los productos de interés capaces de ser obtenidos mediante síntesis catalizada por proteasas se encuentran péptidos de aplicación en la industria alimentaria como el aspartamo (Oyama, 1987), péptidos saborizantes, surfactantes análogos de lipoaminoácidos y péptidos multifuncionales (con alta eficiencia, buenas propiedades de agregación y amplia

actividad biológica), lo que facilita una formulación simple de los productos finales a los que se incorporan, reduciendo así los costos de producción.

Se han reportado varios trabajos donde se usan proteasas que se obtienen en gran abundancia de distintas partes de plantas como *Carica papaya* (Morcelle, 2004; Giri y col., 2001; Clapés y col., 1995; Morcelle y col., 2006; 2009; Quiroga, 2005), *Asclepias curassavica* (Morcelle y col., 2009; Liggieri, 2005), *Araujia hortorum* (Morcelle y col., 2008; 2009; Quiroga, 2005), *Bromelia hieronymi* (Morcelle y col., 2009), *Funastrum clausum* (Morcelle, 2004; Morcelle y col., 2006, 2009), *Morrenia brachystephana* (Quiroga, 2005; Barberis y col., 2002), *Ananas comosus* (Clapés y col., 1995), *Acacia caven* (Barcia y col., 2008), entre otras. Las proteasas pueden estar presentes en frutos, tallos, látex, semillas e incluso en polen. En muchos de estos casos, se usan simplemente los extractos crudos ya que las enzimas están presentes en gran cantidad y no se han detectado sustancias interferentes en los procesos catalíticos.

Algunas de las reacciones ensayadas han sido: la hidrólisis regioselectiva de ésteres y de uniones peptídicas específicas (Faber, 2000), la síntesis de péptidos y derivados (Morcelle, 2004; Thayer, 2007; Clapés y col., 1995; Morcelle y col., 2006; Quiroga, 2005; Liggieri, 2005; Barberis y col., 2002; Guzmán y col., 2007), la formación de surfactantes derivados de arginina (Morcelle y col., 2009) y la síntesis de peptidilaminoalcoholes (Morcelle y col., 2008).

A pesar de estos avances y a que el mercado de proteasas comerciales incluye muchas enzimas de gran actividad y disponibles a bajo costo, continúa siendo necesario el descubrimiento de nuevas fuentes de proteasas más activas y con especificidades determinadas. Por otro lado, considerando la magnitud de la industria química, se puede considerar que la aplicación de peptidasas en procesos de síntesis a nivel industrial es más una excepción que una regla. La razón de este hecho puede deberse a que las distintas estrategias para abordar el problema están aún en un estadio experimental. No existen protocolos para validar ni escalar los procesos desarrollados y, en cada caso deben optimizarse un gran número de variables (Guzmán y col., 2007).

4. Proteasas en síntesis orgánica

4.1. Generalidades

Existe un gran número de reacciones de síntesis orgánica de relevancia tecnológica que han sido estudiadas empleando biocatalizadores enzimáticos (Faber, 1997; Davis y Boyer,

2001; Koeller y Wong, 2001). Sin embargo, aún existen numerosos obstáculos para que la biocatálisis adquiera un rol preponderante en la industria de síntesis química. Entre ellos, se considera que los biocatalizadores para uso industrial pueden ser muy costosos, difíciles de conseguir, poco estables, en algunos casos requieren cofactores, tienen un rango de acción limitado debido a su gran especificidad y, se consideraba, que sólo actúan en medios acuosos (Bommarius y Riebel, 2004). Algunas de estas afirmaciones resultaron ser falsas y otras se van resolviendo a medida que avanza la investigación en este campo. A continuación, se enumeran las principales respuestas a las objeciones impuestas por la industria química tradicional respecto del uso de biocatalizadores.

Sobre los costos: los precios de las enzimas han bajado en los últimos años, existiendo un número cada vez mayor de proveedores. Los avances en ingeniería genética (Alberghina, 2000) e ingeniería de proteínas (Leisola y Turunen, 2007) y también en la búsqueda de nuevas fuentes enzimáticas (Gomes y Steiner, 2004) están contribuyendo de manera significativa para aumentar el rango de enzimas disponibles y disminuir sus precios.

Sobre la estabilidad enzimática: las enzimas son catalizadores inestables, pero su estabilización es un aspecto al cual se le ha dado especial consideración pudiendo advertirse avances notables, de modo que se cuenta en la actualidad con enzimas suficientemente estables como para actuar eficientemente en las rigurosas condiciones usualmente requeridas para las reacciones de síntesis (Illanes, 1999; Ó Fágáin, 2003).

Sobre los medios de reacción: no es cierto que las enzimas sólo actúen en medios acuosos, numerosos estudios evidencian que las enzimas actúan muy bien en medios no convencionales (Koskinen y Klivanov, 1996; Castro y Knuvobets, 2003; Park y Kazlauskas, 2003; Gupta y Roy, 2004; Halling, 2004).

Sobre la especificidad enzimática: las enzimas, especialmente aquellas que actúan sobre sustratos de peso molecular bajo o medio, tienen por lo general una especificidad amplia y pueden actuar sobre sustratos no naturales. Además pueden ser modificadas estructuralmente para adquirir nuevas funcionalidades mediante mutagénesis sitio-dirigida y evolución dirigida (Boersma y col., 2007).

En este aspecto, merece un párrafo aparte el concepto de *promiscuidad*. La promiscuidad enzimática es una característica de las enzimas relacionada con la evolución y, ocasionalmente, con la biosíntesis de metabolitos secundarios. La promiscuidad catalítica es la capacidad de un sitio activo para catalizar más de una transformación química. Esta transformación puede diferir de la “natural” en el tipo de unión formada o clivada y/o en el mecanismo catalítico (Kazlauskas, 2005). La capacidad de catalizar una reacción de síntesis en lugar de la hidrólisis

por parte de hidrolasas, constituye un ejemplo de esta promiscuidad (Hult y Berglund, 2007).

Se han diferenciado tres tipos de promiscuidad:

- a) de condiciones de reacción: la capacidad de una enzima de actuar en medios distintos al natural (anhidro, altas temperaturas, pH extremos, etc.);
- b) de sustrato: relacionada con la capacidad de aceptar distintos sustratos;
- c) de mecanismo catalítico: que puede ser accidental o inducida (por cambios producidos en la enzima)

La explotación de la promiscuidad catalítica enzimática podría dar lugar a mejoras en los catalizadores existentes y ofrecer nuevas vías de síntesis que no están actualmente disponibles. (Hult y Berglund, 2007).

Sobre el uso de cofactores: los requerimientos de cofactores disociables (coenzimas), característicos de las enzimas cuya función metabólica es la síntesis, pueden representar una limitación (Liu y Wang, 2007). Sin embargo, los avances en ingeniería de medios de reacción permiten utilizar enzimas hidrolíticas, robustas y de bajo costo, en procesos de síntesis mediante reversión de su capacidad hidrolítica (Davis y Boyer, 2001; Illanes, 2008).

Por otra parte, y a pesar de sus limitaciones, las enzimas son catalizadores muy atractivos para síntesis orgánica y se consideran herramientas importantes para el desarrollo de la QV debido a varias ventajas:

- Su uso corresponde a procesos ambientalmente benignos (Bommarius y Riebel, 2004).

- Poseen una elevada selectividad como catalizadores en síntesis orgánica: las enzimas son altamente regio y enantioselectivas, lo que son atributos muy valiosos para la industria farmacéutica y en general para la producción de compuestos bioactivos. Hay un gran interés de la industria farmacéutica para la producción de drogas quirales en forma enantioméricamente pura, lo que no es muy dificultoso mediante síntesis química. Las enzimas son catalizadores quirales que pueden reaccionar a velocidades muy diferentes con los enantiómeros de una mezcla racémica de manera de obtenerse una resolución cinética. Por vía enzimática resulta entonces posible que una elevada proporción de una droga sea producida en la forma enantiomérica requerida (eutómero), evitando los posibles efectos adversos del enantiómero no deseado (distómero) y mejorando el rendimiento del proceso (Pollard y Woodley, 2007). La selectividad tiene un fuerte impacto en la economía del proceso al reducir el número de operaciones de protección y desprotección de grupos requeridas y favorece las operaciones de purificación post-reacción.

- Las enzimas son activas en condiciones ambientales moderadas, lo que representa una ventaja en términos de consumo energético y diseño del reactor, siendo un atributo importante cuando los productos de síntesis son lábiles.

- Las enzimas pueden catalizar reacciones asimétricas muy complejas que son extremadamente difíciles de realizar por síntesis química, como la reacción de Baeyer-Villiger para la oxidación de cetonas o la expansión del anillo de penicilina G a desacetoxicefalosporina C (Cho y col., 1998; Wegman y col. 2001) y diversas hidroxilaciones, epoxidaciones, transaminaciones, reacciones de grupos enolatos, formación de halohidrina, etc. (Pollard y Woodley, 2007).

En estos últimos años se ha podido observar una clara evolución de la biocatálisis enzimática tradicional en medio acuoso, donde tanto sustratos como catalizador se encuentran disueltos, hacia procesos de síntesis orgánica con diferentes tipos de biocatalizadores enzimáticos actuando en medios de reacción no convencionales de naturaleza muy diversa. En el año 2000 se reportaba que existían no menos de 100 procesos de síntesis orgánica catalizados por enzimas en diversos grados de desarrollo industrial, principalmente para la síntesis de fármacos y agroquímicos (Wandrey y col., 2000); para el 2008 se estimaba en alrededor de 150 los procesos biocatalíticos que ya estaban implementados en la industria, la mayoría de ellos en el sector farmacéutico (Woodley, 2008). Puede pronosticarse que nuevos productos de síntesis orgánica por vía enzimática impactarán en el mercado en las próximas décadas en sintonía con el paradigma de desarrollo sustentable.

4.2. Proteasas como biocatalizadores

Como se remarcó previamente es de interés el estudio de la aplicación de las proteasas en química orgánica ya que en numerosos casos se ha encontrado que tienen altas estereo y regioespecificidades, pueden actuar en condiciones moderadas, son robustas, pueden ser extracelulares y no requieren de coenzimas (Bornscheuer y Kazlauskas, 1999). Estas propiedades hacen de las proteasas herramientas útiles para clivajes específicos, hidrólisis regioespecífica de ésteres y resolución de racematos. Sin embargo, la tendencia actual es emplear las proteasas como catalizadores en reacciones de síntesis orgánica, donde el potencial valor agregado es significativamente mayor (Lesney, 2003; García-Junceda y col., 2004). Durante un tiempo esta capacidad fue tratada más como una curiosidad que como una propiedad que pueda usarse para adquirir más conocimientos sobre la función catalítica de las proteasas, o para la síntesis *in vitro* (Kasche, 2001).

Al considerar el uso de enzimas en síntesis, la primera aproximación que podría plantearse es investigar las enzimas que naturalmente realizan esta función. Sin embargo, estas enzimas son proteínas complejas, lábiles, intracelulares y con requerimientos de

cofactores disociables, por lo tanto difícilmente adaptables a las condiciones de las aplicaciones industriales. Su aplicación como catalizadores de procesos implica grandes desafíos tecnológicos: las enzimas deben ser estabilizadas (usualmente mediante inmovilización) y las coenzimas retenidas (por derivatización o co-inmovilización) y reconvertidas (usualmente mediante una reacción enzimática auxiliar) para cerrar el ciclo catalítico (Kragl y col., 1996; Hari Krishna, 2002). En cambio, resulta de mayor potencial tecnológico el uso de hidrolasas en reacciones reversas de síntesis. De este modo, las proteasas pueden catalizar la formación de un enlace peptídico (Bordusa, 2002; Kumar y Bhalla, 2005), las glicosidasas la formación de un enlace glicosídico (Bucke, 1996) y las lipasas las reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación (Hasan y col., 2006; Petkar y col., 2006). Sin embargo, para explotar dicho potencial se requiere, sin embargo, deprimir las reacciones de hidrólisis ya que el producto de síntesis puede a su vez ser simultáneamente hidrolizado por la misma enzima (Bordusa, 2002). Esto puede ser conseguido mediante la ingeniería del medio de reacción empleando sistemas no convencionales (no-acuosos), entre los que pueden mencionarse gases, (Lamare y Legoy, 1993), fluidos supercríticos (Marty y col., 2004), solventes orgánicos (Klibanov, 2001; Ru y col., 2002), líquidos iónicos (Park y Kazlauskas, 2003; Domínguez de María, 2008) y sistemas semi-sólidos (Erbeldinger y col., 1998; Ulijn y col., 2001-2003). Entre ellos, los solventes orgánicos son los de mayor relevancia, siendo la biocatálisis en medio orgánico uno de los temas mayormente investigados en los últimos veinte años (Koskinen y Klibanov, 1996; Lee y Dordick, 2002; Gupta y Roy, 2004).

En la actualidad se han desarrollado numerosas aplicaciones de las proteasas en reacciones de síntesis. La subtilisina, quimotripsina, tripsina, papaína, enzimas ampliamente usadas en la industria como hidrolasas, han sido empleadas en la síntesis enzimática de péptidos (Richards y col., 1993; Ruiz y col., 1997).

Además de la formación de enlaces peptídicos entre aminoácidos, las proteasas pueden catalizar una amplia gama de reacciones de síntesis orgánica. Han sido empleadas en las síntesis de aldehídos peptídicos (Voyushina y col., 1999; Morcelle y col., 2008; Llerena Suster y col., 2009) y en la acilación de una gran variedad de nucleófilos, incluyendo aminoácidos no codificados (Fernández y col., 1995; Krix y col., 1997), aminas, amino alcoholes, diaminas simétricas y asimétricas (Günther y Bordusa, 2000) y dioles meso y proquirales (Broos y col., 1995; Khmelnitsky y col., 1997), así como en reacciones de esterificación y transesterificación de alcoholes y ácidos carboxílicos (Roy y Gupta, 2003, Noritomi y col., 2007). Las proteasas han sido también empleadas en su capacidad hidrolítica en procesos de síntesis orgánica,

como lo ilustra la hidrólisis regioselectiva de ésteres y la resolución cinética de mezclas racémicas (Carrea y Riva, 2000; Keith y col., 2001). Por otra parte, se han usado en la síntesis de glicoconjugados donde catalizan la formación de enlaces peptídicos en glicopéptidos o reacciones selectivas de acilación (Koeller y Wong, 2000; Sears y Wong, 2001).

Por último se debe remarcar que tanto el número como la variedad de aplicaciones de las proteasas en reacciones de síntesis orgánica se podrán ampliar enormemente dependiendo de la búsqueda de nuevas fuentes naturales de enzimas, así como del desarrollo de procesos de ingeniería enzimática para adaptar a las enzimas a las condiciones de reacción. En este aspecto, las peptidasas de origen vegetal no han sido tan exploradas como otras de origen animal o microbiano, por lo que su estudio favorece el enriquecimiento del repertorio catalítico disponible.

4.2.1. Proteasas en síntesis de péptidos

Existen tres estrategias para la síntesis de péptidos:

- Síntesis mediante ADN recombinante: resulta atractiva para la síntesis de proteínas y péptidos de gran tamaño, de esta forma se produce, por ejemplo, insulina y otras hormonas (Walsh, 2000, 2005).
- Síntesis química: más apropiada para péptidos de tamaño medio y bajo, en un rango de cuatro a ochenta residuos aminoácidos (Kimmerlin y Seebach, 2005).
- Síntesis enzimática: limitada por ahora a péptidos de pequeño tamaño, usualmente di o tripéptidos (Kumar y Bhalla, 2005).

Según este esquema las opciones tecnológicas no compiten entre sí en la mayoría de los casos, dados los diferentes tamaños peptídicos. Sin embargo, es deseable investigar y promover el uso de la síntesis enzimática por su menor efecto ambiental.

La síntesis química es la tecnología más adecuada para la producción de péptidos de tamaño medio, que comprenden la mayor parte de los productos de interés terapéutico. La síntesis química de péptidos en fase sólida (SSPS) introducida por Merrifield hace casi cincuenta años (Merrifield, 1963, 1986) ofrece grandes ventajas en cuanto a la validación y automatización del proceso (Andersson y col., 2000; Nilsson y col., 2005) y es en la actualidad el sistema mayormente empleado.

Partiendo de ese método se han desarrollado variantes según el número de residuos. Péptidos de menos de 30 residuos aminoácidos son mayormente producidos por síntesis secuencial (Lloyd-Williams y Giralt, 2000), mientras que los de mayor tamaño, hasta 60

residuos, se producen por síntesis convergente (Barlos y Gatos, 1999) y los de mayor tamaño aún mediante ligazón química (Johnson y col., 2007).

Más de cuarenta péptidos sintetizados químicamente están en el mercado y un número mucho mayor se encuentra en distintas fases del proceso de aprobación por parte de las agencias reguladoras (Guzmán y col., 2007)

La **síntesis enzimática** es una alternativa a la síntesis química en el caso de péptidos de muy pequeño tamaño. En la práctica la síntesis de péptidos en medio orgánico con proteasas sólo ha demostrado eficacia en la síntesis de di y tripéptidos (Kumar y Bhalla, 2005; Hou y col., 2006), siendo escasos los avances mostrados en la síntesis de oligopéptidos (Isono, 2002). Al referirnos a la aplicación en la industria, solamente la producción de aspartamo por vía enzimática representa una tecnología madura, de gran escala e impacto comercial (Schulze y Wubbolts, 1999; Rastall, 2008). Uno de los motivos de esto es que, a diferencia de la síntesis química, no existen protocolos bien establecidos y validados, debiendo ser estudiado cada paso de síntesis en forma particular, definiendo la enzima más adecuada y los medios y condiciones de reacción óptimos (Ruiz y col., 1997; Fité y col., 2002).

La síntesis química de péptidos en fase sólida es hoy la tecnología más madura, existiendo protocolos bien establecidos y automatizables. Sin embargo, la falta de especificidad de las reacciones químicas, la necesidad de proteger y desproteger los grupos funcionales de los aminoácidos, el costo de las materias primas y la generación de residuos ambientalmente agresivos representan restricciones importantes, por lo que prácticas usuales a escala de laboratorio, como el uso de manifiesto exceso de reactantes, no son admisibles a este nivel (Guzmán y col., 2007). Algunas de estas desventajas pueden ser subsanadas mediante el uso de proteasas. Por otra parte muchas de las actuales limitaciones en la síntesis enzimática de péptidos están siendo favorablemente enfrentadas mediante investigación y desarrollo en diversas áreas de la biocatálisis.

A pesar de la aún incipiente aplicación de la síntesis enzimática en la industria, la investigación ha avanzado mucho en los últimos 25 años. En particular, se ha descrito el uso de las proteasas vegetales en la catálisis de distintas reacciones de síntesis peptídicas. Se empleó papaína para sintetizar precursores de edulcorantes como aspartamo (Nakaoka y col., 1998) y alitamo (L-Asp-D-Ala) (Kim y Shin, 2001). Empleando papaína y funastraína depositadas en poliamida empleando solventes orgánicos con baja actividad acuosa se sintetizó el precursor de un péptido amargo, Z-Ala-Phe-OMe (Morcelle y col., 2006). Este mismo dipéptido fue también sintetizado usando araujaína en medios bifásicos (Quiroga y col., 2008). Se sintetizó un derivado de la kiotorfina el Bz-Tyr-Arg-OH empleando papaína

unida a polietilenglicol (PEG) como biocatalizador (Lee y col., 1993). Otros dipéptidos relacionados con la encefalina fueron sintetizados mediante la catálisis ejercida por las cardosinas obtenidas de *Cynara cardunculus* en medios bifásicos (Sarmiento y col., 1998). Un derivado tripeptídico relacionado (Gly-Gly-Phe-NH₂) fue sintetizado en un solo paso a partir de Gly-Gly-OEt y Phe-NH₂ en buffer fosfatos de pH 6,5 empleando etilenglicol como cosolvente y papaína como catalizador (Lozano y col., 1992).

La síntesis de oligopéptidos más largos mediada por catálisis enzimática es más compleja y requiere de más etapas. Se logró la síntesis enzimática completa de derivados aminoácidos de encefalina empleando distintas combinaciones de enzimas, medios de reacción y sustratos (Clapés y col., 1995; Klein y Cerovsky, 1996); tanto papaína como bromelaína resultaron ser catalizadores muy útiles en los distintos pasos de la síntesis completa. El octapéptido CCK-8, que es el mínimo fragmento activo de la hormona peptídica colecistoquinina, fue sintetizado mediante un proceso enzimático en batch de acuerdo a una estrategia convergente usando, entre otros, papaína inmovilizada en celite como biocatalizador (Fité y col., 2002).

Por otra parte, ha resultado de interés la aplicación de proteasas en la obtención de poliaminoácidos. Los poliaminoácidos son materiales poliméricos biodegradables con aplicación en medicina y cosmética. Los clorhidratos de los ésteres de Met, Phe, Thr y Tyr fueron polimerizados en buffer acuoso por acción de papaína, resultando en poli (α -aminoácidos) insolubles en agua y en la mayor parte de los solventes orgánicos. Bromelaína también fue un biocatalizador muy eficiente en la polimerización de Glu (Uyama y col., 2002). La síntesis de este polímero fue ensayada en distintas condiciones empleando papaína (Liu y col., 2006; Narai-Kanayama y col., 2008). La aparición de esta clase de polímeros insolubles ha sido observada también mediante la acción de papaína y funastraína en solventes orgánicos sobre Phe-OMe (Morcelle y col., 2006).

Se prevé que la aplicación de las peptidasas en la síntesis enzimática de péptidos tendrá un sitio de relevancia en las próximas décadas, siendo la combinación de procedimientos químicos y enzimáticos la estrategia más adecuada, dado que las mejores características de cada tecnología pueden aplicarse sinérgicamente (Guzmán y col., 2007), tal como ha sido demostrado en la síntesis del tripéptido RGD amida (Hou y col., 2006) y en la unión enzimática de péptidos y fragmentos proteicos en medios con líquidos iónicos (Wehofsky y col., 2008). Los avances en este sentido continuarán para satisfacer la promesa

ofrecida por la aplicación de la biocatálisis en la industria química, farmacéutica, agroquímica y alimentaria.

4.2.2. Otras aplicaciones de las proteasas en síntesis orgánica

4.2.2.1. Síntesis de isómeros peptídicos

Las proteasas, en general, son enzimas con promiscuidad en cuanto a su especificidad de sustrato. Esta característica permite que sean capaces de incorporar en los productos de síntesis aminoácidos no proteinogénicos, produciendo entonces isómeros peptídicos. La síntesis de este tipo de compuestos resulta una interesante aplicación ya que los oligopéptidos producidos podrían tener propiedades funcionales o estructurales distintas a las de los oligopéptidos sólo formados por aminoácidos naturales, de manera que resulten mejores para aplicaciones determinadas. Las matrices de estos péptidos podrían tener una aplicación potencial como materiales biocompatibles o biodegradables, o bien podrían simular proteínas estructurales tales como el colágeno o la seda (Fernández y col., 1995). Asimismo, estos compuestos son interesantes debido a la posibilidad de que posean actividad farmacológica, ya que pueden ser derivados peptídicos proteolíticamente estables o inhibidores de proteasas (Günther y col., 2000).

La utilidad de las proteasas para la síntesis de isómeros peptídicos está basada fundamentalmente en la flexibilidad de algunas de estas enzimas tanto para acilar nucleófilos como para emplear dadores de acilo distintos a los aminoácidos codificados. No obstante, los rendimientos decaen con el aumento en el grado de modificación de la cadena aminoacídica y de la estructura del esqueleto. Por lo tanto, solamente el acoplamiento de dadores de acilo relacionados cercanamente con los residuos de los aminoácidos preferidos tiene relevancia práctica. En general, y aunque los rendimientos sean bajos, es interesante destacar que en la formación de isómeros peptídicos todas las reacciones de síntesis ocurren casi irreversiblemente sin ninguna hidrólisis secundaria del producto formado (Bordusa, 2002).

Revisando el uso de proteasas en la síntesis de este tipo de compuestos se encontró que papaína fue capaz de sintetizar distintos derivados amida de Z-aminoacil-antipirina (Lang y col., 2007). También ha sido empleada en la condensación de derivados aminoacídicos con alquilaminas (Clapés y col., 1999; Piera y col., 2000) para obtener surfactantes del tipo de los lipoaminoácidos/péptidos que mimetizan a los compuestos análogos de origen natural y que poseen, además, actividad antimicrobiana (Clapés y Infante, 2002). Dada la simplicidad de su estructura, estos compuestos demuestran baja toxicidad y rápida biodegradación (Morán y

col., 2004). En este sentido, araujaína y funastraína demostraron tener rendimientos en síntesis de derivados Arg-alquilamida similares o superiores al de papaína, en tanto que bromelaína y hieronymaína no tuvieron el mismo comportamiento en medios con bajo contenido acuoso (Morcelle y col., 2009). Por otra parte, papaína y araujaína fueron ensayadas como catalizadores en la condensación de Z-Ala con glicinol para lograr la formación de peptidil aminoalcoholes (Morcelle y col., 2008). Estos derivados son intermediarios claves en la obtención de péptidos isostéricos y peptidoaldehídos que tienen importancia como inhibidores de proteasas involucradas en procesos patológicos (Potetinova y col., 1997; Voyushina y col., 1999).

4.2.2.2. Esterificación y transesterificación

Las enzimas de elección para este tipo de procesos son esterasas, en particular lipasas (Carrea y Riva, 2000), ya que ambas tienen una preferencia amplia por distintos sustratos a diferencia de las proteasas que, debido a su especificidad de sustrato, tienen una limitada utilidad sintética al acoplamiento de aceptores de acilo muy diferentes a los restos aminoacídicos preferidos. Sin embargo, la esterificación y transesterificación mediada por proteasas es empleada, fundamentalmente, en la resolución de ácidos carboxílicos y, en algunos casos, alcoholes racémicos y para acilar estereoselectivamente dioles proquirales y meso. La acilación selectiva de carbohidratos o compuestos relacionados es el mayor campo de aplicación en este aspecto. Un ejemplo es la acilación enzimática en dos pasos del paclitaxel a través de la transesterificación selectiva para mejorar la escasa solubilidad en agua de este poderoso agente antimitótico (Khmelnitsky y col., 1997).

En este sentido, también se ha comprobado la capacidad de papaína para esterificar distintos derivados de aminoácidos con glicerol (Mitin y col., 1997), se obtuvieron así, surfactantes del tipo aminoacil glicerol que se asemejan estructuralmente a los monoésteres de glicerol con ácido láctico, cítrico, tartárico, etc., empleados como emulsificantes alimentarios. Morán y colaboradores (2001) emplearon papaína y bromelaína depositadas en celite o poliamida, en el mismo tipo de reacciones, tanto bajo control termodinámico como cinético.

4.2.2.3. Síntesis de glicoconjugados

En general, las acilaciones de azúcares mediadas por hidrolasas son llevadas a cabo a través de transesterificación enzimática de un componente con un éster de acilo apropiado. El proceso requiere de solventes orgánicos para que los únicos nucleófilos presentes en el medio sean los azúcares. Pero los azúcares sólo son solubles en muy pocos solventes orgánicos, tales

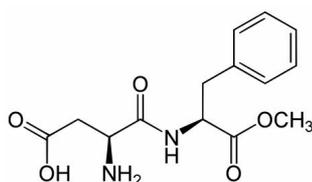
como piridina y N,N-dimetilformamida (DMF); en estos medios, las lipasas son inactivas catalíticamente. La subtilisina, en cambio, comenzó a emplearse como catalizador potencial debido a su alta estabilidad en esos dos solventes (Riva y col., 1988). Lauril-sacarosa fue sintetizada usando una proteasa alcalina en mezclas DMF con dimetilsulfóxido (DMSO) y piridina (Pedersen y col., 2003). Por otra parte, se han usado proteasas en la formación de enlaces peptídicos en glicopéptidos o reacciones selectivas de acilación (Koeller y Wong, 2000; Sears y Wong, 2001); también se han empleado en la síntesis de glicoproteínas en una estrategia combinada de condensación de glicopéptido y glicosilación (Witte y col., 1997).

4.2.2.4. Resolución cinética

En general, la resolución de enantiómeros a través de catálisis proteásica puede conseguirse debido al amplio espectro de reacciones que pueden mediarse por estas enzimas: hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos o amidas, esterificación, transesterificación y formación de enlaces amida. Sin embargo, la especificidad restringida por sustrato limita la utilidad sintética de las proteasas a la resolución de compuestos racémicos cercanamente relacionados a los residuos aminoácidos por los que presentan mayor afinidad, en tanto que la resolución de derivados no aminoácidos es dominio de esterasas y lipasas. Una de las principales aplicaciones de las proteasas para la resolución de aminoácidos racémicos es la hidrólisis enantioselectiva de sus ésteres. Las proteasas más utilizadas en este tipo de aplicación son la subtilisina, quimotripsina y la proteasa de *Aspergillus oryzae*, debido a su amplia especificidad. Estas tres proteasas catalizan la hidrólisis de los derivados éster de L-aminoácidos dejando los D-aminoácidos inalterados. Las proteasas reaccionan más rápidamente con el enantiómero S de las aminas en las cuales el átomo de carbono quiral es adyacente al residuo amino reactivo. Este descubrimiento clásico, observado originalmente para la hidrólisis y la síntesis de péptidos (Kullman, 1987), ha ganado alguna importancia industrial, como en el caso de la producción masiva del edulcorante artificial aspartamo, según se ha visto ya en la sección 4.2.1

Caso del aspartamo:

Como se mencionó, uno de los ejemplos más conocidos de aplicación industrial es la síntesis del dipéptido aspartamo catalizado por termolisina inmovilizada, que en la actualidad se transformó en el líder de los edulcorantes no calóricos a nivel mundial. El aspartamo (éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina, L-Asp-L-PheOMe) es un edulcorante peptídico de bajas calorías (aproximadamente 200 veces más dulce que la sacarosa), y es empleado corrientemente en alimentos y bebidas en más de noventa países. Se sintetiza a partir de L-Asp y L-PheOMe tanto química como enzimáticamente a nivel industrial (Shin y col., 2003). La vía enzimática es más sencilla



(Nakanishi y Matsuno, 1988), debido a que por vía química sería necesario proteger el grupo carboxilo β del Asp así como su grupo amino (Oyama, 1987), lo que resulta en un costo elevado y un rendimiento bajo. Con el proceso enzimático es posible usar la mezcla racémica de aminoácidos, que hace el proceso mucho más barato. La enzima selecciona el isómero L- del Asp. Si se usan iguales proporciones de *N*-Cbz-Asp-OH y PheOMe, la mezcla en equilibrio produce sólo bajos rendimientos de producto. Si se usa una relación 2:1 de PheOMe a *N*-Cbz-Asp-OH se forma un aducto insoluble formado por el producto y la PheOMe extra, el que precipita aumentando el rendimiento. Si se usa la mezcla racémica, la L-PheOMe es empleada selectivamente en la reacción de síntesis y la D-PheOMe es la que forma el aducto. Mediante un cambio en el pH del medio, el aducto se rompe liberando el aspartamo.

4.3. Mecanismos de las proteasas en reacciones reversas

Como catalizadores, las proteasas alteran la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio termodinámico de la reacción, sin cambiar el equilibrio en sí. Esto implica inevitablemente que estas enzimas trabajen reversiblemente en ambas direcciones de la reacción. Las constantes de equilibrio para la reacción inversa, no obstante, están en el rango de 10^{-3} a 10^{-4} l/mol. En condiciones fisiológicas, la posición del equilibrio de la reacción está en la dirección de la hidrólisis, en tanto que la reacción inversa parecería ser insignificante *in vivo*. En consecuencia, el uso de las proteasas para catalizar la reacción inversa de la hidrólisis necesita esencialmente de manipulaciones para desplazar el equilibrio de la reacción. En la práctica, se consideran dos estrategias básicas sintéticamente útiles (**Figuras 4 y 5**):

- control termodinámico,
- control cinético.

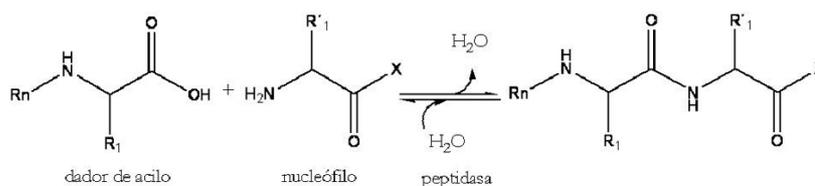


Figura 4. Síntesis bajo control termodinámico

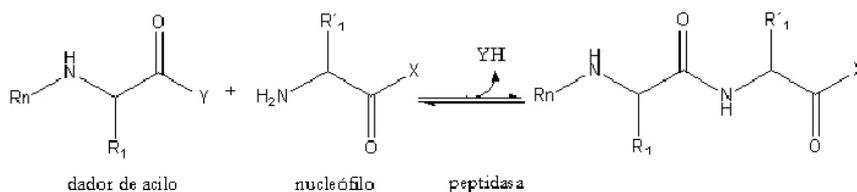


Figura 5. Síntesis bajo control cinético

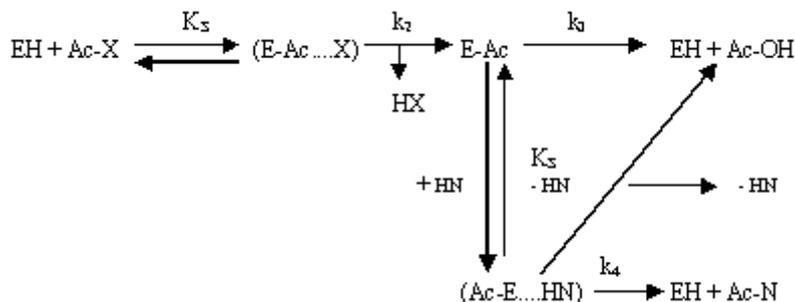


Figura 6. Modelo de síntesis bajo control cinético catalizada por peptidasas cisteínicas y serínicas

El **control termodinámico** representa la reacción inversa de la proteólisis. Las ventajas de este método son la posibilidad de usar la función carboxilato libre como dador de acilo y la posibilidad de aplicarse a cualquier proteasa, independientemente de su mecanismo catalítico. Las desventajas son las bajas velocidades, el alto requerimiento de enzima y la necesidad de manipular la reacción para desplazar la posición del equilibrio hacia la síntesis. En última instancia, se trata de manipulaciones que influyen sobre el equilibrio de ionización. Esto se debe a que la barrera termodinámica para revertir la hidrólisis está predominantemente determinada por la energía requerida para la transferencia de un protón desde el grupo reactivo del nucleófilo al carboxilato negativamente cargado del dador de acilo por el agregado de solventes orgánicos que disminuyen la constante dieléctrica del medio, reduciendo la acidez del carboxilato del dador de acilo y provocando el aumento de la constante de equilibrio para la transferencia de este protón (K_{ion}), promoviendo así la reacción inversa. Además, las condiciones de la reacción que conducen a la precipitación del producto o extracción del mismo también aumentan la eficiencia de la reacción reversa.

Contrariamente, la **síntesis bajo control cinético** sólo ocurre exitosamente con proteasas serínicas y cisteínicas, que forman intermediarios reactivos acil-enzima durante la catálisis. El uso de grupos acilo levemente activados, tales como ésteres o amidas activadas, como *dadores* que aceleren significativamente la velocidad de la reacción y minimicen el requerimiento de enzima, son algunas de las características de este método. En principio, esos dadores de acilo se unen a la proteasa formando un complejo tetraédrico enzima-sustrato, llevando a un intermediario E-Ac (**Figura 6**) (Morcelle, 2004).

Los grupos carboxilato activados son esenciales para esta aplicación, en tanto que los carboxilatos libres usualmente no reaccionan con la enzima bajo condiciones cinéticamente controladas. El valor del método cinético para síntesis orgánica está basado en el hecho de que

el intermediario E-Ac puede ser interceptado no solamente por agua, sino también por nucleófilos alternativos (NH) tales como aminas, alcoholes y tioles, los que compiten con el agua para la deacilación. En este contexto, control cinético quiere decir que el producto que aparece con la mayor velocidad y desaparece con mínima velocidad debería acumularse. En tanto que la síntesis por control termodinámico llega a un equilibrio verdadero, en el método cinético solamente se está formando un producto intermedio que llega a un máximo antes de que la hidrólisis más lenta del producto comience a ser importante. Entonces, el producto será hidrolizado si la reacción no se acaba después de que el dador de acilo se consuma y se establezca así el verdadero equilibrio. Las proteasas que pueden actuar en este modo cinético pueden verse como reactivos suaves y selectivos capaces de activar un grupo ácido carboxílico esterificado genérico o grupo amida y transferirlo a un amplio número de nucleófilos. El éxito de las síntesis depende de muchos factores, en tanto que los parámetros fundamentales de reacción, como temperatura, fuerza iónica, concentración de reactivos y pH juegan un papel importante. Como regla general, se puede considerar que un aumento en la concentración del nucleófilo (NH) y el pH también aumentan el rendimiento en producto. La razón es que ambas manipulaciones aumentan la eficiencia del ataque nucleofílico en el intermediario acil-enzima por el aceptor de acilo (NH) en tanto que el último resulta del hecho de que solo la forma básica libre del nucleófilo puede reaccionar con la enzima acilada. Así, el pH de la mezcla de la reacción debería ser preferiblemente más alto que el pK del nucleófilo. Por último, la enzima por sí misma afecta significativamente la eficiencia de la síntesis. En tanto que la velocidad de reacción está determinada principalmente por la especificidad de la enzima hacia el dador de acilo, es crucial la unión específica del nucleófilo al subsitio S' de la proteasa para obtener altos rendimientos. Ya que la especificidad de unión del dominio al dador de acilo y al aceptor son parámetros individuales de cada enzima, la eficiencia de síntesis y la utilidad sintética de las proteasas para la síntesis orgánica difiere de una enzima a otra (Bordusa, 2002).

5. Ingeniería de medios y enzimática

Para superar las variadas desventajas que surgen del uso de proteasas como biocatalizadores (ver recuadro) se han impulsado numerosas investigaciones en torno a la ingeniería de los medios de reacción, de las enzimas e, incluso, de los sustratos empleados.

Algunos problemas en el uso de proteasas como biocatalizadores

(Morcelle, 2004)

i) Formación de al menos dos productos de síntesis, es decir, el deseado y el dador de acilo hidrolizado, basado en la deacilación competitiva de la enzima acilada por el agua.

ii) Las especificidades y selectividades de las proteasas disponibles limitan seriamente su aplicación sintética y no permiten lograr el producto deseado. Consecuentemente, solo tendrán relevancia práctica las reacciones con compuestos muy relacionados con los aminoácidos por los que demuestren mayor preferencia, en tanto que aminoácidos no proteicos no serán usualmente sustratos aceptables para las proteasas.

iii) Riesgo de proteólisis colateral.

iv) La actividad y estabilidad enzimática pueden verse fuertemente afectadas por solventes, aditivos y las condiciones de reacción (pH y temperatura, por ejemplo).

5.1. Ingeniería de medios

Este término se refiere a la posibilidad de influenciar las propiedades de la enzima alterando la naturaleza del solvente en donde la reacción se lleva a cabo (Wescott y Klibanov, 1994). En este trabajo, en particular, se trata de la manipulación racional del medio de reacción para forzar la enzima a que catalice la reacción de síntesis (Guzmán y col., 2007). Se ha aplicado históricamente al comportamiento de las proteasas en solventes orgánicos, pudiendo actuar como cosolventes o como solventes puros. Sin embargo, se incluye también a reacciones en medios acuosos congelados, en soluciones orgánicas congeladas o sobreenfriadas, en fluidos supercríticos, líquidos iónicos y sistemas de reacción sólidos (Bordusa, 2002).

5.1.1. Solventes orgánicos

A pesar de que a primera vista estaría enfrentado con la QV, existen muchas e interesantes ventajas potenciales, en el hecho de llevar a cabo reacciones biocatalíticas en mezclas de solventes acuoso-orgánicas o en solventes orgánicos puros (Laane y col., 1987):

(i) la alta solubilidad relativa de muchos compuestos en solventes orgánicos;

(ii) la habilidad de revertir reacciones hidrolíticas, convirtiéndolas a sintéticas en medios no acuosos;

(iii) la posibilidad de disminuir reacciones secundarias indeseables en medios orgánicos, tales como la hidrólisis enzimática del producto, así como la inhibición por sustrato y/o producto;

(iv) la relativa facilidad en recobrar el producto y el biocatalizador de sistemas que contengan una fase orgánica.

La reducción de la actividad hidrolítica es lo que está directamente relacionado con la disminución de la actividad acuosa debido a la presencia del solvente orgánico. Se supone que el intercambio de agua por el solvente orgánico inerte disminuye la concentración y actividad del agua, reduciendo así la velocidad de las reacciones competitivas de hidrólisis (Morcelle, 2004).

Por otro lado, la presencia de un solvente orgánico puede provocar alteraciones estructurales significativas en la molécula enzimática y, como consecuencia de ello, en sus propiedades catalíticas (Barberis y Illanes, 1996; Quiroga y col., 2007). En solventes orgánicos anhidros, las enzimas son considerablemente menos activas pero a la vez pueden ser mucho más estables que en medio acuoso, su selectividad (enantio, regio y quimioselectividad) puede variar significativamente y suelen exhibir el fenómeno conocido como memoria de pH respondiendo en su funcionalidad al valor de pH del medio desde el cual fueron precipitadas o liofilizadas (Xu y Klivanov, 1996; Klivanov, 2001). La biocatálisis en medio orgánico puede realizarse en fase homogénea, si el solvente es miscible con el agua (Castro y Knubovets, 2003) o en fase heterogénea, cuando el solvente es inmisible con el agua y ésta constituye una segunda fase que puede o no ser perceptible (Krieger y col., 2004). Tanto en los sistemas homogéneos como heterogéneos la enzima puede encontrarse disuelta o insoluble en el medio de reacción, ya sea porque la proteína enzimática como tal es insoluble en dicho medio o porque se encuentra inmovilizada en un soporte sólido (Guzmán y col., 2007).

Memoria de pH:

El estado de ionización de las enzimas es el parámetro más crucial que controla la unión del sustrato, la actividad catalítica y la estructura tridimensional de la molécula enzimática. En medio acuoso esto está reflejado en el perfil de pH de la actividad enzimática, en tanto que el efecto de la *memoria del pH* indica una influencia similar del estado de protonación de las enzimas en su actividad catalítica en solventes orgánicos. A pesar de que el pH no tiene sentido en los medios orgánicos, el estado de protonación de las enzimas puede controlarse por el agregado de sales amortiguadoras, consistentes en un ácido y su base conjugada. De hecho, dos tipos de buffers activadores de enzimas son conocidos: i) buffers solubles en fase orgánica, los que representan una mezcla de ácido de Brønsted-Lowry y su base conjugada tales como triisocetilamina/clorhidrato de triisocetilamina, e ii) los llamados buffers de estado sólido tales como Lys/Lys.HCl o Arg/Arg.HCl (Zacharis y col., 1997). Mientras que los últimos son insolubles en los solventes orgánicos, los buffers de fase orgánica son compuestos tan hidrofóbicos que aún sus pares iónicos salinos son solubles en solventes orgánicos polares. Los

contraiones de ambos sistemas buffer, mediados por la baja constante dieléctrica de los solventes orgánicos, están cercanamente asociados a la enzima controlando su estado de protonación en medios orgánicos. Los ácidos fuertes (y por lo tanto, bases débiles) produjeron generalmente un efecto menos activador que los ácidos más débiles (Xu y Klivanov, 1996). Para buffers de estado sólido se halló una correlación similar (Harper y col., 2000). Una ventaja adicional de los buffers de estado sólido sobre los buffers de fase orgánica es su insensibilidad hacia las alteraciones del solvente orgánico (Zacharis y col., 1997).

5.1.1.1. Los sistemas homogéneos

Están conformados por agua y un solvente miscible (co-solvente) en proporciones variables. En este caso el agua es un componente mayoritario del medio de reacción, no obstante el cosolvente puede provocar una severa disminución de la actividad de agua, favoreciendo el potencial de síntesis por sobre el potencial hidrolítico (Illanes y col., 2004). Las razones moleculares de este comportamiento serían la disminución de la flexibilidad de la enzima y su menor estabilidad mediada por el efecto desnaturizante de los solventes orgánicos. Sin embargo, este efecto se ve acompañado por otros que influyen sobre la actividad, estabilidad, especificidad de sustrato y enantioselectividad de la enzima. Los cosolventes pueden provocar una considerable desactivación de la enzima al penetrar al microambiente acuoso que rodea la enzima y alterar el patrón de interacciones que estabilizan la estructura tridimensional de la proteína (Levitsky y col., 1999), de igual manera desestabiliza el estado de transición en aquellas con estados de transición altamente polares (Serdakowski y Dordick, 2007). Sin embargo, no existe una regla general para predecir cambios en la actividad/estabilidad de las enzimas.

En cuanto a fitoproteasas en estos medios se halló que la actividad de papaína disminuye en presencia de concentraciones mayores al 60% de algunos solventes miscibles. Por dicroísmo circular se vio que con 90% de tetrahidrofurano y 1,4-dioxano la peptidasa pierde la estructura, aunque con 90% de etanol y de acetonitrilo experimenta un aumento en la conformación de hélice α con pequeños cambios en la estructura terciaria (Szabó y col., 2006). Mediante estudios de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se vio que araujaína hI, una de las peptidasas del extracto proteolítico de látex de *A. hortorum*, aumentaba la proporción de hélice α en tanto que disminuía la de hoja β en presencia de 50% de DMF, lo que indicaría una estructura más flexible y más activa de la proteína (Quiroga y col., 2007). Es usual que las enzimas se empleen en forma inmovilizada en este tipo de medios para aminorar el efecto desactivante (Castro, 1999).

5.1.1.2. Los sistemas macroheterogéneos o bifásicos

Están compuestos por agua, donde se aloja el biocatalizador, y un solvente hidrofóbico, donde los sustratos se encuentran disueltos, ocurriendo la reacción en la fase acuosa luego de la partición del sustrato desde la fase orgánica; la partición del producto hacia la fase orgánica puede ser beneficiosa para reducir los efectos de inhibición y la hidrólisis del producto (Barberis y col., 2002; Bordusa 2002). El principal inconveniente de los sistemas bifásicos es la presencia de una interfase que, además de imponer limitaciones a la transferencia de masa, favorece la desactivación enzimática (Barros y col., 1998). La reacción es promovida por la extracción del producto en la fase orgánica, previniendo así la hidrólisis secundaria del producto en la síntesis controlada termodinámicamente. Entre las muchas desventajas, la principal es la limitación en la aproximación de productos hidrofóbicos con baja solubilidad en agua. Mediante una agitación intensa se puede aumentar la velocidad de transferencia de masa a través de la interfase, pero también se acelera la desnaturalización de la enzima y su inactivación debida a la tensión interfacial (Khmelnitsky y col., 1988). Un área interfacial grande entre el agua y solventes orgánicos acelera la inactivación; este defecto queda salvado por el uso de surfactantes (Tween 80).

5.1.1.3. Los sistemas microheterogéneos

En este tipo de sistemas la enzima se encuentra hidratada y suspendida en un medio orgánico hidrofóbico, han sido los más estudiados por su simplicidad y por el hecho de que, si bien la actividad expresada por la enzima es baja (Klibanov, 1997) las actividades catalíticas son generalmente mucho más bajas en solventes orgánicos puros que en agua o que en mezclas orgánico-acuosas (Bordusa, 2002). El agua ligada fuertemente a la enzima la protege del solvente hidrofóbico, siendo usual que la estabilidad de la enzima sea sensiblemente superior a la exhibida en agua debido a un efecto de rigidización configuracional (Klibanov, 2001). Sin embargo, los solventes no polares permiten una actividad catalítica más alta que los solventes polares, ya que estos últimos son capaces de penetrar en la estructura tridimensional de la enzima (Serdakowski y Dordick, 2007) y sustituir las moléculas de agua del sitio activo (Yang y col., 2004). La inactivación de las enzimas por los solventes no polares puede deberse a la unión de éstos a la enzima o por alteración del entorno acuoso de la misma. Por otro lado, los cambios en la solvatación de los sustratos y productos de la reacción influyen en la especificidad de los biocatalizadores (Halling, 1994). El biocatalizador es en este caso simplemente un precipitado o liofilizado enzimático que es completamente insoluble en el medio de reacción, siendo muchas veces innecesaria la inmovilización a un soporte. Los

solventes más hidrófobos (con valores de log P mayores de 4) son los más adecuados por cuanto son los mayormente excluidos de la capa acuosa que protege a la enzima. La actividad de agua de la enzima es una variable crítica en este tipo de sistemas, existiendo un valor óptimo para la expresión de la actividad enzimática, que puede variar bastante de una enzima a otra (Halling, 2004).

5.1.1.4. Los sistemas ternarios bifásicos

Son mezclas que contienen mayoritariamente solventes no miscibles con el agua con pequeñas cantidades de soluciones acuosas de surfactantes, como el aerosol bis 2-(etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) (Jorba y col., 1995; Sergeeva y col., 1997). Este sistema, consistente en micelas reversas, puede considerarse también como microheterogéneo (Guzmán y col., 2007). En las cavidades acuosas microscópicas pueden solubilizarse enzimas activas (Jorba y col., 1995). Las proteasas atrapadas en las micelas reversas usualmente exhiben una actividad muy alta denominada *superactividad* (Martinek, 1989), debido a que no hay inactivación en el solvente orgánico y permite la síntesis tanto de péptidos hidrofóbicos como la de los hidrofílicos. Sin embargo, no existen aún métodos racionales para optimizar estos sistemas y además, la presencia de surfactantes en el sistema de reacción vuelve engorrosa la separación y purificación de los productos (Bordusa, 2002; Guzmán y col., 2007).

Una alternativa a este sistema consiste en una emulsión agua en aceite (w/o) con alto contenido en agua (90%). Rendimientos altos en el dipéptido Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂ fueron obtenidos empleando α -quimotripsina como catalizador en este medio (Clapés y col., 2001). Debido a la presencia de surfactantes del tipo del polioxietileno, la enzima exhibió el fenómeno de superactividad. Las emulsiones de geles (W/O) son sistemas coloidales líquido-líquido con concentraciones bajas de aceite y surfactante (<5%) y grandes cantidades de agua (>95%), una composición opuesta exactamente a la de los sistemas micelares. La arquitectura de estas emulsiones consiste en gotas de agua estrechamente empacadas con un radio típico de unos pocos micrones, separadas por una delgada película de fase continua. Las emulsiones de gel W/O pueden solubilizar grandes cantidades de compuestos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Estos sistemas son atractivos desde el punto de vista ambiental, dadas las grandes cantidades de agua presente en el sistema y la separación y purificación de los productos es simple. No obstante, la aplicación de los mismos, está en sus primeras etapas (Guzmán y col., 2007). Z-Arg-Gly y Z-Gly-Asp fueron sintetizados en micelas reversas de AOT/isooctano por control cinético usando quimotripsina (Chen y col., 1999).

5.1.2. Otros medios

Otros medios a tener en cuenta serían líquidos iónicos, fluidos supercríticos, medios acuosos congelados, soluciones orgánicas superenfriadas o conversiones sólido-sólido. El término *no convencional* para estos medios fue elegido debido a que su aplicación en síntesis aún es más una excepción que una rutina.

5.1.2.1. Líquidos iónicos

Los **líquidos iónicos** son fluidos constituidos exclusivamente por iones de sales particulares y poseen una temperatura de fusión por debajo del punto de ebullición del agua (100 °C). La mayoría tiene una estructura compuesta por un catión orgánico y un anión inorgánico poliatómico, estos iones son muy asimétricos y voluminosos, por lo que presenta fuerzas atractivas más débiles que las sales iónicas convencionales. Se caracterizan por tener una volatilidad prácticamente nula, con una presión de vapor casi cero ya que están compuestos completamente de iones; inflamabilidad despreciable; una alta estabilidad térmica y un bajo punto de fusión, y una miscibilidad controlada con los compuestos orgánicos. Por todas estas características constituyen un medio ideal para una variedad de síntesis orgánicas (Yang y Pan, 2005; Domínguez de María, 2008; Gorke y col., 2010). Numerosos estudios comprobaron que distintas enzimas, entre ellas proteasas, conservan su actividad sumergidas en estos medios (Noritomi y col., 2009; Malhotra y col., 2010, Lou y col, 2006). En este sentido, los líquidos iónicos son una alternativa prometedora y “verde” a los solventes orgánicos usados en biocatálisis. Recientemente se han podido llevar a cabo reacciones de transesterificación y de síntesis de péptidos biocatalizadas en este tipo de medios (Miao y Chan, 2005; Plaquet y col., 2008). Se logró sintetizar aspartamo usando termolisina en BMIM•PF₆ (Erbeldinger y col., 2008) y el tripéptido Z-Tyr-Gly-Gly-OEt usando quimotripsina en MOEMIM•PF₆ (Xing y col., 2007), entre otros ejemplos.

5.1.2.2. Fluidos supercríticos

Los **fluidos supercríticos** son materiales por encima de su temperatura y presión críticas y pueden considerarse de manera más general como gases comprimidos. Así, aquellas reacciones que están limitadas por velocidades de transferencia de masas se benefician por las difusividades y viscosidades bajas similares a la de los gases, y transcurren más rápido en estos sistemas que en solventes orgánicos clásicos (Kamat y col., 1992). La mayor ventaja de estos sistemas es que a través de un simple cambio de temperatura o de presión se pueden

manipular sus propiedades, por ejemplo, cambiando la presión se cambia la densidad (con lo que la constante dieléctrica, la solubilidad y el coeficiente de partición cambian drásticamente) (Kamat y col., 1993). Esto permite controlar la reacción biocatalítica (parámetros tales como la actividad y la selectividad) (Chaudhary y col., 1996). La naturaleza del fluido supercrítico también influye el comportamiento enzimático: etano, propano o fluoruroformo comprimidos exhiben muy buenas características y son la mejor elección para la biocatálisis (Fontes y col., 2001). Sin embargo, a pesar de que la utilidad práctica de los sistemas de fluidos supercríticos está más allá de toda duda y ofrecen grandes oportunidades de aplicaciones a medida con altos rendimientos, las ventajas de reemplazar los solventes orgánicos convencionales por ellos no han sido completamente demostradas aún.

5.1.2.3. Sistemas congelados

Es sabido que en **sistemas congelados** las proteasas permanecen activas (Lineweaver, 1939). Las reacciones en estos sistemas forman parte de la llamada *química crio-bioorgánica*, y está enfocada en un rango de temperaturas en los que no hay formación de eutécticos. Estas reacciones pueden considerarse como sistemas bifásicos que consisten en un solvente congelado y cristalino, y una fase líquida disminuida formando cavidades. Esta última contiene la enzima y los reactivos de una manera muy concentrada, existe un efecto de concentración por congelamiento (Fennema, 1974). En otras palabras, el congelamiento es el equivalente de un secado parcial, llegando a soluciones sobresaturadas de reactivos en los que los solutos pueden ser concentrados en un 0,1% del volumen original del líquido (Francks, 1985). Aparentemente, la síntesis de péptidos catalizada por proteasas con control cinético sería el mayor campo de aplicación de este método. Pudo establecerse que derivados de aminoácidos, péptidos y aún aminoácidos libres, que fueron considerados como nucleófilos pobres a temperatura ambiente, tienen rendimientos muy altos en condiciones de congelamiento (-10 y -25°C) (Schuster, 1990). Papaína fue un catalizador efectivo para la síntesis de Bz-Arg-Gly-NH₂ a -18°C en medio acuoso (Haensler y col., 1999). La principal ventaja de este sistema sería la eliminación de las funciones protectoras adicionales para los reactivos. Estos sistemas consisten en una excelente tecnología para aquellos que quieren evadir el uso de solventes orgánicos que son problemáticos especialmente en la aplicación en el sector de la alimentación. Sin embargo, y al igual que en el caso anterior, sus principales desventajas consisten en el tamaño del equipamiento y los altos costos.

5.1.2.4. Conversión sólido a sólido

La disolución completa de los reactivos y las enzimas en la mezcla de reacción es considerada siempre esencial para una síntesis eficiente. Sin embargo, esto no es necesario en la *conversión sólido a sólido* (Halling y col., 1995). En general, se trata de síntesis con los reactivos no disueltos a concentraciones muy altas. La cantidad de agua adherida a los hidratos salinos o al sustrato comercial y a las preparaciones enzimáticas como la única fuente de agua (menor a un 0,5% p/p) fue suficiente para mediar la síntesis enzimática (Erbeldinger y col., 1998). Sin embargo, se usa alrededor de un 10% (p/p) de fase líquida en estos sistemas, ya que un aumento o una disminución del volumen de solvente disminuye la eficiencia de la síntesis. Los beneficios de este sistema serían que combina el uso de reactivos equimolar o casi equimolar con altos rendimientos y altas relaciones producto/reactivo en el volumen de mezcla, procedimientos de trabajo sencillos y compatibilidad con la síntesis peptídica química convencional. Además, evita el uso de grandes cantidades de solvente orgánico y podría tener un interés adicional en el diseño de procesos de seguridad mejorada y cuidado del medio ambiente. Dentro de las conversiones sólido-sólido, pueden considerarse las mezclas eutécticas de sustratos. Se logró así la síntesis de un precursor de aspartamo (Z-Asp-Phe-OMe) catalizada por distintas peptidasas, siendo termolisina la que presentó mayor rendimiento (Ahn y col., 2001).

5.2. Ingeniería enzimática. Biocatalizadores

La ingeniería de enzimas se define como todas las estrategias destinadas a obtener un biocatalizador adaptado para llevar a cabo reacciones bajo las condiciones de síntesis, incluyendo modificaciones químicas y genéticas (Guzmán y col., 2007). Así se pueden tener enzimas más estables en los medios de síntesis, disminuir la hidrólisis competitiva, la proteólisis del producto, alterar la especificidad o enantioselectividad naturales de las enzimas, etc. Esta estrategia permitiría alcanzar las siguientes metas (Bordusa, 2002):

1° Aumentar la estabilidad de una enzima para que sea un mejor catalizador en las condiciones requeridas para la síntesis (especialmente en solventes orgánicos).

2° Mejorar la eficiencia enzimática reduciendo la velocidad de la hidrólisis competitiva del éster dador de acilos, especialmente cuando el agua forma parte del medio de reacción y el control de la reacción es cinético.

3° Reducir la actividad proteolítica indeseada para prevenir las rupturas competitivas de los péptidos durante la reacción de síntesis.

4° Aumentar o alterar la especificidad o enantioselectividad nativas de la enzima para ajustarlas a los requerimientos de la síntesis.

5.2.1. Purificación

Este proceso no corresponde a la ingeniería enzimática, pero sí forma parte del procesamiento de los extractos crudos necesario para que las enzimas puedan ser usadas como biocatalizadores.

Es importante saber el grado de purificación necesario para usar una enzima a la hora de plantear un proceso biocatalítico. Conviene ahorrar pasos de purificación (costosos y difíciles de escalar), si es posible, usando extractos crudos vegetales con un mínimo aislamiento. Esto no siempre es posible, ya que las enzimas útiles pueden estar en muy baja proporción, por lo que debemos concentrarlas, o porque pueden existir sustancias en los extractos crudos que interfieren de alguna forma en la acción enzimática (por ejemplo inhibidores). Por otra parte, en algunos casos los componentes del extracto crudo que acompañan a las enzimas pueden servir como una matriz protectora sobre las mismas ante efectos adversos durante la inmovilización, exposición a solventes orgánicos, etc. (Clapés y col., 1999).

5.2.2. Inmovilización

La preparación de las enzimas para su uso en los medios adecuados para realizar reacciones de síntesis orgánica involucra, principalmente, a los métodos de inmovilización. Sin embargo, existen, también estudios complementarios donde en base a procesos muy simples como la liofilización se logra mejorar mucho la actividad y estabilidad enzimática.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles en el medio de reacción que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente (Gerhartz, 1990).

La catálisis enzimática en fase heterogénea (enzimas inmovilizadas) ha permitido, por un lado, el uso más eficaz del catalizador al estabilizar la estructura proteica de la enzima y por otro, el desarrollo de procesos continuos con todas las ventajas operacionales asociadas, haciendo del proceso biotecnológico un proceso económicamente rentable (Liese y col., 2000). La inmovilización aumenta la estabilidad de las enzimas e incluso permite usarlas en condiciones de altas temperaturas y mayores rangos de pH. En reacciones llevadas a cabo en medios orgánicos la inmovilización protege a las enzimas de la desnaturalización, previene la

aglomeración aumentando el área efectiva disponible para la catálisis (Llerena-Suster y col., 2009). Este método también facilita la reutilización del biocatalizador, la separación de la enzima y los productos del medio de reacción y la disminución de las limitaciones en la transferencia de masa (Reslow y col., 1988).

Enzima Soluble		Enzima Inmovilizada	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Menor costo • Utilizable en caso de sustrato con alto peso molecular • No existen pérdidas de actividad (mayor actividad específica) 	<ul style="list-style-type: none"> • Gran cantidad de enzima remanente en el producto luego de finalizada la reacción • No es posible la reutilización de la enzima • La reacción podría estar limitada por inhibición por producto • Dificultad de un control preciso • Es necesario detener la reacción enzimática (calor, cambio en el pH), lo cual puede afectar al producto 	<ul style="list-style-type: none"> • La enzima es reutilizable • La reacción puede terminarse separando la enzima del sustrato • El control es más preciso • Menor impacto de la inhibición por producto • Mayor estabilidad a condiciones de temperatura y pH • Puede usarse en forma batch o continua • Existe una gran flexibilidad en el diseño de reactores 	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de capacidad catalítica durante el proceso de inmovilización • Presencia de restricciones difusionales o estéricas • Inactivación con una operación continua • Mayor costo, debido al soporte y proceso de inmovilización • Necesita control del estado sanitario durante el proceso

Tabla 4. Ventajas y desventajas del empleo de enzimas inmovilizadas. Comparación con las enzimas libres (Quiroga y col., 2009).

En la **Tabla 4** se enumeran algunas de las ventajas y desventajas del uso de enzimas inmovilizadas en comparación a las enzimas libres (Quiroga y col., 2009). Gracias a estas características, las preparaciones inmovilizadas de peptidasas han sido ampliamente empleadas en síntesis (Fité y col., 1998; Clapés y col., 1999; Morcelle y col., 2006).

Se pueden clasificar los diversos los numerosos métodos de inmovilización en función de la presencia o ausencia de soporte, de las características del mismo, del tipo de unión implicado en la inmovilización, etc.

Entre los métodos en ausencia de un soporte se encuentran la liofilización enzimática con distintos co-liofilizadores como éteres corona, surfactantes, etc., la formación de cristales enzimáticos entrecruzados (CLECs) y agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs), y la unión a las enzimas de PEG o similares. Entre los métodos que involucran soportes se clasifican según la unión: covalente, por adsorción o por entrapamiento.

5.2.2.1. Co-liofilización

La liofilización de las enzimas en presencia de lioprotectores preservantes de la estructura, tales como ligandos similares a los sustratos (Prestrelski y col., 1993), azúcares y

polioles (Adlercreutz, 1993), ciertas sales inorgánicas (Khmelnitsky y col., 1994) o éteres corona (Broos y col., 1995) frecuentemente producen preparaciones enzimáticas que son hasta cuatro veces más activas que aquellas obtenidas sin aditivos. También se han logrado mejoras en las enzimas por liofilización en presencia de lípidos (Okahata, 1997), surfactantes (Okazaki, 1997), PEG y otros polímeros. El amoldamiento molecular dejado en la enzima por aquellos ligandos similares al sustrato sería una posible explicación. Esta conformación alterada del sitio activo de la enzima permanecería luego de la liofilización, seguido de la extracción del ligando en un solvente anhidro adecuado. La conformación altamente activa inducida por el ligando permanece inmutable en el medio anhidro debido a la rigidez estructural de las enzimas en solventes orgánicos. La naturaleza del ligando usado para el amoldamiento de la subtilisina también permite el control racional de las especificidades enzimáticas (Rich y Dordick, 1997). El modelamiento molecular y los estudios dinámicos revelaron que los cambios estructurales en el sitio activo de las enzimas amoldadas parecieran ser mayores que lo esperado, influenciando tanto la unión del sustrato como la maquinaria catalítica de la enzima. La única limitación aparente a esta aplicación sería que el ligando molde debe ser soluble en el solvente orgánico del medio de reacción para poder ser removido.

Los éteres corona son efectivos sin necesidad de liofilizar. No obstante, la co-liofilización aumenta drásticamente la actividad enzimática en varios órdenes de magnitud.

Las sales inorgánicas tales como el KCl, constituyen uno de los lioprotectores más pequeños pero más efectivos. Un exceso de KCl en la solución acuosa de enzima anterior a la liofilización permitió un aumento dramático en la eficiencia catalítica de la subtilisina en hexano respecto de aquellos polvos enzimáticos libres de sales (Triantafyllou y col., 1997). Esta activación fue observada también para sales distintas al KCl, tales como buffers orgánicos/inorgánicos o sales neutras. Si bien el mecanismo exacto de este fenómeno no se explica totalmente, se supone que las sales forman una costra protectora alrededor de la enzima, así como estabilizan el estado de transición cargado por la polaridad aumentada del sitio activo permitida por los iones cargados de las sales y la hidratación preferencial de la enzima debida a la matriz de la sal (Ru y col., 2000). Las proteasas activadas por sales representan formulaciones enzimáticas altamente eficientes y fácilmente producibles para propósitos sintéticos.

5.2.2.2. Métodos de inmovilización sin soporte. CLECs y CLEAS

La agregación proteica por entrecruzamiento con reactivos bifuncionales (CLECs, cristales de enzima entrecruzados y CLEAs, agregados de enzima entrecruzados) es otra tecnología aplicada para la obtención de biocatalizadores. Este tipo de inmovilización, a diferencia de los métodos donde se utilizan soportes, permite una alta eficiencia por masa de biocatalizador ya que la enzima constituye el 100% del mismo.

Los microcristales de enzima entrecruzada (CLECs, *cross-linked enzyme crystals*) son preparaciones de biocatalizadores con altas actividades y estabildades (Häring y Scheier, 1999). En los cristales, las enzimas están ordenadas en un arreglo espacial preciso, originalmente unido por puentes covalentes. Por difracción de rayos X, se vio que el gran espacio entre las enzimas contiene usualmente agua. El entrecruzamiento irreversible dentro de los cristales se logra con un reactivo bifuncional como el glutaraldehído. Estas condiciones de entrecruzamiento deben estar cuidadosamente optimizadas para asegurar tanto la alta estabilidad como la actividad de la catálisis en los CLECs, ya que las limitaciones dadas por la transferencia de masa de los sustratos son desventajas conocidas de estos sistemas. Sin embargo, ha sido demostrado que, aunque las proteasas así inmovilizadas demuestran una alta actividad específica en medios orgánicos, su estabilidad operacional es bastante pobre; esta inactivación no se debería solamente a la deshidratación, ya que el catalizador desactivado en reactores orgánicos continuos no pudo recuperar su actividad en medios acuosos (Fernandes y Halling, 2002). Los CLECs de subtilisina y termolisina están disponibles comercialmente (Bordusa, 2002) y han sido utilizados exitosamente para acilaciones regioselectivas (Wang y col., 1997), resolución de racematos (Shah y col., 1999), síntesis de péptidos e hidrólisis suave de amidas peptídicas (Wang y col., 1996).

El costo de obtención de los CLECs es muy alto debido a que se necesitan las enzimas cristalizadas. Los CLEAs, en cambio, presentan mayores ventajas en este aspecto, ya que son enzimas precipitadas por métodos convencionales y luego sometidas al entrecruzamiento químico, es decir la combinación en un paso de purificación e inmovilización por lo que la enzima no necesita tener un alto grado de pureza. Esta técnica permite coprecipitar y agregar distintas enzimas de manera de generar un biocatalizador que catalice una síntesis de varios pasos (Sheldon, 2007).

Se han desarrollado CLEAs de proteasas, entre ellas quimotripsina y subtilisina (Sheldon, 2007). Sin embargo, aunque estos biocatalizadores demostraron ser buenos para la síntesis de péptidos, pueden sufrir autoproteólisis como principal desventaja (Guzmán y col., 2007). Para mejorar la estabilidad en solventes y las propiedades mecánicas de estos

agregados se los puede incorporar en hidrogeles de polivinil alcohol (LENTIKATS) (Wilson y col., 2004).

5.2.2.3. Métodos de inmovilización con soporte

La clasificación más común para estos métodos de inmovilización se basa en el tipo de unión de las enzimas con el soporte. Se describen los métodos de inmovilización por adsorción, por unión covalente y por entrapamiento.

Soportes inorgánicos		Soportes orgánicos	
Naturales	Manufacturados	Polímeros naturales	Polímeros sintéticos
<ul style="list-style-type: none"> • Bentonita • Piedra pómez • Sílice, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Óxido de metales • Vidrios porosos • Vidrios no porosos • Alúmina • Cerámicas • Gel de sílice, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc.) • Potreínas fibrosas (colágeno, queratinas, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> • Poliolefinas (poliestireno) • Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.) • Otros (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.)

Tabla 5. Tipos de soportes utilizados en los procesos de inmovilización.

Además de el tipo de unión, es importante evaluar las diferentes propiedades de los soportes a usar, entre ellas relación superficie/volumen, capacidad de unión de proteínas, compatibilidad e insolubilidad en el medio de reacción, estabilidad mecánica y química, posibilidad de reconversión luego de su uso, flexibilidad conformacional (Illanes y col., 2008). En la **Tabla 5** se nombran y clasifican distintos tipos de soporte usados para inmovilizar enzimas (Quiroga y col., 2009).

5.2.2.3.1. Inmovilización por adsorción

La inmovilización por adsorción es una técnica muy simple, en ella se ponen en juego interacciones iónicas y otras uniones débiles como puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals entre enzima y soporte. Esta inmovilización es una técnica suave y en general no afecta la actividad enzimática (Godia Casablanca, 1998), se generan interacciones muy similares a las que se establecen en membranas biológicas.

Las ventajas asociadas con este tipo de procesos son su bajo costo, fácil preparación, ausencia de cambios de especificidad enzimática y la obtención de derivados estables en medios con bajo contenido acuoso. En tanto que la débil unión de la enzima al soporte, la obtención de derivados poco estables mecánicamente y la complejidad de optimizar las

variables que controlan dicho proceso, son claros inconvenientes que limitan su aplicación (Wahlgren y Arnebrant, 1991).

La inmovilización por adsorción sobre soportes sólidos tales como poliamida o celite es un método sencillo y económico (Ferreira y col., 2003). Dicho método ha permitido la aplicación eficaz de proteasas en la síntesis enzimática de péptidos en medios con bajo contenido acuoso (Morcelle y col., 2006), en la síntesis de compuestos tensioactivos (Morcelle y col., 2008) y en la industria láctea (Sales-Gomes y Lima-Costa, 2008).

También se han estudiado diversos sistemas de las enzimas adsorbidas en matrices sólidas inertes, tales como vidrio poroso, sílica, zeolitas, polipropileno o alúmina. En estos casos, el grado de activación enzimática y estabilización depende estrictamente de la naturaleza de la matriz sólida.

5.2.2.3.2. Inmovilización mediante unión covalente

Entre los métodos de inmovilización por unión química, la unión covalente multipunto es quizás el método más interesante desde una perspectiva industrial y es el más efectivo en términos de estabilización térmica (Illanes, 1999). La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos funcionales del soporte para que reaccionen con residuos aminoacídicos de la molécula enzimática (grupos -OH, -SH, -NH₂, -COOH, etc.). El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del sitio activo, por lo que es aconsejable llevarla a cabo en presencia de un inhibidor reversible que bloquee el sitio activo de la enzima.

Mediante la unión de enzimas a soportes que contienen grupos aldehídos alifáticos, como por ejemplo glioxil-agarosa, se puede aumentar la rigidez de la molécula enzimática y por lo tanto, hacerla más resistente a cambios conformacionales inducidos por calor, solventes orgánicos y otros. Además, el grueso de la estructura proteica no se ve afectada aún cuando se establezca un gran número de enlaces (Guisán, 2006; Pedroche y col., 2007). En este sentido, la agarosa es un soporte que ha sido muy estudiado y utilizado para inmovilizar por unión covalente multipuntual proteasas tales como tripsina y α -quimotripsina (Guisán y col., 2004).

En la bibliografía se pueden encontrar otros numerosos ejemplos de proteasas inmovilizadas por unión covalente a diferentes soportes. Tal es el caso de tripsina estudiada en su capacidad proteolítica luego de ser inmovilizada covalentemente sobre geles de quitosano (Manrich y col., 2007) o, más recientemente, unida por unión covalente a microesferas de sílica magnética (Lin y col., 2008); de papaína inmovilizada sobre soportes magnéticos activados (Lei y col., 2004) y quimotripsina inmovilizada sobre columnas de sílica (Temporini y col., 2007).

Los soportes magnéticos arriba mencionados presentan propiedades muy interesantes ya que pueden ser separados de la mezcla de reacción luego de finalizada la misma por medio del empleo de un campo magnético, aún cuando los sustratos estén en suspensión (Bozhinova y col., 2004).

Entre las ventajas de la inmovilización por unión covalente, se puede destacar la manipulación sencilla de los derivados inmovilizados, la existencia de una carga enzimática constante luego de la inmovilización, la aptitud de los derivados inmovilizados para su uso en reactores de operación continua de lecho fijo, de lecho fluidizado o tanque agitado, y la mayor resistencia a la desactivación térmica, a la presencia de solventes orgánicos o a cambios del pH, por tener una estructura terciaria estable (Ferreira y col., 2003).

5.2.2.3.3. Inmovilización por entrapamiento

Por su parte, el método de inmovilización por entrapamiento consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carragenato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico (Nigan y col., 1988; Chang y col., 1996). Tal metodología de inmovilización, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. Sin embargo, el entrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (Markvicheva y col., 2000). Su limitación consiste en las restricciones difusionales ya que se requiere de geles muy densos para evitar la elusión de la enzima desde la matriz.

El entrapamiento de proteasas, tanto en perlas de alginato como en membranas poliméricas, ha permitido la obtención de derivados enzimáticos estables frente a diferentes condiciones de pH, temperatura y presencia de solventes orgánicos, haciéndolos catalizadores promisorios para su aplicación en la catálisis en medios orgánicos y en diferentes procesos industriales (Sharma y col., 2006).

5.2.3. Modificaciones enzimáticas de tipo químico

Las modificaciones químicas han emergido otra vez como una poderosa técnica complementaria a la mutagénesis dirigida y al azar para confeccionar biocatalizares. Entre los beneficios de dicha técnica cabe destacarse que es barata y fácil de llevar a cabo en gran escala y permite la incorporación de modificaciones a los aminoácidos, lo que lleva a una variedad de especies enzimáticas que no puede generarse por ingeniería genética.

Las modificaciones pueden tener distintos objetivos, entre ellos: a) aumentar la actividad, b) cambiar la especificidad, el sentido de la reacción y, hasta el tipo de reacción catalizada, c) aumentar la estabilidad de las enzimas en los distintos medios de reacción (Morcelle, 2004).

Las modificaciones más comunes son la metilación de los residuos de His (generalmente dirigidos a metilar la His catalítica) y la transformación de la Ser del sitio activo en una Cys para dar una tiol-peptidasa (como la tiol-subtilisina). No obstante, las actividades en síntesis fueron más bajas que las obtenidas en el caso de las enzimas naturales, aunque no se observó proteólisis indeseada. La unión covalente de hidratos de carbono a la superficie de las enzimas demostró mejorar su estabilidad en solventes orgánicos, y la modificación de los subsitios S2, S1 y S1' de subtilisina mediante el enlace de ligandos hidrofóbicos o cisteínas artificiales produjeron importantes aumentos en la actividad (Bordusa, 2002).

La unión covalente con PEG o del metoxipolietilenglicol (MPEG), que representan los polímeros anfipáticos más comúnmente usados, permite la solubilidad enzimática tanto en agua como en numerosos solventes orgánicos. Las cadenas hidratadas de PEG crean un caparazón acuoso alrededor de la enzima que estabiliza la conformación activa del sitio catalítico, promoviendo así la actividad catalítica en solventes orgánicos anhidros (Bovara y col., 1997).

También existen estudios que van desde una acetilación no específica de los grupos amino libres de la enzima hasta la unión de compuestos anfipáticos a la superficie enzimática (DeSantis, 1999).

La papaína ha sido modificada químicamente, para aumentar su estabilidad en sistemas no acuosos, por unión con anhídridos ácidos como el anhídrido acético, propiónico, succínico, citracónico y maleico (Szabó y col., 2009; Sangeetha y Abraham, 2006).

5.2.4. Modificaciones enzimáticas mediante ingeniería genética

El uso de la ingeniería genética no se restringe a la modificación de las enzimas, en primer término puede ser utilizada para lograr la expresión y obtención en grandes cantidades de enzimas de distintos orígenes en microorganismos. Esto permitiría contar con masas de enzimas recombinantes para la producción de biocatalizadores en cantidades muy superiores a las de sus fuentes naturales (Giri y col., 2001; Haudenschild y col., 2000). Refiriéndose a la aplicación de la ingeniería genética sobre enzimas vegetales, Duetz y colaboradores (2003) señalan que *el desafío será expresar enzimas funcionales con alta eficiencia en microorganismos adecuados para la fermentación. Si esto se puede lograr, la alta eficiencia catalítica y la super regioespecificidad de las enzimas vegetales podría combinarse con la gran capacidad de los microorganismos en procesos de producción industriales.*

La ingeniería de proteínas mediante la manipulación de los genes que codifican la síntesis de las peptidasas es otra estrategia de gran relevancia para alterar su actividad, selectividad, especificidad, estabilidad, solubilidad, etc. Se usan dos estrategias diferentes para lograrlo:

- El **diseño racional** consiste en hacer cambios de un sitio específico en una enzima con la ayuda de un conocimiento detallado sobre la estructura de la misma, su función y mecanismo catalítico (Rubin-Pitel y Zhao, 2006). Así se obtuvo un doble mutante de subtilisina (subtiligasa), en el que la Ser 221 catalítica fue mutada por una Cys, y la Pro 225 por Ala, lo que aumentó la estabilidad y la capacidad de síntesis, así como se vio modificada su especificidad y su perfil de pH (Abrahmsen y col., 1991); de esta forma también se diseñó una tripsina mejorada para la síntesis de péptidos (Lombard y col., 2005).

- Otro método relacionado es la **evolución dirigida**, que consiste en ciclos repetidos de mutagénesis al azar y/o recombinación genética, seguidos de un *screening* de alto rendimiento o selección de los mutantes funcionalmente mejorados. Este método tiene como ventaja que no se necesita información estructural de la proteína en cuestión (Rubin-Pitel y Zao, 2006). A pesar de ello, y dado que subtilisina ha sido probablemente la peptidasa más estudiada en este aspecto, Chen y Arnold (1993) lograron obtener un mutante estable en DMF, así como otro mutante de subtilisina termoestable (Chen y Arnold, 1991). Asimismo, Varadarajan y colaboradores (2005) alteraron y mejoraron simultáneamente la especificidad y selectividad de una peptidasa de *E. coli* hacia el sustrato deseado.

5.3. Ingeniería de sustratos

Dado que las proteasas no reaccionan con igual especificidad frente a todos los aminoácidos, la única variable manipulable para aumentar la actividad en síntesis hacia dadores de acilo menos específicos es el grupo saliente (Bordusa, 2002). Los mímicos de sustrato poseen el grupo saliente apto para unirse al sitio activo de la enzima (Bordusa, 2000). Así, peptidasas serínicas y cisteínicas pueden reaccionar con aminoácidos no específicos o secuencias peptídicas sin alterar la enzima ni el medio de reacción. La ventaja de este método consiste en que, al acoplarse dos secuencias no específicas, el enlace formado no es reconocido por la peptidasa y por lo tanto no hay clivaje secundario. La principal desventaja de esta estrategia radica en la síntesis de sustratos diseñados específicamente para este fin y que por lo tanto no están disponibles comercialmente (Khumtaveeporn y col., 2001).

El empleo de sustratos inmovilizados es otra alternativa que permite la síntesis catalizada por peptidasas en medios acuosos. Esta estrategia fue primeramente propuesta por Ulijn y col. (2002) acoplando Phe a la resina PEGA y posteriormente tratada con un exceso de ácidos carboxílicos como dadores de acilo en presencia de termolisina. Se obtuvieron conversiones de hasta el 99% debido probablemente a la transferencia de sustratos hidrofóbicos desde la solución acuosa hacia el dominio hidrofóbico de la resina (Ulijn y col., 2003). Estas condensaciones pueden también realizarse entre fragmentos peptídicos para obtener péptidos de cadena más larga o pequeñas proteínas (Laurent y col., 2008).

6. Bibliografía

- Abrahamsen, L., Tom, J., Burnier, J., Butcher, K.A., Kossiakoff, A., Wells, J.A. (1991). Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution. *Biochem.* **30**:4151-4159.
- Adamczak, M., Hari Krishna, S. (2004) Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.* **42**: 251-64.
- Adams, C.A., Rinne, R.W. (1981). The occurrence and significance of dispensable propeptides in plants. *New Phytol.* **89**:1-6.
- Adlercreutz, P. (1993). Activation of enzymes in organic media at low water activity by polyols and saccharides. *Biochim. Biophys. Acta* **1163**:144-148.
- Agenda 21: Declaration on Environment and Development. (1992). Capítulos 16 y 35. Commission on Sustainable Development, UN Department of Economic and Social Affairs. <http://www.un.org/esa/sustdev/documents/agenda21/>
- Ahn, E.J., Kim, C., Shin, C.S. (2001). Enzymic synthesis of aspartame precursors from eutectic substrate mixtures. *Process Biochem.* **37**: 279-85.
- Alberghina, L. (2000). Protein engineering in industrial biotechnology. CRC Press, Boca Ratón.
- Almarsoon, O., Klibanov, A.M. (1996). Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:87-92.
- Anastas, P.T., Warner, J.C. (1998). Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press, New York, p. 30.
- Andersson, L., Blomberg, L., Flegel, M. (2000). Large-scale synthesis of peptides. *Biopol.* **55**: 227-50.
- Anisimova, V.V., Filippova, I.Y., Lysogorskaya, E.N., Oksenoit, E.S., Kolobanova, S.V., Stepanov, V.M. (1996). Proteinase-catalyzed peptide synthesis in concentrated solutions of urea and other denaturing agents. *Int. J. Pept. Protein Res.* **47**:28-35.
- Azarkan, M., Wintjens, R., Looze, I., Baeyens-Volant, D. (2004). Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. *Phytochemistry* **65**:525-534.
- Azarkan, M.; El Moussaoui, A.; van Wuytswinkel, D.; Dehon, G.; Looze, Y. (2003). Fractionation and

- purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *J. Chrom. B* **790**:229–238
- Barberis S., Quiroga E., Arribére M.C., Priolo N. (2002). Peptide synthesis in aqueous–organic biphasic systems catalyzed by a protease isolated from *Morrenia brachystephana* (Asclepiadaceae). *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **17**: 39–47
- Barberis, S., Illanes, A. (1996). Catálisis enzimática en fase orgánica. Ing. Quim. Marzo, pp.165-73.
- Barcia, C., Quiroga, E., Quiroga, G., Barberis, S. (2008). Proteasas del polen de *Acacia caven*. Aplicación a la síntesis de péptidos y en detergentes. III ENREBB, SanLuis 15-17 de octubre de 2008
- Barlos, K., Gatos, D. (1999). 9-Fluorenylmethoxycarbonyl/tbutyl-based convergent protein synthesis. *Biopolym* **51**: 266-78.
- Barrett, A., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (2004). Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, London, p. 3, 16, 278-284, 1051, 1072-1074.
- Barros, E.J., Wehtje E., Adlercreutz, P. (1998) Mass transfer studies on immobilized α -chymotrypsin biocatalysts prepared by deposition for use in organic medium. *Biotechnol. Bioeng.* **59**: 364-373.
- Bergman, M., Ross, W.F. (1936). Proteolytic enzymes (VIII). *J. Biol. Chem.* **114**:717-726.
- Boersma, Y.L., Dröge M.J., Quax W.J. (2007). Selection strategies for improved biocatalysts. *FEBS J.* **274**: 2181-95.
- Boller, T. (1986). Roles of proteolytic enzymes in interactions of plant with other organisms. Plant proteolytic enzymes (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I, p. 68-96.
- Bommarius, A.S., Riebel, B.R. (2004). Biocatalysis: fundamentals and applications. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Bordusa, F. (2000). Nonconventional amide bond formation catalysis: programming enzyme specificity with substrate mimetics. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**: 469-85.
- Bordusa, F. (2002). Proteases in organic synthesis. *Chem. Rev.* **102**: 4817-67.
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas R.J. (1999). Hydrolases in organic synthesis. Wiley VCH, Weinheim.
- Bovara, R., Carrea, G., Gioachini, A.M., Riva, S., Secundo, F. (1997). Activity, stability, and conformation of methoxypoly(ethylene glycol)-subtilisin at different concentrations of water in dioxane. *Biotechnol. Bioeng.* **54**:50-57.
- Bowles, D. J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59**:873-907.
- Bozhinova, D., Galunsky, B., Yueping, G., Franzreb, M., Köster R., Kasche, V. (2004). Evaluation of magnetic polymer micro-beads as carriers of immobilised biocatalysts for selective and stereoselective transformations. *Biotechnol. Lett.* **26**: 343-50.
- Brocklehurst, K., Salih, E. (1983). Nomenclature of papaya proteinases. *Biochem. J.* **213**:559-560.
- Brocklehurst, K., Baines, B.S., Kierstan, M.P. (1981). Papain and other constituents of *Carica papaya* L. *Top. Enzyme Fermentation Biotechnol.* **5**:262-335.
- Broos, J., Engbersen, J.F.J., Sakodinskaya, K., Verboom, W., Reinhoudt, D.N. (1995). Activity and enantioselectivity of serine proteases in transesterification reactions in organic media. *J. Chem. Soc. Perkin Transac.* **1**: 2899-905.
- Bross, J., Sakodinskaya, I.K., Engbersen, J.F.J., Verboom, W., Reinhoudt, D.N. (1995). Large activation of serine proteases by pretreatment with crown ethers. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2**:255-256.
- Bruggink, A., Roy, P.D. (2001) Synthesis of β -lactam antibiotics: chemistry, biocatalysis & process integration. Sheldon, R.A., van Rantwijk, F., van Langen, L.M., Wegman, M.A., Cao, L., Janssen, M.H.A. Capitulo III Biocatalysts and Biocatalysis in the synthesis of β -lactam antibiotics
- Bucke, C. (1996). Oligosaccharide synthesis using glycosidases. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **67**: 217-20.
- Bull, A.T., Bunch A.W., Robinson G.K. (1999). Biocatalysts for clean industrial products and processes. *Curr. Op. Microb.* **2**:246-251
- Buttle, D.J.; Barrett, A.J. (1984). Chymopapain. Chromatographic purification and immunological characterization. *Biochem. J.*, **223**:81-88.
- Cantacuzène, D., Pascal, F., Guerreiro, C. (1987). Synthesis of amino acid esters by papain. *Tetrahedron*, **43**:1823-1826.
- Carrea, G.; Riva, S. (2000). Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **39**:2226-2254.
- Castro, G.R. (1999). Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **25**: 689-94.
- Castro, G.R., Knubovets, T. (2003). Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Critic. Rev. Biotechnol.* **23**: 195-231.
- Chamani, J., Heshmati, M. (2008). Mechanism for stabilization of the molten globule state of papain by sodium n-alkyl sulfates: spectroscopic and calorimetric approaches. *J. Coll. Int. Sci.* **322**:119
- Chang, T.M.S., McIntosh, F.C., Mason, F.G. (1996). Semipermeable microcapsules: preparation and properties. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **44**: 115-9.
- Chaudhary, A.K, Kamat, S.V., Beckman, E.J., Nurok, D., Kleyle, R.M., Hajdu, P., Russell, A.J.(1996). Control of subtilisin substrate specificity by solvent engineering in organic solvents and supercritical fluorofrom. *J. Am. Chem. Soc.* **118**:12891-12901.
- Chen, K. Q., Arnold, F. H. (1991). Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Biol. Technol.* **9**:1073–1077.
- Chen, Y.-X., Zhang, X.-Z., Chen, S.-M., You, D.-L., Wu, X.-X., Yang, X.-C., Guang, W.-Z. (1999). Kinetically controlled syntheses catalyzed by proteases in reverse micelles and separation of

- precursor dipeptides of RGD. *Enzyme Microb. Technol.* **25**:310-315
- Cho, H., Adrio J.L., Luengo J.M. (1998). Elucidation of conditions allowing conversion of penicillin G and other penicillins to deacetoxycephalosporins by resting cells and extracts of *Streptomyces clavuligerus* NP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 11544-8.
- Clapés P., Torres J., Adlercreutz P. (1995). Enzymatic Peptide Synthesis in Low Water Content Systems: Preparative Enzymatic Synthesis of [Leu]- and [Met]-Enkephalin Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **3**: 245-255
- Clapés, P., Infante, M.R. (2002) Amino acid-based surfactants: enzymatic synthesis, properties and potential applications. *Biocatal. Biotransf.* **20**:215-233.
- Clapés, P., Espelt, L., Navarro, M.A., Solans, C. (2001). Highly concentrated water-in-oil emulsions as novel reaction media for protease-catalysed kinetically controlled peptide synthesis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*:1394-1399.
- Clapés, P., Morán, C., Infante, M.R. (1999). Enzymatic synthesis of arginine based surfactants. *Biotechnol. Bioeng.*, **63**:333-343.
- Cordell G.A., Lemos T.L.G., Monte F.G.Q., de Mattos M.C. (2007). Vegetables as Chemical Reagents. *J. Nat. Prod.*, **70**: 478-492
- Davis, B.G., Boyer, V. (2001). Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **18**: 618-40.
- Deo, G., Wachs, I.E., Haber, J. (1994). Vanadium Oxide Monolayer Catalysts. *Crit. Rev. Surf. Chem.* **4**: 141.
- DeSantis, G., Jones, J.B. (1999). Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**:324-330.
- Domínguez de María P (2008). "Nonsolvent" applications of ionic liquids in biotransformations and organocatalysis. *Angew.Chem. Int. Edit.*, **47**: 6960-6968.
- Domínguez de María, P., Sinisterra J.V., Tsai S.W., Alcántara A.R. (2006). Carica papaya lipase (CPL): An emerging and versatile biocatalyst. *Biotechnology Advances* **24**: 493-499
- Domsalla A., Melzig M.F. (2008). Occurrence and properties of proteases in plant latices. *Planta Med.* **74**:699-711
- Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M., Wolthers, B.G. (1968). Structure of papain. *Nature* **218**:929-932.
- Duetz, W. A., Bouwmeester, H., van Beilen, J. B., Witholt, B. (2003). Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**:269-277
- Dussourd, D. (1993). Caterpillar adaptations for circumventing plant defense. Ecological and Evolutionary constraints on foraging (Chapman and Hall eds.), New York, p. 92-131.
- Erbeldinger, M., Mesiano, A., Russell, A. (2008). Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid-An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol. Progr.*, **16**: 1129-1131.
- Erbeldinger, M., Ni. X., Halling, P.J. (1998). Effect of water and enzyme concentration on thermolysin-catalyzed solid-to-solid peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, **59**:68-72.
- Faber, K. (2000). Biotransformations in organic synthesis. 4th ed. Berlin: Springer.
- Faber, K. (1997). Biotransformations in organic chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- FDA News, September 23rd 2008. FDA Warns Companies to Stop Marketing Unapproved Ophthalmic Balanced Salt Solution Drug Products and Topical Drug Products Containing Papain. <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2008/NEW01890.html>. Accessed online December 2008.
- Fennema, O. (1974). En: Water Relations of Food (Duckworth, R.B. Ed.), Academic Press, London, p. 397.
- Fernandes, J.F.A., Halling P.J. (2002). Operational stability of high initial activity protease catalysts in organic solvents. *Biotechnol. Prog.* **18**:1455-1457.
- Fernandez, M.M., Margot, A.O., Falender, C.A., Blanch, H.W., Clark, D.S., (1995). Enzymatic synthesis of peptides containing unnatural amino acids. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 964-71.
- Ferreira L., Ramos, M.A., Dordick, J.S, Gil, M.H. (2003). Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **21**: 189-99.
- Fité, M., Clapés, P., López-Santín, J., Benaiges, M.D., Caminal G. (2002). Integrated process for the enzymatic synthesis of the octapeptide PhAcCCK-8. *Biotechnol. Progr.* **18**: 1214-20.
- Fité, M., Alvaro, G., Clapés, P., López-Santín, J., Benaiges, M.D., Caminal, G. (1998). Reactivity of easily removable protecting groups for glycine in peptide synthesis using papain as catalyst. *Enzyme Microb. Technol.* **23**: 199-203.
- Fontes, N., Almeida, M.C., Garcia, S., Peres, C., Partridge, J., Halling, P.J., Barreiros, S. (2001). Supercritical fluids are superior media for catalysis by cross-linked enzyme microcrystals of subtilisin Carlsberg. *Biotechnol. Prog.* **17**:355-358.
- Francks, F. (1985). Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures. Cambridge University Press: Cambridge.
- García-Junceda, E., García-García, J.F., Bastida, A. (2004). Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades. *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 1817-34.
- Gerhartz, W. (1990). Enzymes in industry. Production and applications, Ed. Síntesis, Madrid.
- Giri A., Dhingra V., Giri C.C., Singh A., Ward O. P., Lakshmi Narasu M. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzymes

- systems: current trends and future prospects. *Biotech Adv* **19**: 175–199
- Glazer, A.N., Smith, E.L. (1971). The enzymes (Boyer, P.D., ed.), Academic Press, New York, Vol. III, p. 501.
- Godia Casablanca, F., López-Santín, J. (1998) in: Godia-Casablanca, J. López-Santín (Eds.), *Ingeniería bioquímica*, Editorial Síntesis, Madrid.
- Gomes, J., Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* **42**: 223-35.
- Gorke, J., Srienc, F., Kazlauskas, R. (2010). Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, **15**: 40-53.
- Guisán, J.M. (2006). Immobilization of enzymes and cells, Humana Press Inc. Totowa, pp. 185-204
- Guisán, J.M., Bastida, A., Cuesta, C., Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M. (2004). Immobilization-stabilization of α -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 1144-52.
- Günther, R., Bordusa, F. (2000). Protease catalysis mediated by a substrate mimetic: a novel enzymatic approach to the synthesis of carboxylic acid amides. *Chem. Eur. J.* **6**: 463-7.
- Guo, Y., Clark, D.S. (2001). Activation of enzymes for nonaqueous biocatalysis by denaturing concentrations of urea. *Biochim. Biophys. Acta* **1546**:406-411
- Gupta, M.N., Roy, I. (2004). Enzymes in organic media: forms, functions and applications. *Eur. J. Biochem.* **271**: 2573-83.
- Guzmán F., Barberis S., Illanes A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electr. J. Biotech.* **10**:279-314
- Haensler, M., Thust, S., Klossek, P., Ullmann, G. (1999). Enzyme-catalyzed preparative peptide synthesis in frozen aqueous systems. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **6**: 95-98
- Halling, P.J. (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in non conventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 178-206.
- Halling, P.J. (2004). What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media?. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **359**: 1287-96.
- Halling, P.J., Eichhorn, U., Kuhl, P., Jakubke, H.-D. (1995). Thermodynamics of solid-to-solid conversion and application to enzymic peptide synthesis. *Enzyme Microb Technol.*, **17**:601-606.
- Hari Krishna, S. (2002). Developments and trends in enzyme catalysis in non-conventional media. *Biotechnol Adv.* **20**: 239-67.
- Häring, D., Scheier, P. (1999). Cross-linked enzyme crystals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**:35-38.
- Hartley, B.S. (1960). Proteolytic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **29**:45-72.
- Hasan, F., Shah A.A., Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39**: 235-51.
- Haudenschield, C., Schalk, M., Karp, F., Croteau, R. (2000). Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **379**:127–136
- Hou, R., Yang, Y., Li, G., Huang, Y.B., Wang, H., Liu, Y.J., Xu, L., Zhang, X.Z. (2006). Synthesis of a precursor dipeptide of RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) catalysed by the industrial protease alcalase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **44**: 73-80.
- Hult, K., Berglund, P. (2007). Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends in Biotechnology* **25**:5 231-238
- Illanes, A., Anjarí, S., Altamirano, C., Aguirre, C. (2004). Optimization of cephalixin synthesis with immobilized penicillin acylase in ethylene glycol medium at low temperatures. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **30**:95-103.
- Illanes, A. (1999). Stability of biocatalysts. *Electron. J. Biotech.* **2**: 1-9.
- Illanes, A. (2008). Enzyme biocatalysis: principles and applications. Springer, 391 pp.
- Illanes, A., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., Wilson, L. (2008). Heterogeneous enzyme kinetics, In *Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications* (A. Illanes, Ed.) Springer Science, UK. Chapter 4, pp. 155-203.
- Isono, Y. (2002) Enzymatic synthesis of aspartame precursor in solvent-free reaction system, *J. Japan Soc. Food. Sci. Technol.* **49**:813-7.
- Johnson, E.C., Malito, E., Shen, Y., Pentelute, B., Brad, R., Rich, D., Florian, J., Tang, W.J., Kent S.B.H. (2007). Insights from atomic-resolution X-ray structures of chemically synthesized HIV-1 protease in complex with inhibitors. *J. Mol. Biol.* **373**: 573-86.
- Jorba, X., Clapés, P., Torres, J.L., Valencia, G., Mata-Alvarez, J. (1995). Ethyl-acetate modified AOT water-in-oil micromulsions for the α -chymotrypsin catalyzed synthesis of a model dipeptide derivative. *Coll. Surf. A*, **96**: 47-52.
- Kamat, S., Beckman, E.J., Russell, A.J. (1992). Role of diffusion in nonaqueous enzymology. 1. Theory *Enzyme Microb. Technol.* **14**:265-271.
- Kamat, S., Iwaskewycz, B., Beckman, E.J., Russell, A.J. (1993). Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids: tuning enzyme activity by changing pressure. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:2940-2944.
- Kasche, V. (2001). Proteases in peptide synthesis. En: *Proteolytic Enzymes* 2nd. Edition, (Beynon, R. and Bond, J. S., eds.), Oxford University Press, p. 265-292.
- Kazlauskas, R.J. (2005). Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr Op Chem Biol* **9**:2 195-201

- Keith J.M., Larrow, J.F., Jacobsen, E.N. (2001). Practical considerations in kinetic resolution reactions. *Adv. Synth. Catal.* **343**: 5-26.
- Khmelnitsky, Y.L., Budde, C., Arnold, M., Usyatinsky, A., Clark, D.S., Dordick, J.S. (1997). Synthesis of water-soluble paclitaxel derivatives by enzymatic acylation. *J. Am. Chem. Soc.* **119**:11554-11555.
- Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Martinek, K. (1988). Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.* **10**:710-718.
- Khmelnitsky, Y.L., Welch, S.H., Clark, D.S., Dordick, J.S. (1994). Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **116**:2647-2648.
- Khumtaveeporn, K., Ullmann, A., Matsumoto, K., Davies, B., Jones, J.B. (2001). Expanding the utility of proteases in synthesis: broadening the substrate acceptance in non-coded amide bond formation using chemically modified mutants of subtilisin. *Tetrahedron Asym* **12**: 249-61.
- Kim, C., Shin C.S. (2001). Solvent-free enzymatic synthesis of alitame precursor using eutetic substrate mixtures. *Enzyme Microbiol. Technol.* **28**: 611-6.
- Kimmel, J.R., Smith, E.L. (1957). The properties of papain, *Adv. Enzymol.* **19**:267-334.
- Kimmerlin, T., Seebach, D. (2005). 100 years of peptide synthesis: ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies. *J. Pept. Res.* **65**: 229-60.
- Klein, J.U., Cerovsky, V. (1996). Protease-catalyzed synthesis of Leu-enkephalin in a solvent-free system. *Int. J. Pept. Protein Res.* **47**:348-352.
- Klibanov, A. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-6.
- Klibanov, A.M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water?. *Trends Biotechnol.* **15**: 97-101.
- Koeller, K.M., Wong, C.H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature* **409**: 232-40.
- Konno, K. (2011). Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.016>.
- Koskinen, A.M.P., Klibanov, A.M. (1996). Enzymatic reactions in organic media. Blackie Academic & Professional, London.
- Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W., Wandrey, C. (1996). Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example. *Biochem. Eng.* **52**: 309-19.
- Krieger, N., Bhatnagar, T., Baratti, J. (2004). Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.* **42**: 279-86.
- Krix, G., Eichhorn, U., Jakubke, H.D., Kula, M.R., (1997). Protease-catalyzed synthesis of new hydrophobic dipeptides containing non-proteinogenic amino acids. *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 252-7.
- Kullman, W. (1987) Enzymatic peptide synthesis; CRC Boca Raton.
- Kumar, D., Bhalla, T. (2005). Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 726-36.
- Kyndt, T.; Van Damme, E.J.M.; Van Beeumen, J.; Gheysen, G. (2007). Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp". *FEBS J.* **274**:451-462
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **XXX**:81-87.
- Lamare, S., Legoy, M. (1993). Biocatalysis in the gas phase. *Trends Biotechnol.* **11**: 413-8.
- Lang, A., Hatscher, C., Kuhl, P. (2007). Papain-catalysed synthesis of Z-L-aminoacyl-antipyrine amides from Z-protected amino acid esters and 4-aminoantipyrine. *Tetrahedron Lett.* **48**: 3371-4.
- Laurent, N., Haddoub, R., Flitsch, S. (2008). Enzyme catalysis on solid surfaces. *Tibtech*, **26**: 328-36.
- Lee, H.-H., Fukushi, H., Oyama, K., Aso, K. (1993). PEG-papain catalyzed síntesis of a kyotorphin derivative in aqueous organic media. *Biotech. Lett.* **15**: 833-6.
- Lee, M.Y., Dordick, J.S. (2002). Enzyme activation for nonaqueous media, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 376-84.
- Lei, H., Wang, W., Chen, L-L., Li, X.C., Yi, B., Deng, L. (2004). The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres. *Enzyme Microb. Technol.* **35**: 15-21.
- Leisola, M., Turunen, O. (2007). Protein engineering: opportunities and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**:1225-32.
- Lesney, M.S. (2003). For more and more industrial applications, enzymes, natural and engineered, are replacing traditional chemistry. Today's Chemist at Work, December, pp. 21-3.
- Levitsky, V.Y., Lozano, P., Iborra, J.L. (1999). Kinetic analysis of deactivation of immobilized α -chymotrypsin by water-miscible organic solvent in kyotorphin synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **65**: 170-5.
- Li, S.J., Wang, J.A., Xu, L., Zhong, X.Z., Li, J., Suo, D. (2008). Protease-catalyzed synthesis of a precursor dipeptide, Z-Asp-Val-NH₂ of thymopentin, in organic solvents. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **38**: 334-7
- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (2000). Industrial Biotransformations. Weinheim: Wiley-VCH.
- Liggieri, C. (2005). Proteasas de látex de *Asclepias curassavica* L. Caracterización y potencial de aplicación en síntesis de péptidos. Tesis Doctoral. LIPROVE. Fac Cs. Exactas. UNLP.
- Lin, S., Yao, G., Qi, D., Li, Y., Deng, C., Yang P., Zhang, X. (2008). Fast and efficient proteolysis by

- microwave-assisted protein digestion using trypsin-immobilized magnetic silica microspheres. *J. Proteome Res.* **7**: 1297-307.
- Lineweaver, H. (1939). The energy of activation of enzyme reactions, and their velocity below 0°. *J. Am. Chem. Soc.* **61**:403-408.
- Liu, G., Vaydia, A., Viswanathan, K., Cui, J., Xie, W., Gao, W., Goss, R. A. (2006). Rapid regioselective oligomerization of L-glutamic acid diethyl ester catalyzed by papain. *Macromolecules* **39**: 7915-21.
- Liu, S., Chen, A., (2005) Coadsorption of Horseradish Peroxidase with Thionine on TiO₂ Nanotubes for Biosensing. *Langmuir*, **21**: 8409.
- Liu, W., Wang P. (2007). Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnol. Adv.* **25**: 369-84.
- Llerena-Suster, C.R., Morcelle, S.R., Priolo, N.S., Clapés, P. (2009). Síntesis de peptidil amino alcoholes y péptidoaldehídos empleando papaína como biocatalizador. Proceedings of the 15° Brazilian Congress on Catalysis-5° Congress on Catalysis of Mercosur, Buzios, Brazil
- Llerena-Suster, C.R.F., Foresti, M.L., Briand, L.E., Morcelle, S.R. (2009). Selective adsorption of plant cysteine peptidases onto TiO₂. *Coll Surf B: Biointerfaces*, **72**:1 16-24,
- Lloyd-Williams, P., Giralt, E. (2000). Solid-phase convergent approaches to the synthesis of native peptides and proteins . En: Solid-phase synthesis: a practical guide (Kates, S.A., Albericio, F., eds.) Marcel Dekker, New York, pp. 377-418.
- Lombard, C., Saulnier, J., Wallach, J. (2005). Recent trends in protease-catalyzed peptide synthesis. *Prot. Pept. Lett.* **12**: 621-9.
- Lou, W.Y., Zong, M.H., Smith, T.J., Wu, H., Wang, J.F. (2006). Impact of ionic liquids on papain: an investigation of structure-function relationships. *Green Chem.*, **8**: 509-512
- Lozano, P., Iborra, J.L., Manjón, A., Combes, D. (1992). One step synthesis of Gly-Gly-Phe-NH₂ from N-unprotected amino acid derivatives by papain in one phase liquid media. *Biotech. Lett.* **14**: 933-6.
- Luo, Q.; Mao, X.; Kong, L.; Huang, X.; Zou, H. (2002). High-performance affinity chromatography for characterization of human immunoglobulin G digestion with papain. *J. Chrom. B* **776**:139-147
- Lynn, K.R. (1983). Definition of the site of reactivity of the ancestral protease of the papain type. *Phytochemistry* **22**:2845-2847.
- Lynn, K.R., Clevette-Radford, N.A. (1987). Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. *Phytochemistry*, **26**:939-944.
- Lynn, K.R., Yaguchi; M. (1979). N-terminal homology in three cysteinyl proteinases from Papaya latex. *Biochim. Biophys. Acta* **581**:363-364.
- Malhotra, S.V., Zhang, C.D., Wang, H. (2010). Enzymatic synthesis of dipeptides in ionic liquids. *Lett. Org. Chem.*, **7**: 168-171.
- Manrich, A., Galvão, C.M., Jesus, C.D., Giordano, R.C., Giordano, R.L. (2007). Immobilization of trypsin on chitosan gels: use of different activation protocols and comparison with other supports. *Int. J. Biol. Macromol.* **43**: 54-61.
- Markvicheva, E.A., Kuptsova, S.V., Buryakov, A.N., Babak, V.G., Varlamova, E.A., Dugina, T.N., Strukova, S.M., Lange, M.A., Vasilieva, T.V., Rumsh, L.D. (2000). Proteases entrapped in polymer composite hydrogels: preparation methods and applications. *Khimiya*. **41**: 54-7.
- Martinek, K. (1989). Micellar enzymology: potentialities in fundamental and applied areas. *Biochem Int.* **18**:871-893.
- Marty, A., Chulalaksananukul, W., Willemot, R.M. (2004). Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO₂. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 273-80.
- Mc Donald, J. (1985). An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Histochem. J.* **17**:773-85.
- Merrifield, B. (1986). Solid phase synthesis, *Science* **232**: 341-7.
- Merrifield, B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2149-54.
- Miao, W., Chan, T. (2005). Ionic-liquid-supported peptide synthesis demonstrated by the synthesis of leu5-enkephalin. *J. Org. Chem.*, **70**: 3251-3255.
- Mitin, Y.V., Braun, K., Kuhl, P. (1997). Papain catalyzed synthesis of glyceryl esters of N-protected amino acid and peptides for the use in trypsin catalyzed peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **54**: 287-90.
- Monge, A.; Barreiro, E.J.; Huenchunir, P.; Pinzón, R.; Mora, G.; Núñez, A.; Chiriboga, X.; Cáceres, A.; Rivera, G.; Bocanegra-García, V.; Gupta, M.; Ferro, E.A.; Peralta, I.; Lock, O.; Flores, D.; Salazar, L.; Guzmán, O.D.; Cerezetto, H.; González, M. (2008). Functional Foods: Reflections on an Expanding Market. *Chemistry Int*, **30**: 9-13.
- Morán, C., Infante, M.R., Clapés, P. (2001). Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of rac-1-O-(N^α-acetyl-L-aminoacyl)glycerol derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*: 2063-70.
- Morán, M.C., Pinazo, A., Pérez, L., Clapés, P., Angelet, M., García, M.T., Vinardell M.P., Infante, M.R. (2004). `Green` amino acid-based surfactants. *Green Chem.* **6**: 233-40.
- Morcelle del Valle, S. (2004). Proteasas de látex de *Funastrum clausum*. Caracterización y purificación y aplicación en la síntesis de péptidos en medios orgánicos. Tesis Doctoral. LIPROVE. Fac Cs. Exactas. UNLP
- Morcelle, S. R., Barberis, S., Priolo, N., Caffini, N.O., Clapés, P. (2006). Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of

- Z-Ala-Phe-OMe. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **41**:117-124
- Morcelle, S.R., Liggieri, C.S., Bruno, M.A., Priolo, N.S., Clapés, P. (2009). Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **57**: 177-182.
- Morcelle, S.R.; Llerena Suster, C.R.F.; Fait, M.E.; Moracci, L.; Priolo, N.S.; Clapés, P. (2008). Fitoproteasas como biocatalizadores en la síntesis de peptidil aminoalcoholes. Actas del XXVII Congreso Argentino de Química. Tucumán, Argentina, septiembre de 2008.
- Nakanishi, K., Matsuno, R. (1988). Enzymatic synthesis of aspartame. *Food Biotechnology*, Vol. **2**. Elsevier, London.
- Nakaoka, H., Miyajima Y., Morihara, K. (1998). Papain-catalyzed synthesis of aspartame precursor: A comparison with thermolysin. *J. Fermentation Bioeng.*, **85**: 43-47.
- Narai-Kanayama, A., Koshino, H., Aso, K. (2008). Mass spectrometric and kinetic studies on slow progression of papain-catalyzed polymerization of L-glutamic acid diethyl ester. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**: 881-91.
- NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry) (1984) Enzyme Nomenclature 1984. Academic Press, New York-London, p. 330-366
- Nigan, S.C., Tsao, I.F., Sakoda, A., Wang, H.Y. (1988). Techniques for preparing hydrogel membrane capsules. *Biotechnol. Tech.* **2**: 271-6.
- Nilsson, B., Soellner, M., Raines, R. (2005). Chemical synthesis of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**: 91-118.
- Noritomi, H., Nishida, S., Kato, S. (2007). Protease-catalyzed esterification of amino acid in water-miscible ionic liquid. *Biotechnol. Lett.* **29**: 1509-12.
- Noritomi, H., Suzuki, K., Kikuta, M., Kato, S. (2009). Catalytic activity of α -chymotrypsin in enzymatic peptide synthesis in ionic liquids. *Biochem. Eng. J.*, **47**: 27-30.
- O'Fágáin, C. (2003). Enzyme stabilization –recent experimental progress. *Enzyme Microb. Technol.* **33**: 137-49.
- Obregón, W.D., Arribére, M.C., Morcelle del Valle, S., Liggieri, C., Caffini, N.O., Priolo, N.S. (2001). Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.* **20**:17-25.
- Okahata, Y., Mori, T. (1997). Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media. *Trends Biotechnol.* **15**:50-54.
- Okazaki, S., Kamiya, X., Goto, M. (1997). Application of novel preparation method for surfactant-protease complexes catalytically active in organic media. *Biotechnol. Prog.* **13**:551-556.
- Oyama, K. (1987). Enzymatic Synthesis of Aspartame in Organic Solvents. En Biocatalysis in Organic Media (C. Laane, J. Tramper, M.D. Lilly, eds.), Elsevier Science Publishing Company, Inc., New York, pages. 209-224.
- Park, S., Kazlauskas, R.J. (2003). Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 432-7.
- Pedersen, N.R., Wimmer, R., Matthiesen, R., Pedersen, L.H., Gessesse, A. (2003) Synthesis of sucrose laurate using a new alkaline protease. *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**:6, 667-673
- Pedroche, J., Yust, M.M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Guisán, J.M., Millán, F. (2007). Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 1160-6.
- Petkar, M., Llai, A., Caimi, P. (2006). Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **39**: 83-90.
- Piera, E., Infante, M.R., Clapés, P. (2000). Chemo-enzymatic síntesis of arginine-based gemini surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **70**: 323-31.
- Plaquevent, J., Levillain, J., Guillen, F., Malhiac, C., Gaumont, A. (2008). Ionic liquids: New targets and media for α -amino acid and peptide chemistry. *Chem. Rev.*, **108**: 5035-5060.
- Poliakoff, M., Fitzpatrick, J.M., Farren, T.R., Anastas, P.T. (2002). Green Chemistry: Science and Politics of Change. *Science* **297**: 807
- Pollard, D.J., Woodley J.M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnol.* **25**: 66-73.
- Potetinova, J.V., Voyushina, T.I., Stepanov, V.M. (1997). Enzymatic synthesis of peptidyl amino alcohols and peptidylamino aldehydes -serine proteinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**: 705-10.
- Prestrelski, S., Arakawa, T., Carpenter, J.F. (1993). Separation of freezing and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**:465-473.
- Priolo, N., Morcelle del Valle, S., Arribére, M.C., López, L.M.I., Caffini, N. (2000). Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.* **19**:39-49.
- Quiroga, E. (2005). "Aplicación de fitoproteasas a la síntesis enzimática de péptidos de interés para la industria química y de los alimentos". Tesis doctoral. Cátedra de Bromatología, Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia, UNSL
- Quiroga, E., Camí, G., Marchese, J., Barberis, S. (2007). Organic solvents effect on the secondary structure of araujiain hI, in different media. *Biochem. Eng. J.* **35**: 198-202.
- Quiroga, E., Obregón, W.D., Illanes, A. (2009). Inmovilización de fitoproteasas. En Enzimas

- proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales. (Caffini, N.O., ed.). 1a ed. - Buenos Aires, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Quiroga, E., Priolo, N., Obregón, D., Marchese, J., Barberis, S. (2008). Peptide synthesis in aqueous-organic media catalysed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (Asclepiadaceae) fruits. *Biochem. Engin. J.*, **39**: 115-20.
- Rastall, R (2008) Novel enzyme technology for food applications, Woodhead Publishing Limited, Cambridge UK.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A. (2010). *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **38**: 227-233.
- Reslow, M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1988). On the importance of the support material for bioorganic synthesis. *Eur. J. Biochem.* **172**: 523-78.
- Rich, J.O., Dordick, J.S. (1997). Controlling subtilisin activity and selectivity in organic media by imprinting with nucleophilic substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **119**:3245-3252.
- Richards, A., Gill, I., Vulfson, E. (1993). Continuous enzymatic production of oligopeptides: synthesis of an enkephalin pentapeptide in a multistage bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 928-35.
- Riva, S., Chopineau, J., Kieboom, A.P.G., Klibanov, A.M. (1988). Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. *J. Am. Chem. Soc.* **110**:584-589.
- Robbins, B.H., Lamson, P.D. (1934). Further studies on the proteolytic enzyme content of latex from the fig and related trees. *J. Biol. Chem.* **87**:725-728.
- Roy I., Gupta, M.N. (2003). Non-thermal effects of microwaves on protease-catalyzed esterification and transesterification. *Tetrahed* **59**: 5431-6.
- Ru, M.T., Hirokane, S.Y., Lo, A.S., Dordick, J.S., Reimer, J.A., Clark, D.S. (2000). On the salt-induced activation of lyophilized enzymes in organic solvents: effect of salt kosmotropicity on enzyme activity. *J. Am. Chem. Soc.* **122**:1565-1571.
- Ru, M.T., Wu, K.C., Lindsay J.P. (2002). Towards more active biocatalysts in organic media: increasing the activity of salt-activated enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **75**: 187-96.
- Rubin-Pitel, S.B., Zao, H. (2006). Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution. *Comb. High Through. Screen.* **9**:247-257
- Ruiz, S., J.A. Feliú, G. Caminal, G. Álvaro & J. López-Santín (1997) Reaction engineering for consecutive enzymatic reactions in peptide synthesis: application to the synthesis of a pentapeptide, *Biotechnol. Prog.* **13**: 783-7.
- Sales-Gomes, M., Lima-Costa, M.E. (2008). Immobilization of endoproteases from crude extract of *Cynara cardunculus* L. flowers. *Food Sci. Technol. Int.* **14**: 271-6.
- Sangeetha, K., Abraham, T.E. (2006). Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *J Mol Catal B Enzyme*, **38**:171-7.
- Sarmento, A.C., Silvestre, L., Barros, M., Pires, E. (1998). Cardosins A and B, two new enzymes available for peptide synthesis. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **5**: 327-30.
- Schechter, I., Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **27**:157-62.
- Schulze, B., Wubbolts, M.G. (1999). Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 609-15.
- Schuster, M., Aaviksaar, A., Jakubke, H.-D. (1990). Enzyme-catalyzed peptide synthesis in ice. *Tetrahedron*, **46**:24, 8093-8102.
- Sears, P., Wong, C.H. (2001). Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. *Science* **291**: 2344-50.
- Serdakowski, A.L., Dordick, J.S. (2007). Enzyme activation for organic solvents made easy. *Tibtech.* **26**: 48-54.
- Sergeeva, M.V., Paradakar, V.M., Dordick, J.S. (1997). Peptide synthesis using proteases dissolved in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 623-8.
- Shah, J.H., Swartz, G.M., Papatthassiu, A.E., Treston, A.M., Fogler, W.E., Madsen, J.W., Green, S.J. (1999). Synthesis and enantiomeric separation of 2-phthalimidino-glutaric acid analogues: potent inhibitors of tumor metastasis. *J. Med. Chem.* **42**:3014-3017.
- Sharma, J., Singh, A., Kumar, R., Mittal, A. (2006). Partial purification of an alkaline protease from a new strain of *Aspergillus oryzae* AWT 20 and its enhanced stabilization in entrapped Ca-alginate beads. *Internet J. Microbiol.* **2**, 2.
- Sheldon RA. (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem Soc Trans.* **35**:1583-7.
- Sheldon, R.A. (1992). Organic synthesis-past, present and future. *Chem. Ind.*, **23**: 903-906.
- Sheldon, R.A. (2007). The E Factor: fifteen years on. *Green Chem.*, **9**: 1273-1283
- Sheldon, R.A., van Rantwijk, F., van Langen, L.M., Wegman, M.A., Cao, L., Janssen, M.H.A. (2001) Biocatalysts and Biocatalysis in the synthesis of β -lactam antibiotics en Synthesis of β -lactam antibiotics: chemistry, biocatalysis & process integration. (Bruggink, A., Roy, P.D.,eds.). Kluwer Acad Publ, Dordrecht
- Shin, G.H., Kim, C., Kim, H.J., Shin, C.S. (2003). Stereoselective enzymatic synthesis of an aspartame precursor of N-CBZ-L-Asp-L-PheOMe. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **26**:2001-208.
- Straathof, A.J.J., Panke S., Schmidt A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Op. Biotech.* **13**: 548-56.
- Szabó, A., Kotormán, M., Laczló, I., Simon, L.M. (2006). Spectroscopic studies of stability of papain

- in aqueous organic solvents. *J. Mol. Catal. B: enzymatic*, **41**: 43-8.
- Szabó, A., Kotormán, M., Laczkó, I., Simon, L.M. (2009). Improved stability and catalytic activity of chemically modified papain in aqueous organic solvents. *Process Biochemistry*, **44**: 199–204
- Tang, S., Bourne, R., Smith, R., Poliakoff, M. (2008). 24 Principles of Green Chemistry and Green Engineering: IMPROVEMENTS PRODUCTIVELY. *Green Chem.*, **10**: 268–269
- Telgenhoff, D.; Lam, K.; Ramsay, S.; Vasquez, V.; Villareal, K.; Slusarewicz, P.; Attar, P.; Shroot, B. (2007). Influence of Papain Urea Copper Chlorophyllin on Wound Matrix Remodeling. *Wound Rep. Reg.*, **15**:727–735
- Temporini, C., Calleri, E., Campèse, D., Cabrera, K., Félix, G., Massolini, G. (2007). Chymotrypsin immobilization on epoxy monolithic silica columns: development and characterization of a bioreactor for protein digestion. *J. Sep. Sci.* **30**: 3069-76.
- Thayer, A. M. (2006). Enzymes At Work. *Chem. Eng. News*, **14**: 15-27.
- Trejo, S.A., López, L.M.I, Cimino, C.V., Caffini, N.O., Natalucci, C.L. (2001) Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae). *J. Protein Chem.* **20**:445-453.
- Triantafyllou, A.O., Wehtje, E., Adlerkreutz, P., Mattiasson, B. (1997). How do additives affect enzyme activity and stability in non aqueous media. *Biotechnol. Bioeng.* **54**:67-76.
- Tundo, P., Anastas, P., StC. Black, D., Breen, J., Collins, T., Memoli, S., Miyamoto, J., Polyakoff, M., Tumas, W. (2000). Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview. *Pure Appl. Chem.*, **72**:1207–1228.
- Uhlig, H. (1998). *Industrial Enzymes and Their Applications*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, USA, 1998; 147 pp.
- Ulijn, R.V., Baragaña, B., Halling, P.J., Flitsch, S.L. (2002). Protease-catalyzed peptide synthesis on solid support. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 10988-9.
- Ulijn, R.V., Janssen, A.E.M., Moore, B.D. (2001). Predicting when precipitation-driven synthesis is feasible: applications to biocatalysis, *Chem. Eur. J.* **7**: 2089-97.
- Ulijn, R.V., Martin, L.D., Gardossi, L. (2003). Biocatalysis in reaction mixtures with undissolved solid substrates and products. *Curr. Org. Chem.* **7**: 1333-46.
- Ulijn, R.V., Bisek, N., Halling, P.J., Flitsch, S.L. (2003). Understanding protease catalysed solid phase peptide synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **1**: 1277–81.
- Uyama, H., Fukuoka, T., Komatsu, I., Watanabe, T., Kobayashi, S. (2002). Protease-catalyzed regioselective polymerization and copolymerization of glutamic acid diethyl ester. *Biomacromolecules* **3**: 318-23.
- Vallés, D., Furtado S., Cantera, A.M.B. (2007). Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae) *Enzyme Microb. Technol.*, **40**: 409-413.
- Vanek, T., Valterova, I., Vankova, R., Vaisar, T. (1999). Biotransformation of (-)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* immobilized plant cells. *Biotechnol Lett* **21**:625–628
- Varadarajan, M., Gram, J., Olsen, M.J., Georgiou, G.; Iverson, B.L. (2005). Engineering of protease variants exhibiting high catalytic activity and exquisite substrate selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 6855-60.
- Vierstra, R.D. (1996). Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Mol. Biol.* **32**:275-302
- Voyushina, T.L., Potetinova, J.V., Milgotina, E.I., Stepanov, V.M. (1999). Synthesis of peptide aldehydes via enzymatic acylation of amino aldehyde derivatives. *Bioorg. Medicin. Chem.* **7**: 2953-9.
- Wahlgren, M., Arnebrant T. (1991). Protein adsorption to solid surfaces. *Trends Biotechnol.* **9**: 201-208.
- Walsh, G. (2000). Biopharmaceutical benchmarks, *Nat. Biotechnol.* **18**: 831-3.
- Walsh, G. (2005). Therapeutic insulins and their large scale manufacture, *Appl Microbiol. Biotechnol.* **67**: 151-9.
- Wandrey, C., Liese A., Kihumbu D. (2000). Industrial biocatalysis: past, present, and future. *Org. Proc. Res. Develop.* **4**: 286-90.
- Wang, Y.F., Yakovlevsky, K, Margolin, A.L. (1996). An efficient synthesis of chiral amino acid and peptide alkylamides via CLEC-subtilisin catalyzed coupling and in situ resolution. *Tetrahedron Lett.* **37**:5317-5320.
- Wang, Y.F., Yakovlevsky, K, Zhang. B., Margolin. A.L. (1997). Cross-linked crystals of subtilisin: versatile catalyst for organic synthesis. *J. Org. Chem.* **62**:3488–3495.
- Wegman, M., Janssen, M., van Rantwijk, F. (2001). Towards biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. *Adv. Synth. Catal.* **343**: 559-76.
- Wehofsky, N., Wespe, C., Cerovsky, V., Pech, A., Hoess, E., Rudolph, R., Bordusa, F. (2008). Ionic liquids and proteases: a clean alliance for semisynthesis. *ChemBioChem* **9**: 1493-9.
- Wescott, C.R., Klibanov, A.M. (1994). The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **1206**:1-9
- Williams, D.C., Sgarbieri, V.C., Whitaker, J.R. (1968). Proteolytic activity in the genus *Ficus*. *Plant Physiol.* **43**:1083-1088.
- Wilson, L., Illanes, A., Pessela, B.C.C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2004). Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel

- biocatalyst in organic media. *Biotechnology and Bioengineering*, **86**: 558–562
- Witte, K., Sears, P., Martin, R., Wong, C.H. (1997). Enzymatic glycoprotein synthesis: preparation of ribonuclease glycoforms via enzymatic glycopeptide condensation and glycosylation. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 2114-8.
- Woodley, J.M. (2008). New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Tibtech*. **26**:321-327
- Woodyer, R., van der Donk, W.A., Zhao H. (2006). Optimizing a biocatalyst for improved NAD(P)H regeneration: directed evolution of phosphite dehydrogenase. *Comb. Chem.* **9**: 237-45.
- Xing, G.W., Li, F.Y., Ming, C., Ran, L.N. (2007). Peptide bond formation catalyzed by α -chymotrypsin in ionic liquids. *Tetrahedron Lett*, **48**: 4271-4274.
- Xu, K., Klivanov, A.M. (1996). pH control of the catalytic activity of cross-linked enzyme crystals in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 9815-9.
- Yang, L., Dordick, J.S., Garde, S. (2004). Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophys. J.* **87**: 812-21.
- Yang, Z., Pan, W. (2005). Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **37**: 19-28.
- Yu, J., Ju, H. (2002). Preparation of Porous Titania Sol–Gel Matrix for Immobilization of Horseradish Peroxidase by a Vapor Deposition Method. *Anal. Chem.* **74**: 3579-3583.
- Zhang Q., Tang, B., Fang, L., Zhang, C. (2006). Immobilized enzyme for pesticide degrading on polypropylene loaded TiO₂ membrane. *Trans. CSAE* **22**: 19.

Fitoproteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica en medios acuoso-orgánicos

C A P Í T U L O 1



Estabilidad de peptidasas en mezclas de solventes Medidas de actividad enzimática

En este **primer capítulo** se describe el material enzimático empleado en el presente trabajo, la puesta a punto de técnicas realizada para evaluar su actividad y los estudios sobre los efectos sobre esos materiales de la exposición a solventes orgánicos.

En la primera parte titulada: “*Selección de fuentes enzimáticas, sustratos y diseño de protocolos*” se describe la investigación sobre las distintas fuentes de extractos crudos de papaína y de araujaína, la puesta a punto de técnicas para la medida de actividad enzimática y la selección de las mejores fuentes enzimáticas.

En la segunda parte, titulada: “*Medios para síntesis orgánicas*”, se detalla el efecto sobre las distintas fuentes enzimáticas empleadas del uso de varios solventes. Con las fuentes seleccionadas en la primera parte, se sistematizó el estudio de la estabilidad con el enfoque en tres solventes miscibles (acetonitrilo, dimetilformamida y metanol) a diferentes tiempos de incubación y a diferentes proporciones del solvente.

Por último, se analiza el comportamiento de papaína pura y se comparan estos resultados con los obtenidos a partir de los extractos crudos.

Índice:

1.1. Experimental	71
1.1.1. Selección de fuentes enzimáticas, sustratos y diseño de protocolos ...	71
1.1.1.1. Extractos Enzimáticos. Obtención	71
1.1.1.2. Sustratos	71
1.1.1.3. Protocolos.....	72
1.1.1.3.1. Medidas de actividad amidásica. Uso del PFLNA	72
1.1.1.3.1.1. Papaína comercial.....	72
1.1.1.3.1.2. Papaína cruda obtenida en el laboratorio.....	72
1.1.1.3.1.3. Araujiaína	72
1.1.1.3.2. Medidas de actividad proteolítica. Uso de caseína.....	73
1.1.2. Acción de los solventes sobre los extractos enzimáticos	73
1.1.2.1. Ensayos de estabilidad en dioxano e isooctano	73
1.1.2.2. Ensayos de estabilidad en ACN, DMF y MeOH	74
1.1.2.2.1. Ensayos de estabilidad en medios con alta y mediana proporción acuosa	74
1.1.2.2.2. Ensayos de estabilidad en medios con baja proporción acuosa.....	74
1.1.2.2.3. Electroforesis desnaturalizante.....	75
1.1.2.3. Estabilidad en ACN, DMF y MeOH de papaína pura	75
1.2. Resultados y discusión.....	76
1.2.1. Medidas de actividad enzimática.....	76
1.2.1.1. Medidas de actividad amidásica. Uso del PFLNA	76
1.2.1.2. Medidas de actividad proteolítica. Uso de caseína	77
1.2.2. Acción de los solventes sobre los extractos enzimáticos	78
1.2.2.1. Selección de solventes	78
1.2.2.2. Ensayos de estabilidad en solventes.....	79
1.2.2.2.1. Ensayos de estabilidad en dioxano e isooctano	80
1.2.2.2.2. Estabilidad en ACN, DMF y MeOH	81
1.2.2.2.2.1. Ensayos de actividad residual.....	81
1.2.2.2.2.2. Electroforesis.....	85
1.2.2.2.3. Estabilidad en ACN, DMF y MeOH de papaína pura.....	86
1.3. Conclusiones	88
1.4. Bibliografía	90

1.1. Experimental

1.1.1. Selección de fuentes enzimáticas, sustratos y diseño de protocolos

1.1.1.1. Extractos Enzimáticos. Obtención

Se utilizaron extractos crudos vegetales preparados en nuestro laboratorio. Los mismos se obtuvieron a partir de látex de frutos verdes de *Araujia hortorum* y de *Carica papaya*. Los frutos de *Carica papaya* fueron recolectados en Libertador General San Martín, provincia de Jujuy. Se extrajo el látex mediante incisiones superficiales de estos frutos. Luego, el látex se secó bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura y fue enviado a nuestro laboratorio.

Los frutos de *Araujia hortorum* Fourn. (los nombres tradicionales en Argentina son: *tasi*, *doca*, *isipó de leche*) fueron obtenidos de plantas crecidas en Arana, La Plata, provincia de Buenos Aires. La extracción de látex se hizo de la misma forma pero no se realizó el proceso de secado.

El látex fresco de *Araujia hortorum* (Obregón y col., 2006) y el seco de *Carica papaya* se recogieron en buffer de ácido cítrico - citrato 0,1 M pH 4,5 con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM. Los materiales insolubles se descartaron mediante una centrifugación a 9600×g a 4°C durante 30 min. Los extractos crudos obtenidos a partir de *Araujia hortorum* (**ara**) y de *Carica papaya* (**pap L**) fueron liofilizados y almacenados a 4°C, para su mejor conservación.

1.1.1.2. Sustratos

Caseína. Esta abundante proteína de leche bovina es un sustrato muy utilizado para cuantificar la actividad proteolítica de diversas proteasas. La caseína resulta uno de los sustratos de elección para medir actividad proteolítica de enzimas libres (Morcelle del Valle y col., 2009). No así con enzimas inmovilizadas, ya que por su gran tamaño existirán problemas de difusión que dificultarían el acceso de las enzimas al sustrato (Hayashi e Ikada, 1991). La actividad resultante se expresa como *Unidades caseinolíticas* (U_{cas}), definidas como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones del ensayo (Priolo y col., 1991).

PFLNA. Este sustrato sintético es de gran aplicación para proteasas cisteínicas, en particular es específico para las del tipo de la papaína. Sin embargo tiene un alto costo por lo que esto limita su uso en determinadas circunstancias. El PFLNA (L-piroglutamil-L-

fenilalanil-L-leucil *p*-nitroanilida) es un sustrato cromogénico tripeptídico. Al actuar la enzima libera el grupo *p*-nitroanilina (cromóforo) lo que produce en el medio el incremento de la absorbancia a 410 nm a medida que aumenta su concentración (Filippova y col, 1984).

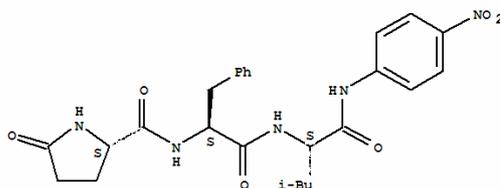


Figura 1. Estructura del PFLNA

1.1.1.3. Protocolos

1.1.1.3.1. Medidas de actividad amidásica. Uso del PFLNA

1.1.1.3.1.1. Papaína comercial

Se realizaron varios ensayos de actividad con PFLNA de papaína cruda comercial Fluka (**pap F**). En función de poner a punto el procedimiento se ensayaron las distintas condiciones mostradas en la **Tabla 1**. Para medir la actividad se usó el protocolo de la **Tabla 3**.

Concentración del extracto crudo	1, 1,5, 2,5 y 25 mg/ml
Concentración de DTT	7 y 11,7 mg/ml
Tiempo de incubación	entre 0 y 10 min
Concentración de sustrato	1, 2 y 3 mM

Tabla 1. Condiciones para los ensayos de actividad de **pap F** con PFLNA

1.1.1.3.1.2. Papaína cruda obtenida en el laboratorio

Se ensayaron distintas condiciones, mostradas en la **Tabla 2**, para medir actividad amidásica del extracto crudo de papaína obtenido en el LIPROVE (López y col., 2005) (**pap L**). Se usó el protocolo de **Tabla 3**.

Concentración del extracto crudo	0,5 y 1 mg/ml
Tiempo de incubación	entre 0 y 10 min
Concentración de sustrato	1, 2 y 3 mM

Tabla 2. Condiciones para los ensayos de actividad de **pap L** con PFLNA

1.1.1.3.1.3. Araujiaína

En función de los resultados obtenidos con papaína se replicaron las mismas condiciones de ensayo de la **Tabla 2** para medir la actividad del extracto de *Araujia hortorum* (**ara**). En estos ensayos también se siguió el protocolo de la **Tabla 3**.

Componentes de la mezcla de reacción	Volumen
Muestra de papaína en buffer BB DTT 45 mM	200 µl
Sustrato: PFLNA en DMSO	180 µl
Buffer fosfatos 0,1 M pH 6,5 KCl 0,3 M EDTA 1 mM DTT	1,42 ml
Incubación a distintos tiempos a 37°C	
HAc 30%	0,5 ml
Lectura de absorbancia a 405nm	

Tabla 3. Protocolo para la medida de actividad amidásica con **pap F**, **pap L** y **ara**

1.1.1.3.2. Medidas de actividad proteolítica. Uso de caseína

En función de los resultados obtenidos usando como sustrato PFLNA y considerando las ventajas de la caseína como sustrato se realizaron ensayos de actividad siguiendo el protocolo de la **Tabla 4** para soluciones de **pap L** y **ara**.

Componentes de la mezcla de reacción	Volumen
Muestras de enzima	0,1 ml
Sustrato: Caseína 1% en buffer Tris HCl 0,1M Cys 5 mM pH 8,5	1,1 ml
Incubación a distintos tiempos a 37°C	
Acido tricloroacético 5%	1,8 ml
Almacenamiento por 30 min a 4°C	
Centrifugación a 5000 rpm durante 30 min	
Medida de la absorbancia del sobrenadante a 280 nm.	

Tabla 4. Protocolo para la medida de actividad caseinolítica

1.1.2. Acción de los solventes sobre los extractos enzimáticos

1.1.2.1. Ensayos de estabilidad en dioxano e isooctano

Se realizaron ensayos de estabilidad en dioxano e isooctano de los extractos enzimáticos **pap L** y **ara** midiendo sus actividades amidásicas residuales. El dioxano es miscible con el agua, no así el isooctano.

Se usaron distintas proporciones de solvente y se desarrollaron incubaciones durante distintos tiempos hasta las 24 hs Las condiciones de incubación se muestran en la **Tabla 5**.

Soluciones enzimáticas	5 mg/ml (en isooctano es 5 mg/ml en la fase acuosa)
Proporción de solventes	30, 50 y 70%
Tiempos de incubación	0, 3, 6, 24 hs

Tabla 5. Condiciones de incubación de las muestra enzimáticas en dioxano e isooctano.

Por último, se midió la actividad amidásica residual con PFLNA usando el protocolo descrito en la **Tabla 3**.

1.1.2.2. Ensayos de estabilidad en ACN, DMF y MeOH

Se sometió a los dos extractos enzimáticos obtenidos en nuestro laboratorio (**pap L y ara**) a incubación en mezclas acuoso-orgánicas conteniendo ACN, DMF y MeOH en un rango de proporciones comprendido entre 30 y 99% v/v de solvente orgánico. Se realizaron medidas de actividad residual de las muestras a distintos tiempos de incubación. Asimismo, en algunos casos se efectuó un análisis electroforético de las muestras incubadas, según se describe a continuación.

1.1.2.2.1. Ensayos de estabilidad en medios con alta y mediana proporción acuosa

Preparaciones de 0,1% (p/v) de cada extracto crudo liofilizado fueron disueltas en diferentes mezclas de solventes acuoso-orgánico y se dejaron incubando en estufa a 37°C, agitando a 200 rpm en agitador orbital. De cada tubo se tomaron muestras de 0,1 ml a los siguientes tiempos: 0, 3, 6 y 24 hs. Las mezclas de solventes usadas fueron: buffer BB 0,1 M pH 8,5 con ACN, DMF o MeOH. Las proporciones de buffer acuoso:solvente orgánico fueron de 30:70, 50:50 y 70:30. Simultáneamente, se hizo un blanco de estabilidad empleando como medio buffer acuoso sin agregado de solventes. Se midió la actividad caseinolítica siguiendo el protocolo descrito en la **Tabla 4**.

1.1.2.2.2. Ensayos de estabilidad en medios con baja proporción acuosa

Se ensayó la estabilidad de preparaciones iguales a las de los ensayos descritos en el punto anterior, en los mismos solventes, pero usando las proporciones 90:10 y 99:1 de solvente orgánico a buffer BB.

Se pesó en varios tubos la masa adecuada de extracto enzimático y se agregó a cada uno las distintas mezclas de solvente hasta el volumen necesario para lograr la concentración deseada (0,1% p/v). Se dejó incubando en iguales condiciones que el ensayo anterior. Se retiraron tubos a los distintos tiempos estipulados (0, 1, 3, 6 y 24 hs.). Como en

todos los tubos se formó precipitado se procedió a centrifugar los mismos a 3900×g, durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se descartó el sobrenadante y se redisolvió el precipitado en el volumen adecuado de buffer Tris HCl 0,1M Cys 5 mM pH 8,5. Se midió la actividad caseinolítica siguiendo el protocolo descrito en la **Tabla 4**.

1.1.2.2.3. Electroforesis desnaturalizante

Se realizaron electroforesis desnaturalizantes a muestras de **pap L** y **ara** incubadas 0, 3, 6 y 24 hs. en mezclas de buffer:ACN y buffer:MeOH 50:50.

La técnica empleada fue electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) al 10% según el método de Shägger y von Jagow (1987), utilizando tricina en el buffer catódico.

Las muestras se prepararon mediante precipitación acetónica y redisolución de los precipitados en buffer de muestra (conteniendo SDS y β-mercaptoetanol) con iodoacetato de sodio como inhibidor de las proteasas (30 mM). Se obtuvieron muestras de alrededor de 2 mg/ml. Se sembraron 5 µl de cada muestra junto a patrones de peso molecular Amersham Low Molecular Weight, GE Healthcare. Las condiciones de corrida fueron: 40 V para el gel de stacking y 150 V para el gel de resolución. Las bandas de proteínas en los geles fueron visualizadas mediante la tinción con Coomassie Brilliant Blue G-250 (tinción de Coomassie coloidal).

1.1.2.3. Estabilidad en ACN, DMF y MeOH de papaína pura

El extracto **pap L** fue purificado en nuestro laboratorio según el método de Baines y Brocklehurst (1979) modificado (Llerena-Suster y col., 2011, ver Capítulo 2). Sobre esta papaína purificada se realizaron medidas de estabilidad en medios conteniendo ACN, MeOH y DMF en altas proporciones (90 y 99% v/v) en solución acuosa de buffer BB.

Para cada ensayo, por triplicado, se precipitaron en frío con 5 volúmenes de acetona 150 µl de la solución de papaína pura. Se dejó decantar durante 30 minutos en frío y se centrifugó. Posteriormente se separó el solvente y se secó en vacío. Los precipitados se redisolviéron en cada una de las mezclas acuoso-orgánicas elegidas y se los incubó durante distintos tiempos (1 y 24 hs) a 37°C. Después de la incubación las muestras se centrifugaron, se separaron los solventes y se redisolviéron en 375 µl de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5.

Sobre las soluciones resultantes se determinó concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y el de actividad caseinolítica descrito en la **Tabla 4**.

1.2. Resultados y discusión

1.2.1. Medidas de actividad enzimática

1.2.1.1. Medidas de actividad amidásica. Uso del PFLNA

A partir de los ensayos de actividad a distintos tiempos, distintas concentraciones de sustratos, DTT y enzimáticas de los tres extractos usados se seleccionaron las condiciones óptimas de reacción de cada uno. En la **Figura 2** se graficaron curvas de μ moles de producto en función del tiempo, a partir de las mismas se seleccionaron los tiempos adecuados para las reacciones amidásicas.

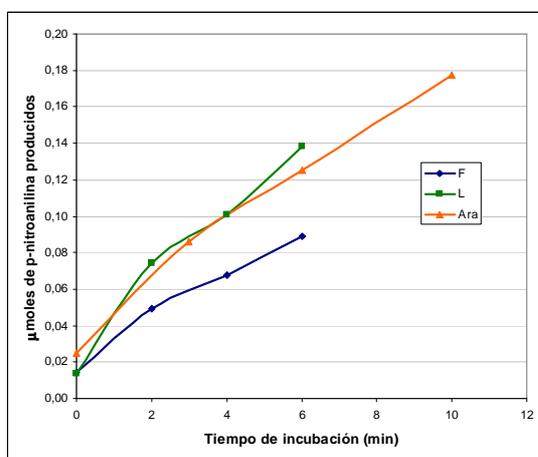


Figura 2. F: pap F (1mg/ml); L: pap L (0,5 mg/ml); ara (0,5 mg/ml).

La papaína obtenida en nuestro laboratorio (**pap L**) presentó altos rendimientos y bajo costo en comparación con las fuentes comerciales. Además se sabe que en la composición del extracto, los únicos componentes presentes son los que naturalmente están en el látex de los frutos, mientras que desconocemos si la preparación comercial contiene agregados, conservantes u otras sustancias. En base a estas características se eligió la primera como fuente de papaína para los distintos ensayos presentados en esta tesis.

Las condiciones óptimas y los resultados de actividad en esas condiciones para los tres extractos enzimáticos se resumen en la **Tabla 6**.

Por otra parte, el extracto de araujaína (**ara**), más allá de ser la única fuente disponible localmente, da resultados tan buenos como la papaína, resultando una interesante alternativa de enzimas por la mayor disponibilidad de frutos en la zona.

	pap F	pap L	ara
Concentración de crudo (mg/ml)	1	0,5	0,5
Tiempo (min)	6	6	6
Concentración de sustrato (mM)	2	2	2
Absorbancia a 405nm	0,349	0,564	0,505
Actividad específica (UI/mg extr. crudo)	0,074	0,231	0,208

Tabla 6. Condiciones óptimas para las medidas de actividad amidásica de los extractos enzimáticos.

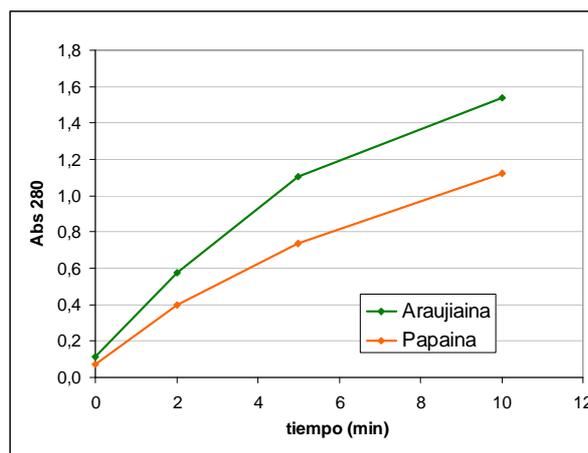


Figura 3. Actividad caseinolítica expresada como cambios en la absorbancia a 280 nm en función del tiempo.

1.2.1.2. Medidas de actividad proteolítica. Uso de caseína

En la **Tabla 7** se muestran las condiciones óptimas para pap L y Ara, obtenidas a partir de la **Figura 3**.

	pap L	ara
Concentración de crudo (mg/ml)	1	1
Tiempo (min)	4	4
Absorbancia a 280 nm	0,600	0,960
Actividad específica (U_{cas}/mg extracto)	1,5	2,4

Tabla 7. Condiciones óptimas de actividad caseinolítica para los extractos enzimáticos.

Dado los altos valores de absorbancia, se puede disminuir la concentración de las soluciones (hasta 0,5%). En ese caso podremos aumentar el tiempo sin perder linealidad.

1.2.2. Acción de los solventes sobre los extractos enzimáticos

1.2.2.1. Selección de solventes

Revisando lo visto en la sección 1.5.1. de la Introducción sobre ingeniería de medios podemos resumir que algunas de las razones para elegir un solvente como componente del medio en reacciones catalizadas enzimáticamente son:

- que sea buen disolvente de sustratos y o productos de la reacción
- que tenga un bajo costo y fácil disponibilidad
- que sea poco contaminante
- que sus efectos sobre las enzimas sean positivos o nulos en el tiempo de reacción

En estos ensayos se eligieron tres solventes principales con los que se desarrolló un estudio exhaustivo del comportamiento de las proteasas: el ACN, el MeOH y el DMF. Los estudios con estos solventes se continúan en el Capítulo 2. Además se hicieron algunos ensayos usando otros solventes, tales como isooctano y dioxano.

El ACN es un líquido de baja densidad y viscosidad capaz de mezclarse con numerosas sustancias, entre ellas el agua. Por otra parte tiene una relativamente alta constante dieléctrica por lo que puede disolver incluso sustancias iónicas. Es un solvente ideal para la cromatografía líquida, dadas su baja viscosidad y reactividad. Su baja reactividad y su gran capacidad disolvente lo transforman en un solvente apropiado como medio de reacción. En ese sentido, el ACN tiene numerosas aplicaciones industriales.

El MeOH también es un líquido de baja densidad y viscosidad. A diferencia del ACN, no es un solvente aprótico. Se lo utiliza como disolvente, gracias a su gran capacidad de disolver distintas sustancias, pero también como combustible y anticongelante. Es mucho más reactivo que el ACN, pero también se lo suele usar como solvente en cromatografía líquida. Tiene numerosos usos industriales.

La DMF es un líquido con densidad y viscosidad levemente mayor que el ACN y el MeOH, pero menores que el agua. Al igual que ellos es completamente miscible en agua y es capaz de disolver variadas sustancias tales como hidratos de carbono debido a su alta constante dieléctrica. Además posee una temperatura de ebullición elevada. Gracias a sus características presenta numerosas aplicaciones industriales.

El 1,4-dioxano es un solvente miscible en agua, volátil y se lo suele usar como disolvente. El isooctano es un solvente inmiscible con el agua. Es inflamable, tiene baja densidad y es una de las fracciones de la nafta

Estos solventes ya han sido usados en reacciones de síntesis orgánica catalizadas por hidrolasas. El ACN fue parte del medio de reacción de distintas proteasas vegetales (Morcelle y col., 2006, 2009) y lipasas microbianas (Zhao y col, 2005), entre otras enzimas. El MeOH ha sido componente del medio de reacción de la proteasa pseudolisina (Rival y col., 2000). A pesar de sus efectos nocivos sobre las enzimas, la DMF fue el medio de reacción de subtilisina (Cai y col., 1992; Riva y col. 1988) y de una proteasa alcalina bacteriana (Pedersen y col., 2003). El isooctano fue usado en sistemas micelares con distintas proteasas (Chen y col., 1999).

1.2.2.2. Ensayos de estabilidad en solventes

Dada la potencialidad del uso de solventes orgánicos en síntesis enzimática, descrito en la Introducción, resulta útil el estudio de la estabilidad de enzimas, en particular de las proteasas que vamos a utilizar, en medios conteniendo este tipo de solventes.

La forma más simple y directa para conocer y cuantificar la estabilidad es a través de la medida de la actividad enzimática residual. Para ello, se debe usar un sustrato adecuado para la enzima en cuestión y medir la actividad tanto antes como a distintos tiempos incubación en el solvente. Por otra parte, existen una gran variedad de métodos más complejos para evaluar la estabilidad, como las técnicas que dan información acerca de la estructura de las enzimas. Entre ellas el dicroísmo circular, la calorimetría diferencial de barrido, medidas de espectroscopía de fluorescencia y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR); estas dos últimas se utilizaron en los ensayos descritos en el Capítulo 2.

Varios estudios han usado medidas de actividad residual para determinar la estabilidad de proteasas luego de que fueran incubadas en mezclas acuoso-orgánicas. Entre ellos, la estabilidad de papaína fue estudiada usando medidas de actividad caseinolítica luego de incubar en mezclas conteniendo ACN, tetrahidrofurano (THF), dioxano y MeOH (Szabó y col., 2006). La estabilidad de araujaína, usando también caseína como sustrato, fue ensayada luego de haberla incubado en mezclas acuosas con hexano y DMF (Quiroga y col., 2007). La estabilidad de las proteasas vegetales, araujaína, funastraína y papaína fue evaluada luego de incubarlas hasta cuatro horas en mezclas de 13 solventes orgánicos inmiscibles determinando la actividad caseinolítica residual (Barberis y col., 2006). La estabilidad de tripsina, quimotripsina, lipasa pancreática y carboxipeptidasa mediante actividad con los sustratos sintéticos BAEE (éster éflico de N^{α} -benzoil arginina), ATEE

(éster etílico de *N*-acetiltirosina), hipuril fenilalanina fue analizada luego de que se incubaran en mezclas con ACN, metanol y dioxano (Simon y col., 1998). La estabilidad de pepsina porcina en mezclas con los mismos solventes fue determinada mediante actividad con hemoglobina como sustrato (Simon y col., 2007), en tanto que la estabilidad de quimotripsina fue medida empleando ATEE luego de su incubación en mezclas conteniendo ACN, MeOH, DMF, dioxano y THF (Kijima y col., 1996).

1.2.2.2.1. Ensayos de estabilidad en dioxano e isooctano

En función de los resultados de actividad enzimática de los extractos, se desarrollaron los ensayos de estabilidad en mezclas acuoso-orgánicas con dioxano e isooctano en distintas proporciones.

Los resultados de actividad residual se muestran en la **Figura 4**. La incubación en dioxano produjo una rápida caída de la actividad residual en todos los casos. Esta disminución en papaína fue inmediata: los resultados a tiempo 0 fueron de 50% (30% v/v de dioxano) y de 10% (70% v/v de dioxano), considerando 100% la actividad en buffer. A tiempos más largos, se vio que la disminución llegó a valores de actividad nula. Esto sucedió antes de las 3 hs para 50 y 70% de solvente, y después de las 6 hs para el 30% del mismo. Araujiaína resultó ser más resistente a tiempos cortos de incubación. En este caso se observó mayor efecto negativo a medida que se incrementó la proporción del solvente orgánico y se puso de manifiesto una caída absoluta de actividad luego de las 24 hs de incubación en todos los casos.

De acuerdo a estos resultados el dioxano demostró ser un solvente altamente perjudicial para las enzimas y, por lo tanto, es probable que no resulte un medio adecuado para los ensayos de síntesis. Sin embargo, en estudios realizados por Szabó y col. (2006), papaína a tiempos cortos de incubación (20 min) retuvo alrededor de un 90% de su actividad caseinolítica inicial en medios conteniendo hasta un 80% de dioxano, demostrando tener así buena estabilidad. La actividad residual de otras proteasas, como tripsina y quimotripsina se medida con BAEE y ATEE, respectivamente, se mantuvo elevada (por encima de un 80% de la actividad inicial) en presencia de dioxano en proporciones comprendidas entre 20 y 80% luego de se incubadas durante 20 min (Simon y col., 1998). Pepsina porcina mantuvo su actividad hemoglobínica residual en medios conteniendo hasta un 30% de dioxano, en tanto que entre 30 y 60% de dicho solvente descendió drásticamente hasta cero (Simon y col., 2007). Las diferencias con los estudios realizados donde la actividad enzimática decayó rápidamente a valores menores del 50%, es posible atribuirlos a un efecto nocivo de

contaminantes del solvente orgánico que resultan poderosos inhibidores de la actividad enzimática.

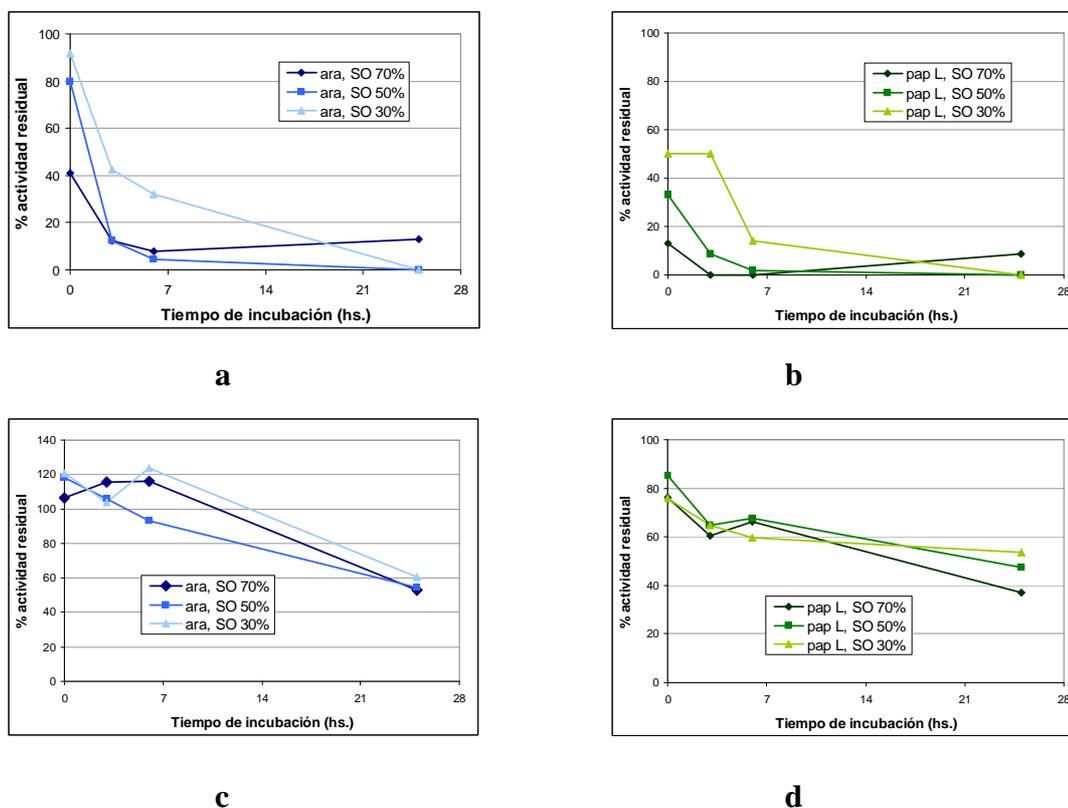


Figura 4. Porcentaje de actividad residual de los extractos enzimáticos en mezclas de buffer acuoso y solvente orgánico a distintos tiempos de incubación. **a.** Ara en mezclas conteniendo dioxano. **b.** Pap L en mezclas conteniendo dioxano. **c.** Ara en mezclas conteniendo isooctano. **d.** Pap L en mezclas conteniendo isooctano.

La incubación en isooctano dio resultados totalmente distintos. Para ninguno de los dos extractos enzimáticos se vieron diferencias significativas al cambiar la proporción del solvente. Este comportamiento podría deberse a que, sin importar dicha proporción, la fase acuosa contendrá a las enzimas solubilizadas y estará saturada en isooctano. Además se vio que la actividad no disminuyó significativamente hasta las primeras 6 hs, en tanto que a las 24 hs la actividad original disminuyó sólo hasta un 60%. Este descenso es atribuible a la desnaturalización enzimática en la interfase incrementada por la agitación durante la incubación, más que a efectos del solvente.

1.2.2.2.2. Estabilidad en ACN, DMF y MeOH

1.2.2.2.2.1. Ensayos de actividad residual

Se determinó el efecto de distintas proporciones de ACN, MeOH y DMF sobre la actividad de los extractos enzimáticos **pap L** y **ara**. Además de las proporciones 30, 50 y 70% v/v, se usaron mezclas con altas proporciones de solvente orgánico (90 y 99% v/v). Como se describió en la sección 1.1.2.2.2, en los ensayos realizados en medios con altas proporciones de solventes orgánicos se usó un procedimiento diferente a los otros casos, debido a que en los mismos se producía la precipitación de las proteínas por lo que se dificultaba la toma de muestras homogéneas.

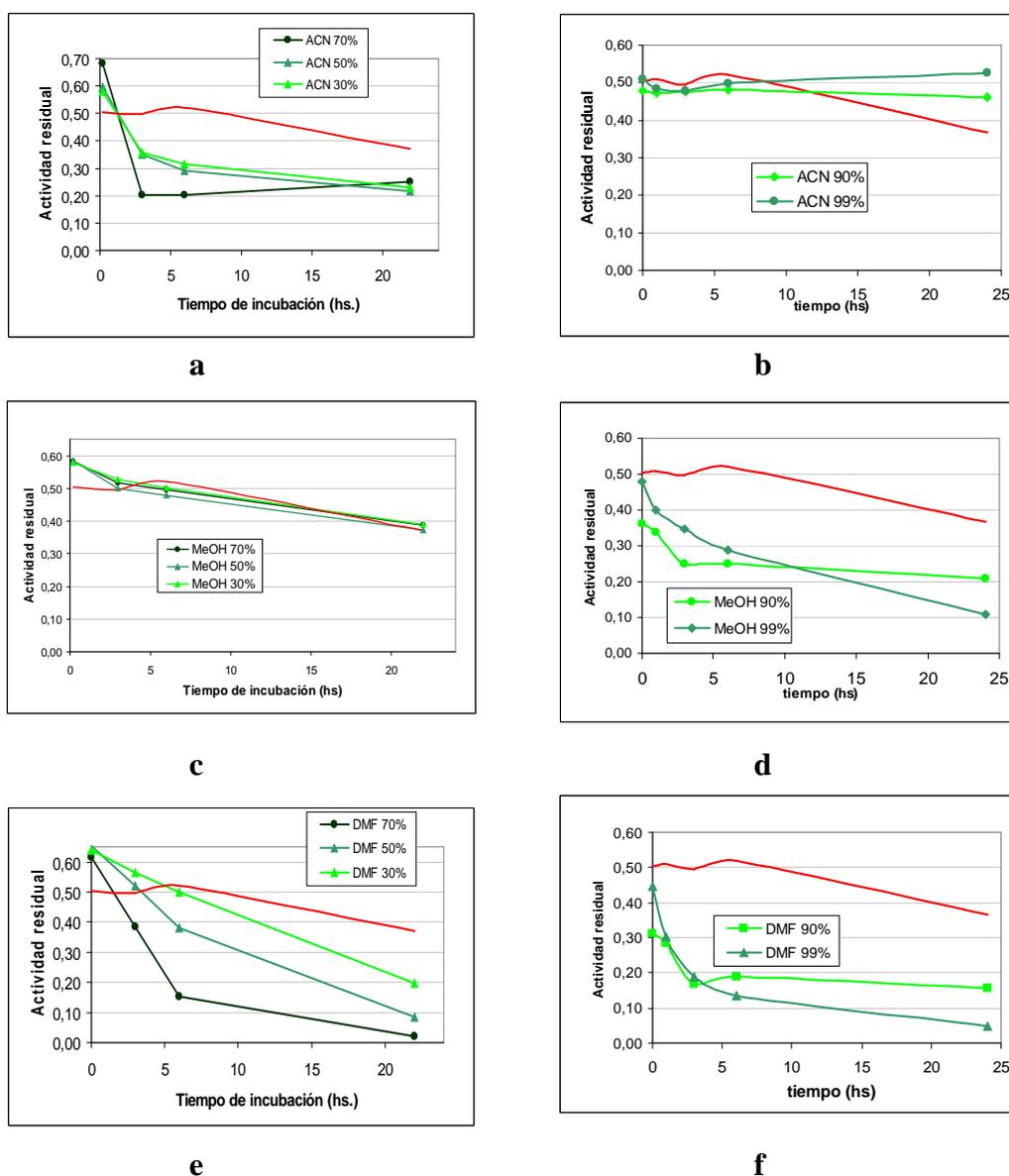
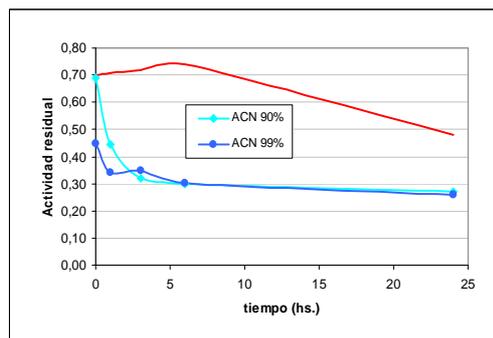
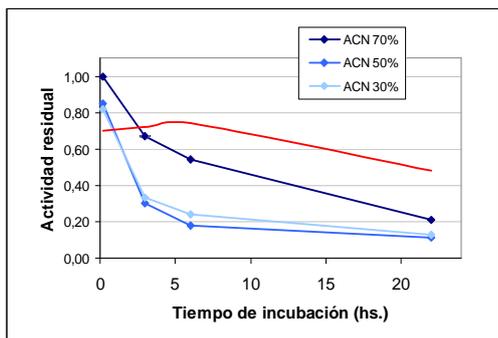


Figura 5. Actividad residual de **pap L** en función del tiempo de incubación para distintas proporciones de solvente orgánico. **a** y **b**. Incubación en ACN y en buffer (rojo); **c** y **d**. Incubación en MeOH y en buffer; **e** y **f**. Incubación en DMF y en buffer.

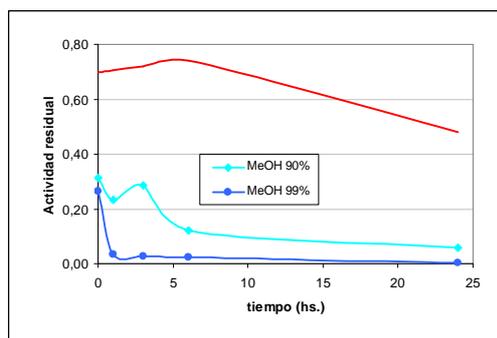
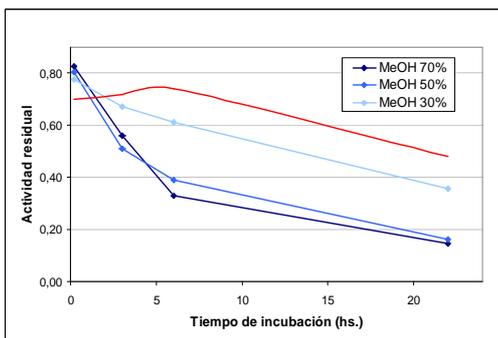
Se observó que papaína presentó comportamientos diferentes en los tres solventes empleados. En el caso de la incubación en medios con DMF (**Figuras 5e, 5f y 7b**), se puso de manifiesto una disminución en la actividad proporcional al contenido de solvente orgánico en el medio de reacción, hecho coincidente con lo observado para las velocidades iniciales de hidrólisis de ATEE por la proteasa quimotripsina (Kijima y col., 1996). En ACN se evidenció un descenso progresivo de la actividad hasta las 3 horas de incubación y luego la misma se estabilizó entre el 40 y 50% de su actividad original; este comportamiento se repitió para las distintas proporciones de este solvente (**Figura 5a**). Sin embargo, también se vio que la caída no sucede en tiempos cortos ($t = 0$), y que se mantendría al menos hasta los 20 min en valores de actividad elevados según estudios realizados en mezclas acuoso-orgánicas con ACN desde 10 hasta 70% v/v (Szabó y col., 2006). En cambio cuando las proporciones de ACN fueron de 90 y 99% se observó recuperación total de su actividad (**Figuras 5b y 7b**). Esta disminución de actividad en proporciones medias de ACN y aumento en proporciones mayores a 70% v/v fue observado también para quimotripsina (Partridge, 1999). Los ensayos de actividad en presencia de MeOH arrojaron resultados similares los observados en buffer (**Figura 5c**), lo que sugiere que MeOH no afectaría a la estabilidad de papaína, cuando se halla en bajas proporciones. Sin embargo en los ensayos a 90 y 99% de metanol papaína mostró un importante descenso de su actividad (**Figuras 5d y 7b**). El mismo efecto fue observado sobre papaína usando etanol en proporciones entre 10 y 90% v/v (Szabó y col., 2006).

En los ensayos con araujiáina la actividad proteolítica evidenció una disminución proporcionalmente mayor que papaína en buffer acuoso. La presencia de DMF ocasionó una caída en la actividad remanente proporcional al porcentaje de solvente en la mezcla (**Figura 6e**), excepto para el caso de 30% de DMF, en el que la disminución fue similar a la observada en buffer. En los casos de alta proporción de DMF la pérdida fue inmediata y total (**Figuras 6f y 7a**). Contrariamente, las mezclas conteniendo 70, 90 y 99 % de ACN tuvieron mayor retención de actividad que las de menores proporciones (**Figura 6a, 6b y 7a**). Para ambos solventes se observó un comportamiento similar al de papaína, aunque para araujiáina la retención de actividad en DMF 30% fue mayor, mientras que en ACN 90 y 99% fue menor. La actividad residual de araujiáina en las distintas mezclas con MeOH tuvo un perfil similar al obtenido en los medios con DMF, aunque la pérdida de la actividad en 70, 90 y 99% no fue tan notoria (**Figuras 6c, 6d y 7a**). En MeOH, araujiáina mostró una menor estabilidad que papaína.



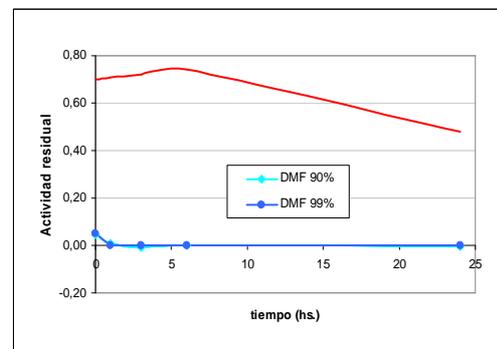
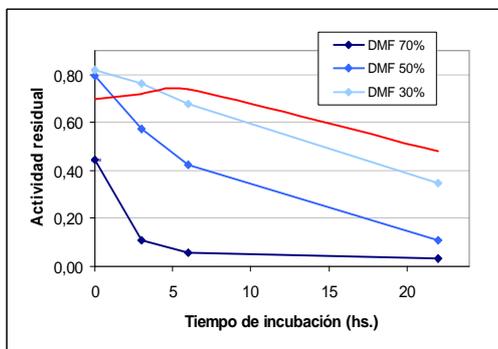
a

b



c

d



e

f

Figura 6. Actividad residual de *ara* en función del tiempo de incubación para distintas proporciones de solvente orgánico. **a** y **b**. incubación en ACN y en buffer (rojo); **c** y **d**. incubación en MeOH y en buffer; **e** y **f**. incubación en DMF y en buffer.

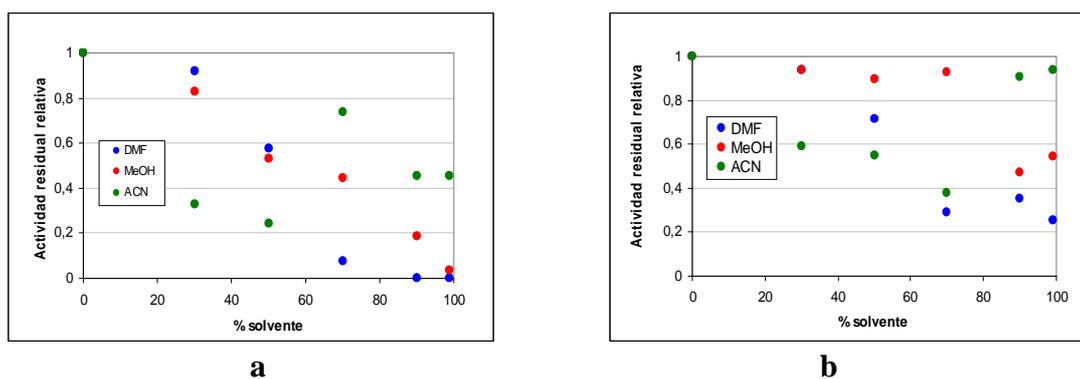


Figura 7.a. Actividad residual de **ara** luego de 6 hs. de incubación en medios conteniendo distintas proporciones (30, 50, 70, 90 y 99% v/v) de solvente orgánico. **b.** Idem para **pap L**.

1.2.2.2.2. Electroforesis

Para determinar si la pérdida de actividad biológica de las enzimas se debió al efecto de los solventes orgánicos sobre la misma o por una probable autodigestión, se realizaron electroforesis desnaturalizantes (SDS-PAGE). En la **Figura 8** se muestran los perfiles electroforéticos obtenidos para papaína en buffer acuoso (**Figura 8a**), mezcla ACN:buffer 50:50 (**Figura 8b**) y MeOH:buffer 50:50 (**Figura 8c**). Se vio en todos los casos que no hay variaciones en el perfil de bandas electroforéticas, lo que sugiere que papaína (banda correspondiente a 25 kDa, aproximadamente) no se autodigiere en ningún caso.

Para el caso de araujaína, se comprobó que el perfil electroforético permaneció invariable con el tiempo de incubación tanto en buffer acuoso (**Figura 9a**, calles 1, 2 y 3; **Figura 9b**, calles 6 y 7) como en MeOH:buffer 50:50 (**Figura 9a**, calles 5, 6, 7 y 8). Este resultado sugiere que la inactivación parcial de araujaína en buffer acuoso no se debió a autodigestión, sino al efecto de la temperatura de incubación. Por otro lado, se observó la desaparición de una banda de aproximadamente 15 kDa en la mezcla con 50% de MeOH. Esto pudo deberse a que el solvente favoreció el desplegamiento de esa proteína de 15 kDa presente en el extracto crudo de araujaína, facilitando así su digestión por las proteasas. Cuando araujaína fue incubada en presencia de acetonitrilo, pudo observarse que la banda de 25 kDa, correspondiente a la proteasa fue disminuyendo su intensidad a medida que aumentaba el tiempo de incubación (**Figura 9b**, calles 1, 2 3 y 4). Esto evidenciaría la autodigestión de la enzima. Asimismo, se vio la desaparición de la banda de 15 kDa y aparición e intensificación de bandas correspondientes a bajos pesos moleculares (menores de 14 kDa), que podrían deberse tanto a productos de degradación de la autodigestión de la proteasa como a la proteólisis de la banda de 15 kDa u otras proteínas presentes en el extracto.

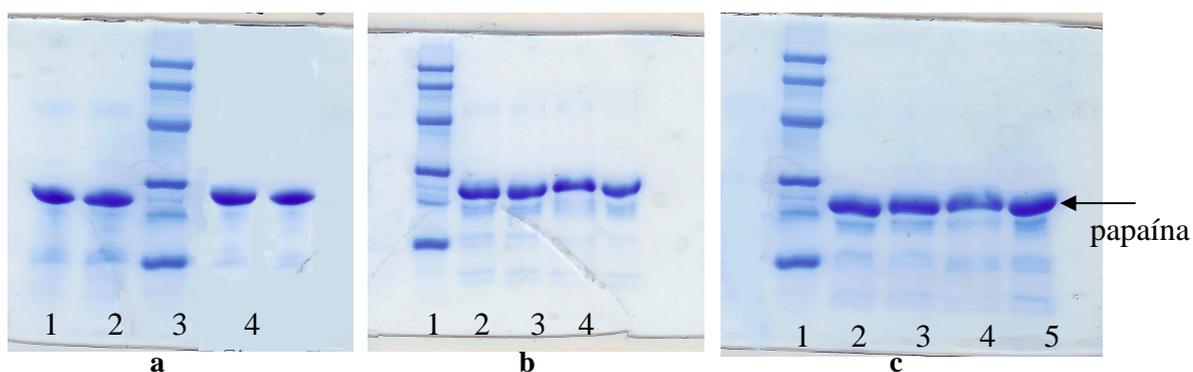


Figura 8. a. Estabilidad de papaína en buffer acuoso. **Calle 1:** 3 hs de incubación; **calle 2:** tiempo cero; **calle 3:** patrones de peso molecular; **calle 4:** 6 hs de incubación; **calle 5:** 24 hs de incubación. **b.** Estabilidad de papaína en acetonitrilo 50%. **Calle 1:** patrones de peso molecular. **calle 2:** tiempo cero; **calle 3:** 3 hs de incubación; **calle 4:** 6 hs de incubación; **calle 5:** 24 hs de incubación. **c.** Estabilidad de papaína en metanol 50%. **Calle 1:** patrones de peso molecular; **calle 2:** 24 hs de incubación; **calle 3:** 6 hs de incubación; **calle 4:** 3 hs de incubación; **calle 5:** tiempo cero. *Patrones de peso molecular:* fosforilasa b, 97,4 kDa; seroalbúmina bovina, 66,2 kDa; ovalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina: 21,5 kDa; lisozima: 14,4 kDa.

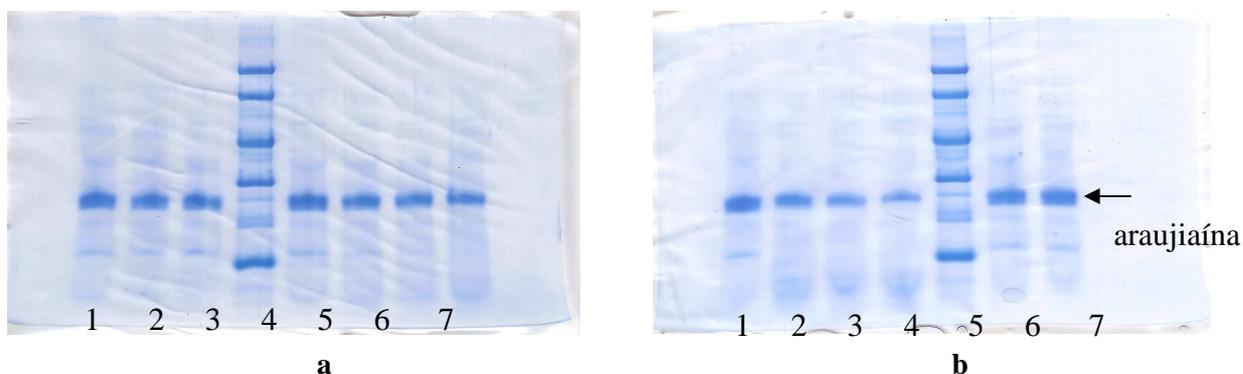


Figura 9. a. Estabilidad de araujaína en buffer acuoso (calles 1, 2 y 3) y en metanol (calles 5, 6, 7 y 8). **Calle 1:** tiempo cero; **calle 2:** 6 hs de incubación; **calle 3:** 24 hs de incubación; **calle 4:** patrones de peso molecular; **calle 5:** tiempo cero; **calle 6:** 3 hs de incubación; **calle 7:** 6 hs de incubación; **calle 8:** 24 hs de incubación. **b.** Estabilidad de araujaína en acetonitrilo 50% (calles 1, 2, 3, 4) y buffer acuoso (calles 6 y 7). **Calle 1:** tiempo cero; **calle 2:** 3 hs de incubación; **calle 3:** 6 hs de incubación; **calle 4:** 24 hs de incubación; **calle 5:** patrones de peso molecular; **calle 6:** tiempo cero; **calle 7:** 3 hs de incubación. *Patrones de peso molecular:* fosforilasa b, 97,4 kDa; seroalbúmina bovina, 66,2 kDa; ovalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina: 21,5 kDa; lisozima: 14,4 kDa.

1.2.2.2.3. Estabilidad en ACN, DMF y MeOH de papaína pura

Sabiendo la posible influencia de las demás proteínas contenidas en el extracto crudo, así como de otras sustancias del mismo, sobre la estabilidad de la papaína resulta necesario contar con ensayos para establecer analogías y diferencias entre lo que sucede en el extracto crudo y en la papaína pura al exponerlos al solvente. Por otro lado, la papaína es una proteasa prototipo que podría servir como modelo para interpretar el comportamiento de otras peptidasas estructuralmente similares en los medios propuestos.

Papaína se puede purificar a partir del extracto crudo mediante un procedimiento que se analizará en el Capítulo 2. Sin embargo, dado que la purificación realizada permitió la obtención de cantidades relativamente pequeñas de la enzima pura y además, la papaína pura comercial tiene un precio elevado, los ensayos de estabilidad de la papaína pura se limitaron a los medios conteniendo ACN, DMF y MeOH en altas proporciones, y sólo a 1 y 24 hs de incubación.

Las medidas de concentración de proteínas en las muestras incubadas mostraron que durante el procedimiento se pierde una parte importante de las mismas en los casos de las incubaciones en MeOH y en DMF en las dos proporciones usadas (90 y 99%). En dichas muestras quedó menos del 30% del contenido inicial, mientras que este valor fue superior al 90% en el caso de ACN. Esto podría deberse a que, en el caso del DMF, las proteínas no decantaron bien al centrifugar, dada las propiedades del solvente (densidad, viscosidad), por lo que en parte permanecieron en el sobrenadante orgánico. Por otro lado, en el caso del MeOH, las proteínas precipitadas formaron grandes agregados que podrían no estar disponibles para reaccionar con el colorante Coomassie-Blue del reactivo de Bradford, por lo que la concentración de proteínas calculada sería menor que la real. Este problema, que no se presentó en el caso de ACN como cosolvente, fue considerado al comparar las actividades enzimáticas calculando la actividad específica residual a partir de la actividad en relación a la concentración de proteínas en cada caso.

Los resultados mostraron que en ACN papaína conservó prácticamente toda su actividad proteolítica cuando fue incubada 1 y 24 hs, en tanto que MeOH 90% produjo una disminución de un 50% luego de 1 hora de incubación, y entre un 15 y 20% para los otros casos. Por último, a pesar de haber perdido gran parte de las proteínas en el proceso, se podría afirmar que en DMF la recuperación de actividad fue prácticamente nula en todos los casos (**Figura 10**).

Los resultados de actividad fueron coincidentes con los observados al realizar estas mismas pruebas usando extractos crudos en lugar de la papaína pura. Se podría deducir a partir de este hecho que, dadas las similitudes funcionales y estructurales de las demás proteasas del látex (quimopapaína, caricaína y glicil endopeptidasa) con la papaína (Barrett y col., 2004), el comportamiento en conjunto no difiere significativamente del exhibido por la enzima pura.

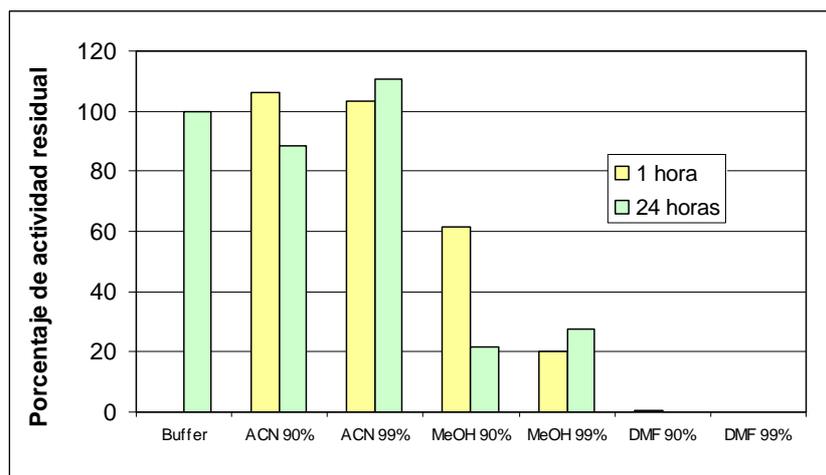


Figura 10. Porcentajes de actividad residual de papaína pura después de incubar 1 y 24 hs en distintos solventes.

1.3. Conclusiones

Se obtuvieron extractos enzimáticos de papaína y araujaína en buenas cantidades y a muy bajos costos, los que permitieron obtener medidas de actividad y estabilidad adecuadas para caracterizar el uso de estos extractos como potenciales biocatalizadores en reacciones en medios con solventes orgánicos.

Los ensayos de estabilidad en solventes mostraron resultados distintos para cada caso. En primera instancia, el empleo de isooctano, un solvente inmiscible con el agua, la estabilidad de papaína y araujaína fue igual a la observada en buffer acuoso, independientemente de la proporción de solvente; sólo luego de tiempos largos de incubación (24 hs) se vio un leve descenso.

Como solventes miscibles con agua fueron ensayados dioxano, ACN, MeOH y DMF. El primero de ellos resultó particularmente nocivo en proporciones del 30, 50 y 70% (v/v) para los dos extractos enzimáticos ensayados. En función de estos resultados y las discrepancias con los datos de bibliografía, no se profundizaron los estudios de estabilidad en medios con dioxano. Para los otros solventes, en cambio, se realizó un estudio mucho más exhaustivo. El mismo incluyó proporciones más altas de solvente (90 y 99%), ensayos electroforéticos y la medida de estabilidad sobre papaína pura.

Se pudo comprobar que papaína conserva hasta 80% de su actividad proteolítica cuando fue incubada en buffer y en MeOH al 30, 50 y 70% durante 24 hs. En mayores proporciones de MeOH, en cambio, se observaron disminuciones de hasta un 20 o 40%. La

presencia de DMF provocó la disminución de actividad enzimática proporcional al porcentaje del mismo: a mayor cantidad de solvente en el medio, menor actividad enzimática fue recuperada. El ACN en proporciones del 30, 50 y 70% provocó una pérdida de casi la mitad de la actividad original luego de 24 hs de incubación. Sin embargo, a proporciones mayores, se vio que retuvo toda su actividad. Las corridas electroforéticas permitieron comprobar que la pérdida de actividad no se debió a autodigestión sino al efecto del solvente. La presencia de los mismos afectaría la estructura de la enzima, disminuyendo su poder catalítico. Son interesantes los casos de ACN y metanol ya que la enzima muestra un comportamiento distinto en baja actividad acuosa (**Figura 3b**). Una hipótesis plausible indicaría que de alguna forma el medio de ACN con poca agua fue capaz de mantener estabilizadas a las proteínas estructuralmente, mientras que en las mezclas con menos ACN sufrieron una desnaturalización parcial (fenómeno de toxicidad molecular) (Vermue y Tramper, 1995).

La actividad de araujaína en buffer disminuyó hasta un 20% de su actividad original, probablemente por inactivación térmica, ya que no fue observada autoproteólisis por electroforesis. Por otro lado, los efectos de los solventes sobre araujaína fueron más drásticos que los observados sobre papaína. En presencia de 70% de DMF y MeOH se comprobó una pérdida muy marcada de la actividad después de 24 hs de incubación, en 90 y 99% fue total (**Figura 3a**). Contrariamente, se observó una menor pérdida de actividad en la mezcla más rica en ACN, además, al igual que en papaína se ve un comportamiento diferente entre las proporciones más bajas y las dos más altas; probablemente, altas concentraciones de este solvente estabilicen la estructura catalítica de araujaína. Por otro lado, se comprobó por electroforesis desnaturalizante que sí existe autodigestión marcada en las mezclas con 50% de ACN y MeOH. Este resultado justificaría parcialmente el descenso de la actividad proteolítica observada en estos casos para araujaína.

Ambos extractos demostraron, en términos generales, ser potenciales biocatalizadores para llevar a cabo reacciones en los solventes ensayados. Papaína resultó mejor, en ese sentido, que araujaína dada su mayor estabilidad. El ACN en todas las proporciones y el MeOH en proporciones bajas mostraron ser solventes relativamente benigno con las enzimas a diferencia del DMF, pudiendo ser solventes de elección a la hora de realizar ensayos biocatalíticos.

Por último, se determinó que el efecto de ACN, MeOH y DMF en altas proporciones no varía significativamente entre el extracto crudo de papaína y la enzima purificada. Se comprueba de esta forma que la similitud estructural existente entre las proteasas de látex

provoca que las mismas presenten un comportamiento similar en presencia de los solventes orgánicos ensayados.

1.4. Bibliografía

- Barberis, S., Quiroga, E., Morcelle, S., Priolo N., Luco, J.M. (2006). Study of phytoproteases stability in aqueous-organic biphasic systems using linear free energy relationships. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **38**: 95-103.
- Barrett, A., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (2004). Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, London, p. 3, 16, 278-284, 1051, 1072-1074.
- 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**: 248-254
- Cai, S., Hakomori, S., Toyokuni, T. (1992). Application of protease-catalyzed regioselective esterification in synthesis of 6'-deoxy-6'-fluoro- and 6-deoxy-6-fluorolactosides. *J. Org. Chem.*, **57**: 3431-3437
- Chen, Y.-X., Zhang, X.-Z., Chen, S.-M., You, D.-L., Wu, X.-X., Yang, X.-C., Guang, W.-Z. (1999). Kinetically controlled syntheses catalyzed by proteases in reverse micelles and separation of precursor dipeptides of RGD. *Enzyme Microb. Technol.* **25**:310-315
- Filippova, I. Yu., Lysogorskaya, E. N., Oksenoit, E. S., Rudenskaya, G. N., Stepanov, V. M. (1984). L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-*p*-nitroanilide—A chromogenic substrate for thiol proteinase assay. *Analytical Biochemistry*. **143**: 293-297
- Hayashi, T., Ikada, Y. (1991). Protease immobilization onto porous chitosan beads. *J. Appl. Pol. Sci.* **42**: 85-92
- Kijima, T., Yamamoto, S., Kise, H. (1996). Study on tryptophan fluorescence and catalytic activity of α -chymotrypsin in aqueous-organic media. *Enzyme and Microbial Technology*. **18** : 2-6
- Llerena-Suster, C.; Priolo, N.; Morcelle, S. (2011). Sodium tetrathionate effect on papain purification from different *Carica papaya* latex crude extracts. *Prep Biochem Biotech*, **41**: 107-121
- López, L.M.I.; Mercerat, J.R.; Briones-Martínez, R. (2005). Refined and Stabilized Papain for Industrial Use. Proceedings of the International Congress of Biotechnology and Agriculture BIOVEG 2005, Ciego de Ávila, Cuba, Feb. 7-11.
- Morcelle del Valle, S.R., Gomes, M.T.R., Vairo Cavalli, S.E. (2009). Caracterización bioquímica y estructural de proteasas. En Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales. (Caffini, N.O., ed.). 1a ed. - Buenos Aires, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Morcelle, S. R.; Barberis, S.; Priolo, N.; Caffini, N.O.; Clapés, P. (2006). Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funarium clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe. *J Molec Catal B: Enzymatic*. **41**: 117-124
- Morcelle, S. R.; Liggieri, C. S.; Bruno, M. A.; Priolo, N.; Clapés, P. (2009). Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *J Molec Catal B: Enzymatic*. **57**: 177-182
- Obregón, W. D., Curciarello, R., Caffini, N. O., Priolo, N. S. (2006). Hidrolytic Profile and isolation of the Proteolytic Components of Latex from *Araujia angustifolia* Fruits.. *Acta Farm. Bonaerense* **25**: 206-12
- Partridge, J., Moore, B.D., Halling, P.J., (1999). α -Chymotrypsin stability in aqueous-acetonitrile mixtures: is the native enzyme thermodynamically or kinetically stable under low water conditions? *J Molec Catal B: Enzymatic*, **6**: 11-20
- Pedersen, N.R., Wimmer, R., Matthiesen, R., Pedersen, L.H., Gessesse, A. (2003). Synthesis of sucrose laurate using a new alkaline protease. *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**: 667-673
- Priolo, N.; López, L.M.I.; Arribére, M.C.; Natalucci, C.L.; Caffini, N.O. (1991). New Purified Plant Proteinases for the Food Industry. *Acta Aliment.*, **20** : 189-196.
- Quiroga, E., Camí, G., Marchese, J., Barberis, S. (2007). Organic solvents effect on the secondary structure of araujiain hI, in different media. *Biochem. Eng. J.* **35**: 198-202.
- Riva, S., Chopineau, J., Kieboom, A. P. G., Klibanov, A. M. (1988). Protease-Catalyzed Regioselective Esterification of Sugars and Related Compounds in Anhydrous Dimethylformamide. *J. Am. Chem. SOC.* **110**: 584-589
- Rival, S., Saulnier, J., Wallach, J. (2000). On the Mechanism of Action of Pseudolysin: Kinetic

- Study of the Enzymatic Condensation of Z-Ala with Phe-NH₂. *Biocatal Biotrans* **17**: 417-429
- Schägger H , von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**: 368
- Simon, L.M., Kotormán, M., Szabo, A., Nemcsók, J., Laczko I. (2007). The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin. *Proc Bioch*, **42** : 909-912
- Simon, L.M., Lázló, K., Vértési, A., Bagi, K., Szajáni, B. (1998). Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. *J. Mol Catal B: Enzymatic*, **4** : 41-45
- Szabó, A., Kotormán, M., Laczkó, I., Simon, L.M. (2006). Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **41**: 43-48 .
- Vermue, M. H., Tramper J. (1995). Biocatalysis in non-conventional media: Medium engineering aspects. *Pure & Appl. Chem.*, **67**: 345-373.
- Zhao, X. G., Wei, D. Z., Song, Q. X. (2005). A facile enzymatic process for the preparation of ibuprofen ester prodrug in organic media. *J Molec Catal B: Enzymatic*, **36** : 47-53

Fitoproteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica en medios acuoso-orgánicos

C A P Í T U L O 2



Purificación de papaína

Estabilidad estructural de papaína en mezclas de solventes

En este capítulo se describen los estudios que profundizan el análisis de la estabilidad enzimática en medios acuoso-orgánicos. Se planteó correlacionar los datos de estabilidad obtenidos por medida de actividad residual con los cambios estructurales en la conformación de las enzimas cuando las mismas se exponen a diferentes solventes orgánicos. Los solventes orgánicos elegidos fueron tres: MeOH, DMF y ACN, cada uno de ellos con dos concentraciones acuosas (1% y 10% v/v). Para ello se emplearon dos técnicas complementarias: espectroscopía de fluorescencia, con la que se obtiene información sobre cambios de la estructura terciaria, y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), que brinda información sobre la estructura secundaria.

Para estos estudios se seleccionó papaína como proteasa modelo, dado que su estructura es muy conocida y ha sido ampliamente estudiada mediante distintas metodologías.

De acuerdo a esto, la primera parte del presente capítulo describe la obtención de papaína pura utilizando un procedimiento de precipitación salina fraccionada que permitió obtener fácilmente, con costos mínimos y en cantidades apropiadas suficiente muestra de papaína pura. La pureza de la misma fue controlada por diversas técnicas como electroforesis, isoelectroenfoque, cromatografía, espectrometría de masas y mapeo peptídico. En la segunda parte se detallan los estudios usando distintas técnicas de espectroscopía de fluorescencia (métodos directos e indirectos, empleo de sondas fluorescentes) y por último se describen los resultados obtenidos empleando distintas metodologías de FTIR.

Índice:

2.1. Experimental	95
2.1.1. Obtención de papaína pura	95
2.1.1.1. Purificación de papaína	95
2.1.1.2. Caracterización de la papaína purificada	96
2.1.1.2.1. Análisis de la purificación de papaína por electroforesis (SDS-PAGE).....	96
2.1.1.2.2. Análisis mediante isoelectroenfoque (IEF) y zimograma	96
2.1.1.2.3. Cromatografía intercambio catiónico (CICa).....	97
2.1.1.2.4. Análisis por espectrometría de masas (EM).....	97
2.1.2. Cambios estructurales de papaína.....	99
2.1.2.1. Estudios mediante espectroscopía de fluorescencia	99
2.1.2.1.1. Preparación de las muestras	99
2.1.2.1.2. Fluorescencia Intrínseca	100
2.1.2.1.3. Fluorescencia extrínseca con ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico (ANS).....	100
2.1.2.1.4. Ensayos de transferencia de energía de fluorescencia (FRET).....	101
2.1.2.2. Estudios de espectroscopía FTIR	101
2.1.2.2.1. Estudio mediante FTIR-ATR.....	101
2.2. Resultados y Discusión	102
2.2.1. Obtención de papaína pura	102
2.2.1.1. Rendimiento de la purificación	103
2.2.1.1.2. Rendimientos globales	104
2.2.1.2. Electroforesis e isoelectroenfoque	106
2.2.1.3. Cromatografía de intercambio catiónico (CICa).....	109
2.2.1.4. Análisis por espectrometría de masas (EM)	111
2.2.1.4.1. Determinación de pesos moleculares	111
2.2.1.4.2. Huella peptídica (PMF).....	111
2.2.1.4.3. Identificación de la papaína a partir de péptidos seleccionados de la digestión trípica.....	114
2.2.1.4.4. PMF a partir de bandas electroforéticas	116
2.2.2. Cambios estructurales de papaína.....	119
2.2.2.1. Estudios mediante espectroscopía de fluorescencia	119
2.2.2.1.1. Tipos de medidas de fluorescencia.....	119
2.2.2.1.2. Ensayos directos con ATrEE.....	122
2.2.2.1.3. Papaína sin incubar.....	123
2.2.2.1.4. Papaína en ACN.....	125
2.2.2.1.5. Papaína en DMF.....	129
2.2.2.1.6. Papaína en MeOH	132
2.2.2.2. Estudio mediante FTIR	134
2.3. Conclusiones	139
2.3.1. Purificación de papaína.....	139
2.3.2. Estabilidad de papaína en distintos medios acuoso-orgánicos.....	140
2.4. Bibliografía	141

2.1. Experimental

2.1.1. Obtención de papaína pura

2.1.1.1. Purificación de papaína

La purificación de papaína se realizó modificando el método descrito por Baines y Brocklehurst en 1979. Se desarrolló en presencia de cisteína (Cys) 20 mM como en el método original y sin Cys pero en presencia de dos concentraciones diferentes (1 y 30 mM) de tetrionato sódico (TT). Se usaron dos fuentes distintas de extracto crudo: una papaína comercial de Fluka (pap F) y otra obtenida en nuestro laboratorio (pap L) según se describe en el Capítulo 1.

Para purificar estos extractos se pesó en cada caso un gramo de la muestra cruda, la que se disolvió en 10 ml de solución A (ver **Tabla 1**) y se mezcló mediante agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente. La suspensión turbia obtenida en el caso de pap F fue centrifugada (9600×g, 30 min, 4°C) para clarificarla y el sólido remanente fue descartado. Se ajustó el pH de las mezclas a 9,0 con solución de NaOH 1 M y los precipitados formados fueron eliminados por centrifugación en las mismas condiciones que la centrifugación previa. A los sobrenadantes se les agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta un 45% de saturación, se dejó 20 minutos agitando a 4°C en un agitador orbital a 150 rpm. Se centrifugó nuevamente y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados fueron resuspendidos en 10 ml de solución A. A estas dos nuevas suspensiones se les agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta un 40% de saturación. Se repitieron los pasos previos y los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en 10 ml de solución B (**Tabla 1**). Se precipitó por tercera vez, en esta ocasión con NaCl al 10% (p/v) y se resuspendieron los precipitados resultantes en 4 ml de solución C (**Tabla 1**). Estas soluciones se dejaron a 4°C durante 18 hs. Se separó por centrifugación el precipitado y se resuspendió en 1 ml de solución D (**Tabla 1**).

Posteriormente a la purificación se determinó la de cantidad de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) y la actividad caseinolítica (Priolo y col, 1991) de los extractos crudos, de muestras de los distintos pasos de purificación y de los productos puros.

En el caso de las medidas de actividad, a las muestras conteniendo TT se las preincubó en una solución conteniendo Cys 20 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente.

<i>Ensayo</i>	<i>Muestra</i>	<i>Solución A</i>	<i>Buffer B</i>	<i>Buffer C</i>	<i>Solución D</i>
1a	pap L	Cys 20 mM EDTA 1 mM	Fosfato 0.1 M pH 7,5 Cys 20 mM, EDTA 5 mM	Fosfato 0.1 M pH 6,5 Cys 20 mM, EDTA 5 mM	Agua Desionizada
1b	pap F	Cys 20 mM EDTA 1 mM	Fosfato 0.1 M pH 7,5 Cys 20 mM, EDTA 5 mM	Fosfato 0.1 M pH 6,5 Cys 20 mM, EDTA 5 mM	Agua Desionizada
2a	pap L	TT 1 mM EDTA 1 mM	Fosfato 0.1 M pH 7,5 TT 1 mM, EDTA 5 mM	Fosfato 0.1 M pH 6,5 TT 1 mM, EDTA 5 mM	Agua Desionizada
2b	pap F	TT 1 mM EDTA 1 mM	Fosfato 0.1 M pH 7,5 TT 1 mM, EDTA 5 mM	Fosfato 0.1 M pH 6,5 TT 1 mM, EDTA 5 mM	Agua Desionizada
3a	pap L	TT 30 mM EDTA 1 mM	Fosfato 0.1 M pH 7,5 TT 30 mM, EDTA 5 mM	Fosfato 0.1 M pH 6,5 TT 30 mM, EDTA 5 mM	Solución A (ensayo 3)
3b	pap F	TT 30 mM EDTA 1 mM	Fosfato 0.1 M pH 7,5 TT 30 mM, EDTA 5 mM	Fosfato 0.1 M pH 6,5 TT 30 mM, EDTA 5 mM	Solución A (ensayo 3)

Tabla 1. Soluciones empleadas en los distintos pasos de los ensayos de purificación.

2.1.1.2. Caracterización de la papaína purificada

2.1.1.2.1. Análisis de la purificación de papaína por electroforesis (SDS-PAGE)

Muestras de pap L, pap F y de los purificados finales fueron precipitadas con 5 volúmenes de acetona fría, se las redisolvió en buffer de muestra con SDS y β -mercaptoetanol y sobre las mismas se agregó iodoacetato sódico 30 mM para evitar la autoproteólisis. Las muestras se calentaron a baño de María durante 5 minutos para su desnaturalización. Luego fueron corridas en SDS-PAGE usando buffer tricina como solvente de corrida siguiendo la técnica de Shägger y von Jagow (1987). Las condiciones de corrida fueron de 40 V en el gel de stacking y de 150 V en el gel de resolución.

Después de la electroforesis, los geles fueron coloreados mediante el método de Coomassie coloidal (Neuhoff y col., 1988). Los pesos moleculares de las bandas observadas se estimaron usando el software Scion Image (<http://www.scionimage.com/> Accessed on line 10/08/2008).

2.1.1.2.2. Análisis mediante isoelectroenfoque (IEF) y zimograma

Las muestras crudas, parcial y totalmente purificadas se corrieron sobre geles de poliacrilamida (5%) con gradientes de pH inmovilizados. Se usaron geles de amplio rango (pH 3 a pH 10) (Morcelle y col., 2004a) y de rango alcalino (8,5 a 10) (Biolyte 3-10 y 8,0-10,0 carrier ampholytes, Bio-Rad). Se usó un equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio-Rad). En el caso del IEF de rango alcalino se agregó en la celda un trozo de papel de filtro humedecido con NaOH 6 M para evitar las alteraciones en el gradiente de pH producidas por el CO₂ que se solubiliza en las zonas alcalinas del gel. Los geles resultantes después de la corrida fueron fijados y teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Se realizó un zimograma para confirmar la actividad proteolítica de las bandas proteicas observadas en el IEF de rango alcalino según el método descrito por Westergaar y col. (1980).

2.1.1.2.3. Cromatografía intercambio catiónico (CICa)

Las muestras de papaína purificada y los extractos crudos se analizaron mediante un análisis cromatográfico usando CICa en un equipo Äkta Purifier 10 (GE Healthcare). Las características se detallan en las **Tablas 2 y 3**.

Volumen de muestra	100 µl
Columna	Resource S (1 ml, GE Healthcare)
Fase móvil A	buffer de ácido acético y acetato de sodio 0,1 M pH 5,5
Fase móvil B	el mismo buffer de la fase A con NaCl 0,9 M
Velocidad de flujo	0,5 ml/min
Detección	absorbancia a 280nm

Tabla 2. Condiciones de la corrida cromatográfica

1	2 VC con 0% de B
2	2 VC con 22% de B
3	2 VC con 25% de B
4	1 VC con un gradiente lineal de B entre 25 y 100%
5 (lavado)	2 VC a 100% de B

Tabla 3. Pasos en la elución de las proteínas en la corrida cromatográfica
VC: volúmenes de columna

2.1.1.2.4. Análisis por espectrometría de masas (EM)

Para identificar las muestras de papaína purificada y para determinar su grado de purificación se emplearon distintas técnicas que incluyeron espectrometría de masas MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight/ mass spectrometry), el método de la huella peptídica (PMF, Peptide Masss Fingerprint) y espectrometría de masas en tándem MALDI-TOF-TOF/MS-MS.

2.1.1.2.4.1. Determinación del peso molecular de la proteína purificada mediante MALDI-TOF/MS.

Para la determinación del peso molecular (PM) de la papaína que fue purificada en presencia de TT 30 mM se utilizó un espectrómetro de masas MALDI-TOF/MS (4800 Analyzer Applied Biosystems). Para eliminar las sales presentes en la muestra, 1 mg de la

misma fue precipitada dos veces con acetona fría y redisuelta en agua desionizada, posteriormente se agregó el inhibidor E64 (30 mM) y se liofilizó. La proteína liofilizada se resuspendió en 100 µl de agua milliQ® - ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% y se sembró 0,5 µl de muestra conjuntamente con 0,5 µl de matriz de ácido sinapínico. Las medidas fueron realizadas en modo lineal positivo. Se usaron proteínas de pesos moleculares conocidos como patrones de calibración.

2.1.1.2.4.2. Identificación de papaína mediante análisis proteómico de la huella peptídica (PMF) por MALDI-TOF/MS.

Sobre una muestra de papaína liofilizada obtenida de la misma forma que en el ensayo anterior se realizó la digestión trípica. Una masa de 0,5 mg de la proteína liofilizada se resuspendió en 100 µl de agua milliQ®. Sobre 4 µl de esa suspensión se agregaron 50 µl de cloruro de guanidinio (GndCl) 1,0 M en buffer NH_4HCO_3 50 mM pH 8,0 y se calentó a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente se agregó el reductor DTT 10 mM y se carbamidometiló con iodoacetamida 50 mM durante 20 minutos. La muestra se diluyó con 150 µl del buffer y se incubó con tripsina durante 2 hs a 37°C. Posteriormente se sembró usando ácido 4-hidroxicinamínico (4-HCCA) como matriz en una placa MTP 384 TF (Bruker) y se analizó por MALDI-TOF/MS en un espectrómetro de masas ultrafleXtrem (Bruker).

2.1.1.2.4.3. Identificación de papaína mediante MALDI-TOF-TOF/MS-MS.

Se seleccionaron algunos de los péptidos provenientes de la digestión trípica y se fragmentaron para obtener su espectro por MALDI-TOF-TOF/MS-MS en el mismo equipo del ensayo anterior. Los espectros se compararon con bases de datos para determinar su secuencia y origen.

2.1.1.2.4.4. Análisis de las bandas electroforéticas mediante PMF con MALDI-TOF/MS.

Se seleccionaron bandas electroforéticas resultantes de las corridas de papaína purificada en SDS-PAGE (sección 2.1.1.2.1) y coloreadas mediante el método Coomassie coloidal. Se cortaron las bandas y se lavaron varias veces con agua miliQ y ACN para remover el colorante, luego se secaron al vacío.

Los fragmentos de gel se sumergieron en una solución de NH_4HCO_3 25 mM con DTT 10 mM durante 30 min a 37°C, se centrifugaron y se lavaron con ACN durante 5 min.

Posteriormente fueron incubados en una solución de NH_4HCO_3 25 mM con iodoacetamida 50 mM durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad para efectuar la carbamidometilación. Luego se lavaron con agua milliQ® y ACN.

Se realizó la digestión trípica en buffer NH_4HCO_3 pH 8,5 con tripsina 4 ng/ μl durante 12 hs a 37°C.

Los péptidos resultantes se recuperaron por extracción con ACN al 50% (v/v) y fueron secados en un equipo de centrifugación al vacío (SpeedVac), posteriormente se redisolieron en agua miliQ con TFA 0,1% y se analizaron siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras de papaína liofilizada (2.1.1.2.4.2), por MALDI-TOF/MS.

En todos los casos, ya sea la identificación de los mapas tríplicos como la identificación mediante fragmentación por TOF-TOF, fueron evaluados empleando la herramienta de búsqueda Mascot (Perkins y col., 1999), empleando parámetros específicos de búsqueda según el caso.

Parámetros de búsqueda:

(1) Full MS: (a) MS tolerance, 100,00 ppm; (b) Enzyme, trypsin; (c) Database, MSDB (version MSDB_20060831.fasta).

(2) MS/MS: (a) MS tolerance, 100,00 ppm; (b) MS/MS tolerance: 0.500000 Da; (c) Enzyme, trypsin; (d) Database, NCBIInr (version NCBIInr_20100728.fasta).

Probability Based Mowse Score: Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento al azar.

2.1.2. Cambios estructurales de papaína

2.1.2.1. Estudios mediante espectroscopía de fluorescencia

2.1.2.1.1. Preparación de las muestras

Se precipitaron con 5 volúmenes de acetona en frío volúmenes pequeños de soluciones concentradas de papaína pura comercial Roche (PPC) y de papaína purificada a partir de látex en el LIPROVE (PPL). Se dejaron sedimentar en frío 1 hora y se separaron los sobrenadantes por centrifugación. Los precipitados fueron disueltos en medios conteniendo ACN, DMF y MeOH en todos los casos al 90 y 99% con buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, ya estudiados en el Capítulo 1, y se incubaron durante 1 y 24 hs. Las muestras así preparadas se utilizaron en ensayos de fluorescencia intrínseca **directos**.

Por otra parte, se preparó otro tipo de muestras. A partir de las soluciones descritas previamente, se realizó una centrifugación para separar los solventes y los precipitados remanentes fueron disueltos en el buffer de partida, con el fin de estudiar la reversibilidad de

los posibles cambios producidos por la presencia de los solventes. Estas muestras fueron usadas para los ensayos de fluorescencia intrínseca **indirecta**, ensayos con ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico (ANS, ver 2.1.2.1.3) y ensayos de transferencia de energía de fluorescencia (FRET, ver 2.1.2.1.4).

Como blancos de los ensayos (papaína sin incubar en presencia de ningún solvente orgánico), se prepararon muestras a partir de la redisolución del precipitado acetónico descrito más arriba, en el buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0.

2.1.2.1.2. Fluorescencia Intrínseca

Se diluyeron ambos tipos de muestras y los blancos hasta valores de concentración finales de proteínas entre 0,010 y 0,016 mg/ml (0,43-0,68 μ M) y se les midió la fluorescencia intrínseca (**FI**) usando un espectrofluorómetro Shimadzu RF-1501 de ancho de banda 10 nm para excitación y emisión. El λ de excitación fue 292 nm y se registraron los espectros de emisión entre 310 y 500 nm. Se tomaron los espectros de cada muestra por triplicado y se promediaron. A cada muestra se le restó el espectro correspondiente al solvente en el cual la papaína fue disuelta de forma de obtener, exclusivamente, los espectros de la proteína. Todas las muestras se hicieron por duplicado.

Se midió también la fluorescencia intrínseca de éster etílico de *N*-acetil L-triptofano (ATrEE; 1,7 μ M) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 y en las mezclas con ACN y DMF al 90 y 99%. Estas medidas se usaron para comparar el comportamiento de este derivado del Trp con el de la enzima en los ensayos directos.

2.1.2.1.3. Fluorescencia extrínseca con ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico (ANS)

Para las medidas de fluorescencia extrínseca en presencia de la sonda fluorescente ANS se ensayaron distintas concentraciones de proteína y de ANS usando papaína incubada sólo en buffer. En función de estos ensayos se eligieron las concentraciones de papaína y ANS apropiadas para registrar los espectros de las distintas muestras usadas previamente para las medidas de fluorescencia intrínseca indirecta.

Para el desarrollo del resto de los ensayos se usaron las mismas concentraciones de papaína que para el ensayo **FI**. A estas muestras se les agregaron cantidades fijas del fluoróforo ANS y se completó con buffer hasta 3 ml. Se midió emisión de fluorescencia excitando a 380 nm y registrando los espectros entre 400 y 550 nm. La concentración final de ANS en las mezclas fue de 0,0195 mg/ml (65,1 μ M). En estos espectros caso se visualizó

la fluorescencia de las moléculas de ANS unidas a zonas hidrofóbicas de las proteínas. En este caso también se tomaron tres espectros de cada muestra y se promediaron.

2.1.2.1.4. Ensayos de transferencia de energía de fluorescencia (FRET)

Se usaron las mismas condiciones que en los ensayos ANS pero excitando a 292 nm y registrando entre 310 y 550 nm, es decir, los mismos parámetros que para los ensayos FI. Las muestras, las condiciones de medida y los registros tienen las mismas características que en los ensayos con ANS.

2.1.2.2. Estudios de espectroscopía FTIR

Muestras de PPL y PPC, conteniendo entre 0,5 y 1 mg de proteína, fueron precipitadas con 5 volúmenes de acetona fría, de manera de separar posibles interferentes en la técnica. Después de 30 min de reposo se centrifugaron y se redisolviéron en 100 µl de agua desionizada. Se repitió el proceso de precipitación sobre las soluciones resultantes y los precipitados fueron redisueltos en las mezclas solventes en estudio (ACN, DMF y MeOH con 10 y 1% de buffer bórico-borato 0,1 M de pH 8,5). Se incubaron 24 h en las condiciones previamente especificadas y los solventes fueron evaporados. Las muestras se mantuvieron en desecador durante cuatro días a fines de equilibrar el contenido de humedad. Posteriormente, las muestras se diluyeron con KBr y se comprimieron en pastillas para el análisis por espectroscopía infrarroja. El análisis se realizó con un equipo FTIR Bruker Vertex 70 en el modo transmisión ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$) y en condiciones ambientales.

La estructura secundaria de la papaína se determinó a través de la deconvolución de la señal de Amida I (1700 a 1600 cm^{-1}). El ajuste de esa señal infrarroja en los distintos componentes lorentzianos se realizó con un módulo de software de Origin 5.0. La posición y número de componentes se determinó a través de la derivada segunda de la banda Amida I y la contribución de cada componente se evaluó por la integración del área bajo la curva y la posterior normalización por el área total de la banda de la Amida I.

2.1.2.2.1. Estudio mediante FTIR-ATR

Los espectros de infrarrojos de las muestras de papaína fueron adquiridos *in situ* usando una celda para estudios en fase líquida en modo de Reflexión Total Atenuada (ATR). Para lograr un correcto análisis de la estructura secundaria basada en el modo Amida I todas las muestras se estudiaron luego de ser sometidas a un intercambio isotópico con D₂O como se describe a continuación.

Para el intercambio isotópico completo se agregaron, a cada muestra preparada igual que en la sección anterior (hasta antes del paso de mezclar con KBr), 100 µl de D₂O. Luego se realizó una agitación vigorosa durante 10 min y se incubó durante toda la noche. Después de la incubación el cristal de ATR se cubrió homogéneamente adicionando gotas de la dispersión y se tomó el espectro de la muestra correspondiente.

Se empleó una celda de ATR, de flujo pasante y calefaccionada con una camisa de líquido (Pike Technologies). El cristal (ZnSe) de ATR, AMTIR trapezoidal de 45°, provee 10 reflexiones internas ($dp = 1.7 \mu\text{m}$ para $n_2=1.5$ a 1000 cm^{-1}). La temperatura de la celda se controló en $\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ con un baño de agua termostatzado (Julabo) conectado a la camisa de calefacción de la celda.

Los espectros de infrarrojo se colectaron usando un espectrofotómetro Nicolet 7800 equipado con un detector criogénico MCT-A y se adquirieron 100-250 barridos a una resolución de 0,5 ó 4 cm^{-1} . La bancada óptica del espectrofotómetro y los espejos que direccionan la radiación a la celda de ATR fueron continuamente purgados con aire seco con un generador de gas de purga para FTIR (Parker Balston) para eliminar las contribuciones CO₂ y de vapor de agua en los espectros.

2.2. Resultados y Discusión

2.2.1. Obtención de papaína pura

Se han desarrollado una gran diversidad de métodos para purificar papaína desde los extractos proteolíticos crudos del látex. Entre ellos se pueden nombrar la utilización de la precipitación con (NH₄)₂SO₄ (Kimmel y Smith, 1954), la precipitación con (NH₄)₂SO₄ seguida por precipitación con NaCl (Baines y Brocklehurst, 1979), la precipitación con NaCl seguida por cromatografía de afinidad (Burke y col., 1974), las cromatografías de intercambio iónico e hidrofóbica (Azarkan y col., 2003), la precipitación a baja temperatura (Monti y col., 2000), la extracción en dos fases acuosas usando PEG y (NH₄)₂SO₄ (Nitsawang y col., 2006) y la adsorción en membranas (Nie y col., 2007).

Considerando que la papaína tiene un residuo cisteínico en el sitio activo, es importante que se mantenga en su forma activa, es decir, se debe evitar que el -SH responsable de la catálisis sufra una oxidación irreversible. Agentes reductores como el SO₃²⁻, el DTT y la misma cisteína entre otros se usan durante los pasos de purificación para este propósito. También se pueden usar reactivos que se unan reversiblemente al grupo tiol y lo protejan de la oxidación como sulfonato de metilmetanotiol, 2,2'-dipiridil disulfuro o

iones tetrionato, los que se unen al $-SH$ mediante puentes disulfuro y pueden regenerarlo por adición de los agentes reductores antes mencionados (Burke y col., 1974). El uso de estos inhibidores reversibles además minimiza los riesgos de autodigestión de la enzima.

Papaína, la proteasa más ácida del látex de *Carica papaya*, fue purificada mediante el método modificado de Baines y Brocklehurst (1979). Este método fue seleccionado por su potencial aplicación a escala industrial. La modificación ensayada incluyó el uso de TT, conocido inhibidor reversible de proteasas cisteínicas (Murachi y col., 1975). Como se mencionó, el TT forma puentes disulfuro con los grupos tiólicos libres de las proteínas; en este caso con el sulfhidrilo del sitio activo (**Figura 1**).

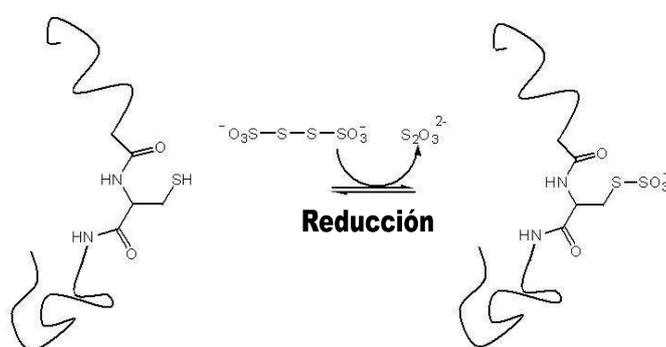


Figura 1. Mecanismo de inhibición reversible del TT sobre proteasas cisteínicas.

El TT cumple dos funciones principales: protege la cisteína catalítica de una oxidación irreversible y evita la autodigestión de las proteasas. Entre las ventajas del uso del TT se encuentran la falta de toxicidad, a diferencia de otros inhibidores de proteasas cisteínicas como las sales de Hg^{+2} , además es relativamente barato y es fácil de remover. Se eligieron dos concentraciones distintas en estos ensayos: 1 mM y 30 mM, en un caso cercana a una relación estequiométrica y en el otro en gran exceso.

2.2.1.1. Rendimiento de la purificación

Los resultados de la purificación pueden observarse en las **Tablas 4 y 5**. Las soluciones usadas en el proceso contienen EDTA para secuestrar cationes divalentes que podrían combinarse con los grupos sulfhidrilos de las proteasas inhibiéndolas. Por otra parte en los dos primeros ensayos (1a y 1b), siguiendo el protocolo original, se agregó Cys como

reactivo reductor y activador de proteasas cisteínicas. En los ensayos 2a y 2b se agregó TT 1mM y en 3a y 3b 30mM.

Ensayo 1	Proteínas Totales (mg)	Ucas totales	Actividad Específica	Purificación	Rendimiento
So	321,5	1328,0	4,1	1,0	100,0
S1	285,3	770,3	2,7	0,7	88,7
R2	121,4	404,0	3,3	0,8	37,8
R3	44,9	256,6	5,7	1,4	14,0
R4	30,9	137,0	4,4	1,1	9,6
R5	16,0	72,7	4,5	1,1	5,0

Ensayo 3	Proteínas Totales (mg)	Ucas totales	Actividad Específica	Purificación	Rendimiento
So	254,6	1013,9	4,0	1,0	100,0
S1	230,4	652,5	2,8	0,7	90,5
R2	77,0	405,9	5,3	1,3	30,2
R3	37,0	224,3	6,1	1,5	14,5
R4	7,0	54,6	7,8	1,9	2,7
R5	1,9	6,1	3,3	0,8	0,7

Ensayo 5	Proteínas Totales (mg)	Ucas totales	Actividad Específica	Purificación	Rendimiento
So	202,4	1073,6	5,3	1,0	100,0
S1	200,8	651,4	2,7	0,5	99,2
R2	167,6	463,8	2,8	0,5	82,8
R3	47,8	252,6	5,3	1,0	23,6
R4	10,5	70,9	6,7	1,3	5,2
R5	6,8	45,9	6,7	1,3	3,4

Tablas 4. Tablas de purificación detalladas de los ensayos 1a 2a y 3a. So: Solución inicial, S1: sobrenadante luego de llevar a pH 9, R2: redisolución del precipitado producido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 45% saturación (primera precipitación), R3: redisolución del precipitado producido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 40% saturación (segunda precipitación), R4: redisolución del precipitado producido con NaCl 10% (tercera precipitación), R5: redisolución del precipitado resultante final.

2.2.1.1.2. Rendimientos globales

En las **Tablas 5a, 5b y 5c** se muestran los rendimientos globales de los distintos ensayos de purificación. Se observa que pap L presentó un mejor rendimiento en papaína pura que pap F; sin embargo esta última mostró mayor actividad de la proteasa purificada en el ensayo sin TT (**Tabla 5a**). En todos los casos se obtuvieron mejores purificaciones en el caso de las preparaciones pap L. Es probable que la precipitación de abundante material

insoluble separado en el primer paso de la purificación en el extracto comercial, fuera el responsable de los rendimientos menores, ya que parte de las proteasas podrían coprecipitar con este material y, por lo tanto, disminuir el rendimiento (Abdelkafi y col., 2009).

Para entender el aparente descenso en el *grado de purificación* en las tablas, se debe considerar que al menos el 50% de las proteínas presentes en el látex de *Carica papaya* son proteasas (Boller, 1986), y que, a su vez, ellas constituyen un 80% de toda la fracción de enzimas (El Mossaui y col., 2001), por lo cual la medida de actividad caseinolítica presenta el inconveniente de que no distingue a la papaína de las otras proteasas. Ocurriría lo mismo al usar otros ensayos de actividad por la gran similitud entre estas enzimas. Por esta razón en las tablas de purificación no se observa un aumento en la actividad específica al avanzar en el procedimiento y tampoco en el grado de purificación, ya que el contenido proteico y la actividad enzimática disminuyeron simultáneamente. Dada la complejidad del contenido del látex, esto también se ha observado en la purificación de proteasas de otras plantas con látex como *Araujia hortorum* (Obregón y col., 2001), *Araujia angustifolia* (Obregón y col., 2009) y *Funastrum clausum* (Morcelle y col., 2004b).

Los rendimientos obtenidos en las diferentes purificaciones (entre 2 y 5%) son aceptables teniendo en cuenta que la papaína representa el 8% de las proteasas presentes en el látex de papaya.

Por otra parte, los resultados mostraron que la influencia del TT en la purificación depende de su concentración. Al usar TT 1 mM no se ve una mejora ni en pap L ni en pap F. Esto podría tener dos causas: a) la ausencia de Cys en la solución A, y b) la concentración de TT podría no ser suficiente para proteger todos los sitios activos de las enzimas presentes. Ambos factores permitirían la oxidación irreversible de la Cys del sitio catalítico de las endopeptidasas, provocando así menores rendimientos incluso que los observados en el primer ensayo, es decir el método tal cual lo describen Baines y Brocklehurst (1979). En presencia de TT 30 mM, en cambio, se obtuvieron mejores resultados de actividad específica y grado de purificación en ambos extractos (**Tabla 5c**).

Esto es coherente con lo observado en purificaciones cromatográficas de proteasas cisteínicas en presencia de TT (Takashasi y col., 1973). También se ha demostrado que el TT es un mejor agente estabilizante de la actividad de papaína en cáscaras de papaya secadas a 55°C que otros reactivos químicos usados, tales como antioxidantes (ascorbato de sodio, eritorbato de sodio, t-butil hidroquinona, rutina y α -tocoferol), inhibidores de polifenol oxidasa (4-hexilresorcinol) y otros agentes reductores sulfhídricos (Metabisulfito de sodio) (Espin e Islam, 1998). Por otra parte, el TT se remueve fácilmente de su unión al

residuo Cys del sitio activo usando agentes reductores, que, además, pueden ser eliminados por un paso de diálisis, como Cys o el β -mercaptoetanol.

	Proteína total (mg/g)		Actividad específica (Ucas/mg proteína)		Purificación		Rendimiento (%)	
	pap L	pap F	pap L	pap F	pap L	pap F	pap L	pap F
S0	321,5	299,1	4,1	3,5	-	-	100	100
R5	16,0	5,6	4,5	8,2	1,1	2,0	5,0	1,9

a

	Proteína total (mg/g)		Actividad específica (Ucas/mg proteína)		Purificación		Rendimiento (%)	
	pap L	pap F	pap L	pap F	pap L	pap F	pap L	pap F
S0	254,6	323,5	4,0	3,2	-	-	100	100
R5	1,9	0,4	3,3	1,9	0,8	0,6	0,7	0,1

b

	Proteína total (mg/g)		Actividad específica (Ucas/mg proteína)		Purificación		Rendimiento (%)	
	pap L	pap F	pap L	pap F	pap L	pap F	pap L	pap F
S0	202,4	254	4,5	3,4	-	-	100	100
R5	6,8	0,9	6,7	1,3	1,3	0,4	3,4	0,3

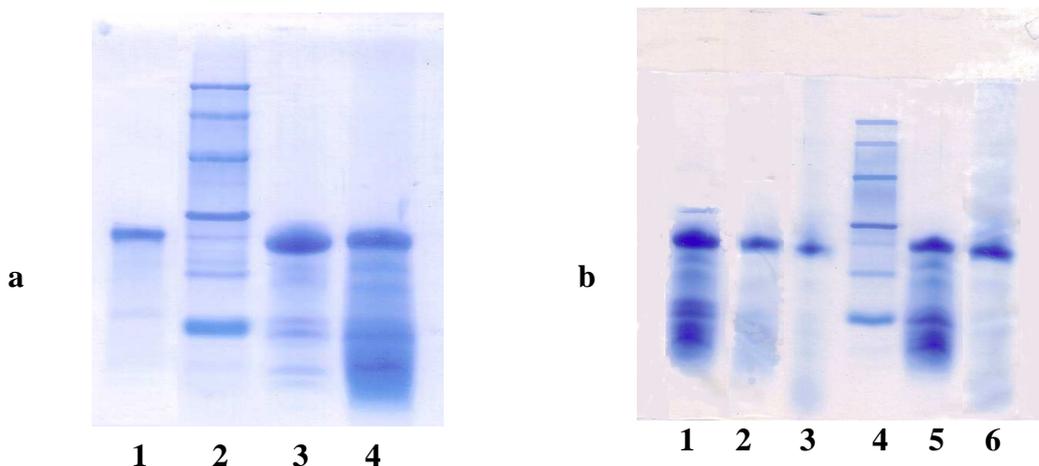
c

Tablas 5. Resultados globales de las purificaciones. **a.** Ensayos 1a y 1b. **b.** Ensayos 2a y 2b. **c.** Ensayos 3a y 3b. S0: Solución del extracto crudo inicial, R5: redisolución del precipitado resultante de la cristalización final (producto puro).

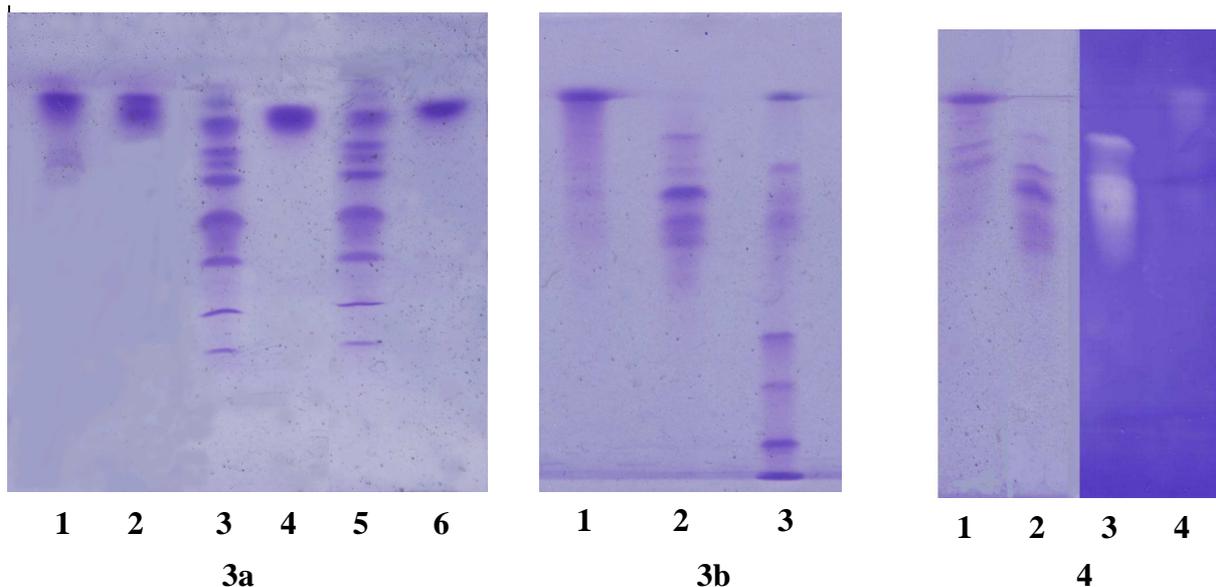
La solución con TT 30 mM fue la condición con la que se ha obtenido los mejores resultados en la purificación de papaína, cuando usamos el extracto hidrosoluble preparado en nuestro laboratorio como material de partida. En cambio para la preparación comercial resultó mejor la ausencia del reactivo, probablemente por la presencia de agentes estabilizantes que podrían interferir con el TT y, por lo tanto, con la purificación, disminuyendo el rendimiento del proceso (**Tabla 5a**).

2.2.1.2. Electroforesis e isoelectroenfoque

Los análisis por SDS-PAGE (**Figura 2a**) muestran, tanto en el extracto crudo como en la papaína purificada, una importante fracción proteica en un rango de PM alrededor de 23 kDa (según el análisis realizado con el software Scion Image). Dicha fracción correspondería a las endopeptidasas. Ambos extractos crudos, pap F y pap L, son buenas fuentes para purificar papaína.



Figuras 2. SDS-PAGE de la purificación de papaína. **2a.** Línea 1: papaína purificada (ensayo 3a, ver Tabla 1). Línea 2: Patrones de PM. Línea 3: pap L con TT 30 mM. Línea 4: pap L sin TT (ensayo 1a). **2b** Línea 1: pap F sin TT. Línea 2: Estándar comercial de papaína pura. Línea 3: papaína purificada desde pap F (ensayo 1b). Línea 4: Marcadores de PM de Bio Rad: fosforilasa b, 97,4 kDa; seroalbúmina, 66,2 kDa; ovoalbúmina, 45,0 kDa; anhidrasa carbónica, 31,0 kDa; inhibidor de tripsina, 21,5 kDa; y lisozima, 14,4 kDa. Línea 5: pap L sin TT. Línea 6: Papaína purificada desde pap L (ensayo 1a).



Figuras 3. Isoelectroenfoques de la purificación de papaína. **3a.** Rango amplio. Línea 1: pap L (Ensayo 3a). Línea 2: R3 (Precipitado resuspendido obtenido después de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45% sat). Líneas 3 y 5: Marcadores de pI de Bio Rad (amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, 3,6; inhibidor de tripsina de porotos de soja, 4,6; β -lactoglobulina A de leche bovina, 5,1; anhidrasa carbónica II de eritrocitos, 5,9; anhidrasa carbónica I de eritrocitos humanos, 6,6; mioglobina de corazón de caballo, 6,8, 7,2; lecitina de *Lens culinaris* 8,2; 8,6; 8,8; tripsinogeno de páncreas bovino, 9,3). Línea 4: Papaína purificada (Ensayo 3a). Línea 6: Papaína pura comercial. **3b.** IEF (rango alcalino) de la purificación de papaína (ensayo 3). Línea 1: pap L. Línea 2: Papaína purificada. Línea 3: Marcadores de pI de Bio Rad (los mismos de la **Figura 3a**). **Figura 4.** IEF y zimograma en condiciones alcalinas (ensayo 3a). IEF: línea 1, pap L; línea 2, papaína purificada. Zimograma: línea 3, papaína purificada; línea 4, pap L.

Al comparar la papaína purificada con un patrón de papaína pura comercial en el SDS-PAGE (**Figura 2b**) se vio que tienen un grado de pureza similar. En las corridas de las distintas muestras aparecen bandas a menores PM, sin embargo, se puede ver que estas disminuyen y hasta desaparecen en las muestras purificadas.

Como se mencionó antes, todas las proteasas del látex de papaya tienen pesos moleculares muy parecidos y están comprendidos entre 23 y 24 kDa. Aunque la proteína purificada coincide con este rango de PM y la movilidad electroforética es muy similar al estándar comercial, la determinación de la papaína por este método no es concluyente. Aunque se suele usar este método como criterio de pureza de una muestra de papaína, no hay certeza de que la proteína purificada sea papaína y no alguna de las otras proteínas presentes en el extracto crudo o si está contaminada con las otras proteasas. En cambio, considerando que la papaína es la proteasa más ácida de las cuatro presentes en el látex de *C. papaya* (la que tiene el pI más bajo), la corrida mediante un isoelectroenfoque (IEF) puede ser un método más confiable para identificar las proteínas del purificado y para saber si tiene contaminantes.

Se realizaron IEF de rango amplio y de rango alcalino de pH para determinar los pI de las muestras purificadas (**Figuras 3a y 3b** respectivamente).

En la **Figura 3a** se ve que la papaína purificada a partir de pap L se mueve hacia la región catódica hasta una zona de pI correspondiente a 9,3. Esto también se observa al correr la papaína purificada de pap F. La fracción principal del extracto crudo pap L, en cambio, se mueve a regiones aún más alcalinas (>9,3). Este comportamiento era el esperado considerando que el resto de las enzimas proteolíticas del látex poseen valores de pI mayores (10,3 a 10,7 para quimopapaína, 11,7 para caricaína y por encima de 10 para glicilendopeptidasa) (Domsalla y Melzig, 2008). Se ve que después de la segunda precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hay un importante enriquecimiento en papaína debido, probablemente, a la separación de la mayor parte de la quimopapaína (**Figura 3a**, línea 2) (Burke y col., 1974). Sin embargo, en ese paso de la purificación, todavía está contaminada con una fracción más alcalina, la que desapareció después de la precipitación con NaCl.

No hay acuerdo en cual es el valor del pI de la papaína. Algunos datos bibliográficos le dan un valor entre 8,7 y 8,9 (Barrett y col., 2004), mientras otros autores lo fijan en 9,6 (Sluyterman y DeGraaf, 1972). La dispersión en los valores parece depender del método usado para calcularlo. Considerando sólo la estructura primaria el pI teórico debería ser 8,69 (calculado a partir de Gateway to isoelectric point service, <http://www3.embl.de/cgi/pi-wrapper.pl>). Sin embargo, hay otros factores que hay que tener en cuenta como el estado de

oxidación, la presencia de puentes disulfuro, etc., que tienen una gran influencia en la determinación de este parámetro. La papaína tiene seis Cys (además de la del sitio activo) formando parte de puentes disulfuro: Cys22-Cys65, Cys56-Cys99 y Cys157-Cys208. Los cálculos basados en los resultados obtenidos empleando el motor de búsqueda Mascot para el PMF de la papaína purificada darían un pI de 9,6, un valor más parecido al que se ve en el IEF de la **Figura 3a**.

El IEF de rango alcalino (**Figura 3b**) refuerza las conclusiones discutidas previamente. La mayoría de las proteínas de pap L tienen pI superiores a 9,3, mientras que la papaína purificada se despliega en varias bandas alrededor de este pI. Este despliegue no quiere decir necesariamente que la purificación sea parcial. El IEF es una técnica con una resolución muy alta, y varias veces las proteínas muestran más bandas de las esperadas. Esto podría ser por artefactos y por interacciones proteína-anfolitos. En otros casos, como en las proteasas cisteínicas obtenidas a partir de extractos crudos de bromelaína o de otras especies vegetales de la familia *Bromeliaceae*, diferencias en el número de cargas de las peptidasas purificadas generan más de una banda en los IEF. Esto podría deberse al cambio de un aminoácido en su secuencia (Napper y col., 1994; Bruno y col., 2008). Otra razón es la presencia de microheterogeneidades proteicas producidas por la existencia de distintos conformeros de la proteína: pequeños daños durante el proceso de purificación pueden provocar la pérdida o ganancia de grupos cargados, así como pueden generar diferentes estados de oxidación, entre otros efectos (Gianazza y Righetti, 1980). Se debe remarcar que este IEF amplifica mucho un estrecho rango de pH (8,0 a 10,5) y por lo tanto evidencia incluso más fenómenos que los mencionados. Esto también se manifiesta en el zimograma de la **Figura 4**.

2.2.1.3. Cromatografía de intercambio catiónico (CICa)

Se han usado varios tipos de cromatografías para purificar papaína a partir del látex, en especial diferentes clases de cromatografía de afinidad con ligandos como los inhibidores de proteasas de naturaleza peptídica (Blumberg y col., 1970; Albeck y Kliper 1997), compuestos organomercurícos (Azarkan y col., 2003) o cianurados así como derivados piridil disulfuro con partes electrofílicas en la molécula (Brocklehurst y col., 1973; Thomas y col., 1995). Algunos de ellos son muy útiles ya que pueden separar completamente moléculas de papaína activas de las inactivas. La CICa parece ser la más popular, debido a su simpleza y efectividad (Burke y col., 1974). Sin embargo, este método sirve para purificar sólo pequeñas cantidades de papaína y a veces esta no resulta de gran pureza como se ha probado

mediante SDS-PAGE (Azarkan y col., 2003). Este tipo de métodos no son aplicables en la industria ya que es dificultoso el escalado del proceso. En este trabajo se usó la CICA como una herramienta para evaluar la pureza de la papaína purificada.

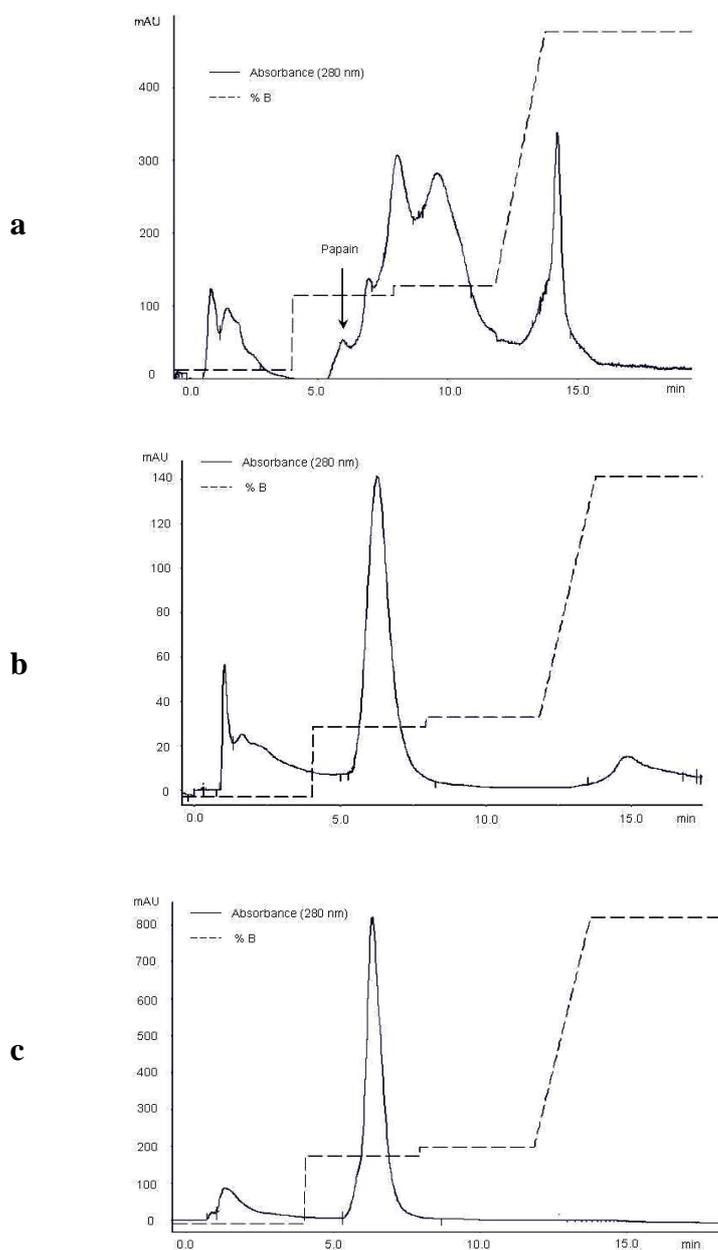


Figura 5. CICA de **a.** pap L con TT 30 mM; **b.** papaína purificada según el ensayo 3a ; **c.** papaína comercial pura.

En las **Figuras 5** se muestran los perfiles cromatográficos de pap L con TT 30 mM, de papaína purificada según el ensayo 3a, y de un estándar de papaína pura comercial. Al sembrar la muestra cruda con el método descrito se logró una separación parcial del extracto

crudo donde se advierte la presencia de tres grupos de proteínas. El primero fue la fracción no retenida, que salió en el paso 1 cuando se eluyó con solvente A puro. El último salió al lavar la columna en el paso 5 cuando el solvente fue 100% de B. En las etapas intermedias salió un grupo de proteínas no resueltas donde el primer hombro sería la papaína. El tiempo de elución de este hombro coincide con los observados para la fracción principal en las corridas de papaína purificada (ensayo 3a) y el patrón de papaína pura. Se ve claramente que los perfiles de la papaína purificada (**Figura 5b**) y del patrón comercial (**Figura 5c**) tienen patrones de elución similares.

2.2.1.4. Análisis por espectrometría de masas (EM)

2.2.1.4.1. Determinación de pesos moleculares

El análisis por MALDI-TOF/MS de la papaína purificada a partir de pap L reveló una proteína homogénea con un peso molecular de 23.693 Da (**Figura 6**). El PM teórico de la papaína es 23.413 Da. La diferencia entre estos dos pesos es atribuible a la formación de complejos irreversibles de la enzima con el inhibidor E-64 (PM 357,4) en el proceso de análisis por espectrometría de masas.

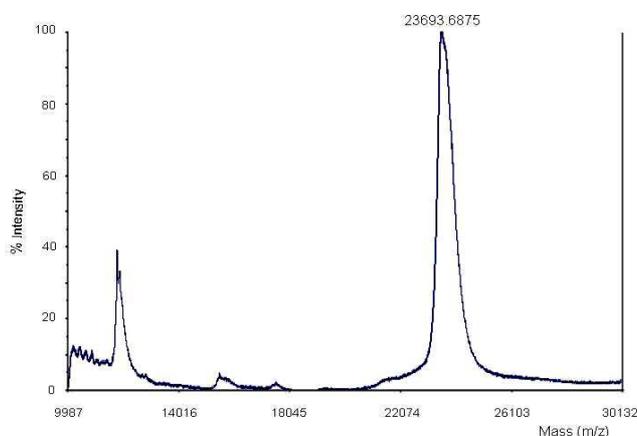


Figura 6. MALDI TOF/MS de la papaína purificada.

2.2.1.4.2. Huella peptídica (PMF)

A pesar de que mediante los métodos usados se tuvieron fuertes indicios de la presencia de papaína, los resultados no fueron concluyentes en cuanto a la identificación de la muestra y a su grado de pureza. Por esta razón, se optó por usar herramientas proteómicas como la huella peptídica (PMF).

El PMF es una técnica analítica cuya finalidad es identificar una proteína. La proteína desconocida es clivada por una proteasa determinada (la más usada es la tripsina) obteniendo varios péptidos. Los pesos absolutos de estos péptidos se determinan por MALDI-TOF/MS. Los espectros de masas obtenidos se comparan con los existentes en bases de datos mediante una herramienta de búsqueda y se determina la identidad de la proteína. Para concluir, se puede mencionar que los resultados obtenidos por esta técnica de identificación son mucho más exactos que otros parámetros bioquímicos usados en el pasado, tales como la determinación del PM o, en el caso de enzimas, el cálculo de constantes cinéticas mediante el uso de determinados sustratos sintéticos (Obregón y col., 2009). Por otra parte, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de péptidos es el método primario para identificar proteínas en muestras complejas (Falkner y col., 2007).

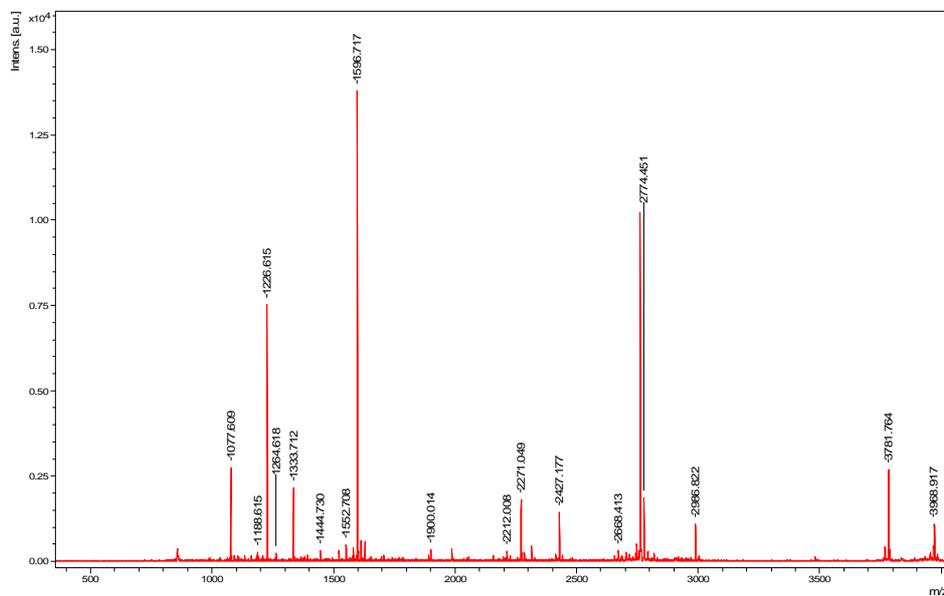


Figura 7. Huella peptídica de la papaína purificada según el ensayo 3a e inhibida con E-64.

La papaína purificada fue reducida y carbamidometilada antes de ser digerida siguiendo el siguiente esquema. En primer lugar, se expuso la muestra a un agente desnaturizante (GndCl) y se la calentó a 100°C durante 5 minutos, de esta manera se desplegó completamente la proteína. Luego se agregó un agente reductor (DTT) para romper los puentes disulfuro. Por último, se incorporó un agente (iodoacetamida) que se une irreversiblemente a los grupos sulfhidrilos impidiendo que se reconstituyan los enlaces. Este proceso garantiza que la tripsina pueda llegar a cortar en todas las uniones peptídicas específicas de la enzima. Si la proteína se encontrase parcialmente desplegada

probablemente varios de los sitios de corte no se encontrarían disponibles a la acción proteolítica y los fragmentos no serían comparables con la digestión trípica teórica.

Sobre la misma muestra usada para la determinación de peso molecular por MALDI-TOF/MS, es decir, la papaína pura obtenida por el ensayo 3a e inhibida por E-64, se realizó la digestión trípica y el análisis de masas mediante PMF MALDI-TOF/MS. En la **Figura 7** se muestra el espectro de la digestión trípica de la papaína liofilizada.

m/z (obs)	m/z (exp)	m/z (calc) ¹	Secuencia (Principio-fin) ²
1077,6089	1076,6016	1076,5291	-.IPEYVDWR.Q (1-8)
1106,6086	1105,6014	1105,5880	R.SREKGPYAAK.T (97-106)
1226,6155	1225,6082	1225,5727	R.NTYPYEGVQR.Y (84 – 93)
1333,7123	1332,7051	1332,6826	-.IPEYVDWRQK.G (1-10)
1596,7171	1595,7099	1595,7117	K.NSWGTTGWGENGYIR.I (175-188)
1891,9526	1890,9453	1890,8795	R.NTYPYEGVQRYCRSR.E (84 – 98)
1900,0139	1899,0066	1899,0254	K.VDHAVAAVGYGPNYILIK.N (157 - 174)
2212,0076	2211,0003	2210,9862	R.TGNLNEYSEQELLDICRRR.S * (42 – 59)
2271,0491	2270,0418	2270,0314	R.GTGNSYGVCGLYTSSFYVPVK.N * (192 – 212)
2313,1094	2312,1021	2312,0896	K.RGTGNSYGVCGLYTSSFYVPVK.N * (191 – 211)
2427,1771	2426,1698	2426,1325	K.RGTGNSYGVCGLYTSSFYVPVK.N * (191 – 212)
2703,3788	2702,3715	2702,2700	R.SYGCNGGYPWSALQLVAQYGIHYR.N (60 – 83)
2986,8215	2985,8142	2985,5535	R.GGIFVGPCGNKVDHAVAAVGYGPNYILIK.N * (146–174)

¹ PMF MALDI TOF teórico calculado usando el software Biotools. ² Numeración de la papaína.

* Péptidos carbamidometilados

Tabla 6. Péptidos de la digestión del liofilizado de papaína coincidentes con peptidos de la digestión trípica teórica.

A partir del espectro obtenido por PMF, se vio que trece señales de masas coinciden con masas de la digestión trípica teórica de papaína. Dichas señales se corresponden con trece péptidos cuya secuencia se obtuvo por comparación con la digestión teórica y se muestra en la **Tabla 6**. La herramienta Mascot mostró un puntaje de 134 para la papaína, siendo significativos puntajes mayores de 66. Estos péptidos cubren el 66% de la secuencia completa de papaína (**Cuadro 1**).

```

1  IPEYVDWRQK GAVTPVKNQG SCGSCWAFSA VVTIEGIIKI RTGNLNEYSE
51 QELLDICRRS YGCNGGYPWS ALQLVAQYGI HYRNTYPYEG VQRYCRSREK
101 GPYAAKTDGV RQVQPYNEGA LLYSIANQPV SVVLEAAGKD FQLYGGIFV
151 GPCGNKVDHA VAAVGYGPNY ILIKNSWGTG WGENGYIRIK RGTGNSYGVC
201 GLYTSSFYVP KN

```

Cuadro 1. Secuencia de la papaína. En negrita se muestran los peptidos coincidentes de la digestión del liofilizado de papaína que cubren el 66% de la secuencia de papaína. Subrayados se muestran los péptidos analizados mediante MALDI-TOF-TOF/MS-MS

En la **Figura 7** además de estas señales se advierte la presencia de otros péptidos resultantes de la digestión trípica, los cuales no fueron identificados como provenientes de papaína. Algunos de ellos podrían atribuirse a péptidos provenientes de las otras proteasas

presentes en el látex que podrían quedar en la muestra purificada. Para determinar si fue esto lo sucedido, se eligieron algunos péptidos del PMF que no aparecieron en la digestión teórica de papaína y se compararon con las digestiones tríplicas teóricas de quimopapaína, caricaína y glicilendopeptidasa obtenidas usando el software Biotoools 3.1 (Bruker Daltonics). Se encontraron señales de cinco péptidos coincidentes con las digestiones teóricas, dos de glicilendopeptidasa, dos de quimopapaína y una de caricaína (**Tabla 7**).

m/z (Obs) ¹	m/z (Calc) ²	Enzima
1263,3734	1263,648	Quimopapaína
1444,7301	1444,712	Glicilendopeptidasa
1552,7082	1552,912	Caricaína
2774,4511	2774,438	Glicilendopeptidasa
2792,4560	2792,343	Quimopapaína

¹ Ver Figura 7. ² PMF MALDI TOF teórico calculado usando el software Biotoools.

Tabla 7. Identificación de péptidos no coincidentes con la digestión tríplica teórica de papaína obtenidos por PMF MALDI-TOF/MS.

Estos datos son concluyentes en cuanto a la identificación de papaína ya que el número de coincidencias encontradas confirma la identidad de la muestra. Sin embargo, la presencia de otros péptidos resultantes de la digestión tríplica indica que en la muestra purificada queda algo de las otras proteínas del látex de *Carica papaya*. Estos contaminantes no fueron detectados por los IEF (ni el de amplio rango ni el alcalino) a pesar de la sensibilidad de dicho análisis.

2.2.1.4.3. Identificación de la papaína a partir de péptidos seleccionados de la digestión tríplica

En el ensayo previo se identificó la papaína a través de la comparación de masas de algunos péptidos con los que proporciona la digestión tríplica teórica. Sin embargo, mediante un segundo análisis por espectrometría de masas se puede obtener la secuencia de los péptidos con mucha mayor exactitud y de esa manera asegurar su procedencia.

Para este análisis, se analizaron algunos péptidos mediante un segundo ciclo de ionización (MALDI-TOF-TOF tandem MS). Se eligieron los péptidos que mostraron mayores señales (**Figura 7**) m/z: 1077,615; 1226,671 y 1596,772. Los espectros resultantes se muestran en las **Figuras 8**.

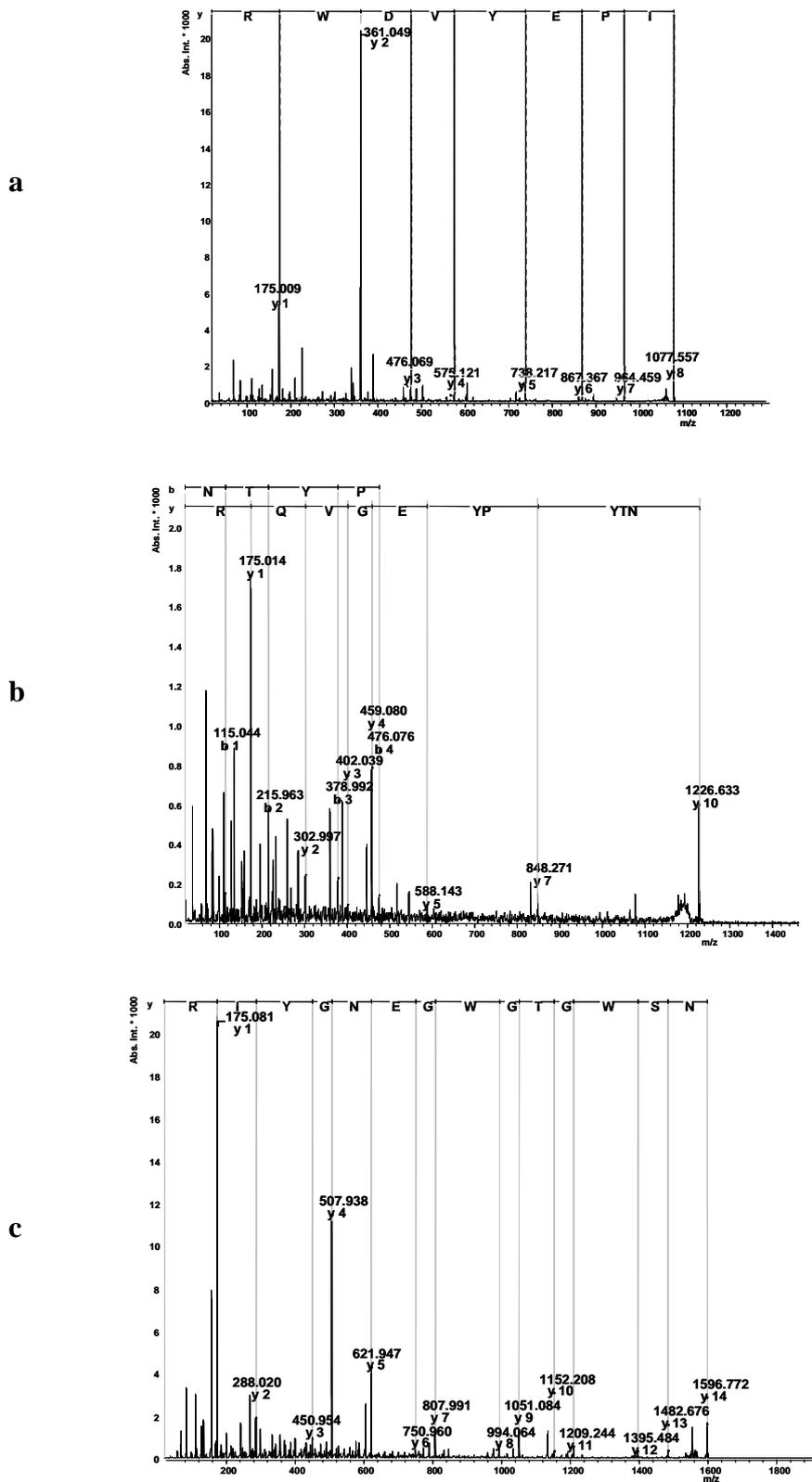


Figura 8. MALDI-TOF-TOF/MS-MS de los péptidos obtenidos a partir de la digestión trípica de la papaína purificada. **a.** Péptido con m/z: 1077,6 Da **b.** Péptido con m/z: 1226,7 Da, **c.** Péptido con m/z: 1596,7 Da.

De esta manera se establecieron las secuencias aminoacídicas de esos péptidos y se confirmó la identidad de la papaína purificada al comparar con bases de datos disponibles con la herramienta de búsqueda Mascot.

A partir de los espectros obtenidos y mediante comparación con bases de datos obtuvimos la secuencia de estos tres péptidos. Para el péptido con m/z 1077,6 Da, fue IPEYVDWR, correspondiente a la región que va desde el N-terminal hasta el octavo residuo aminoacídico. Para el péptido con m/z 1226,7 Da, fue NTYPYEGVQR, correspondiente a la región que va desde el residuo 84 al 93, y para el péptido con m/z 1596,7 Da, su secuencia fue NSWGTGWGENGYIR, correspondiente a la región que va desde el residuo 175 al 188. Los péptidos analizados corresponden a los subrayados en la secuencia de la papaína del Cuadro 1.

2.2.1.4.4. PMF a partir de bandas electroforéticas

A fin de determinar si los péptidos contaminantes provienen de las proteasas enteras o de péptidos presentes en la muestra purificada, se hicieron otros estudios sobre la papaína purificada según el ensayo 3a (con TT 30 mM). Se realizó el PMF a partir de la banda principal del SDS-PAGE (23 kDa) y de las bandas difusas de menores PM. En este caso, luego de decolorar y extraer las proteínas del gel, también se redujo con DTT y se carbamidometilaron las muestras antes de la digestión triptica.

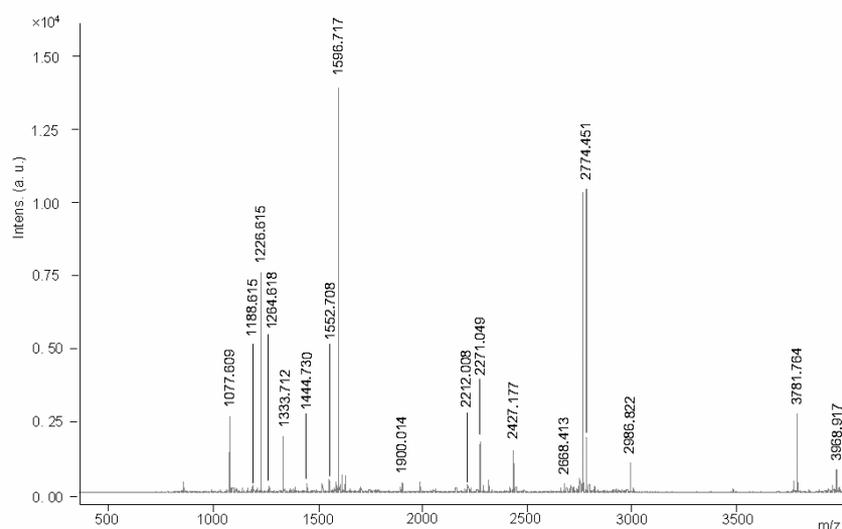


Figura 9. PMF de la papaína purificada en el ensayo 3a. La determinación por PMF MALDI-TOF se hizo a partir de la banda de 23 kDa del SDS-PAGE.

La **Figura 9** muestra las señales de mayor intensidad producidas por los péptidos obtenidos a partir de la banda de 23 kDa de la SDS-PAGE de esa papaína purificada.

De un total de 36 péptidos, 11 coincidieron con la digestión triptica teórica (**Tabla 7**), mientras que sólo uno, y con una señal de intensidad muy baja, coincidió con la quimopapaína. Los péptidos coincidentes con la digestión teórica cubren el 54% de la secuencia de papaína. La herramienta Mascot arrojó un puntaje (score) de 134 para la papaína, siendo significativos puntajes mayores de 78. La **Tabla 7** muestra los péptidos obtenidos correspondientes a papaína. Tomando en cuenta estos resultados se logra un segundo análisis presentado en el **Cuadro 2**.

m/z (Obs)	m/z (Calc) ¹	Secuencia [principio-fin] ²
1077,609	1077,536	IPEYVDWR [1-8]
1106,609	1106,595	SREKGPYAAK [97-106]
1226,615	1226,580	NTYPYEGVQR [84-93]
1333,712	1333,690	IPEYVDWRQK [1-10]
1596,717	1596,719	NSWGTGWGENGYIR [175-188]
1900,014	1900,033	VDHAVAAVGYGPNYILIK [157-174]
2212,008	2211,994	TGNLNEYSEQELLDCRR [42-59]*
2271,049	2271,039	GTGNSYGVCGLYTSSFYVKN [192-212]*
2427,177	2427,140	RGTGNSYGVCGLYTSSFYVKN [191-212]*
2668,413	2668,319	IKRGTGNSYGVCGLYTSSFYVKN [189-212]*
2986,822	2986,561	GGIFVGPCGNKVDHAVAAVGYGPNYILIK [146-174]*

¹ PMF MALDI-TOF teórico calculado usando el software Biotools. ² Numeración de la papaína.

* Péptidos carbamidometilados.

Tabla 7. Péptidos de papaína obtenidos a partir de la digestión de la banda electroforética principal de la muestra purificadas en el ensayo 3^a.

La presencia sólo de una señal menor perteneciente a un péptido de otra proteasa en la banda electroforética indicaría que la papaína presente en esa banda, es de gran pureza. Sin embargo en la fracción liofilizada aparecen péptidos extraños. Estos estarían relacionados con las bandas espurias de PM menores que aparecen teñidas débilmente en los SDS-PAGE (**Figura 2a**, línea 1 y **Figura 2b** líneas 3 y 6). Dichos péptidos y bandas podrían deberse a productos de degradación de las otras proteasas del látex. Cabe destacar que el estándar comercial puro también muestra este tipo de impurezas en la electroforesis (**Figura 2b**, línea 2). Esto también fue detectado por Nitsawang y col. (2006) en papaína y parece ser algo relativamente común en los productos puros comerciales (Falkner y col., 2007).

Estas bandas de menores PM se analizaron de la misma manera que la banda principal. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**. Además de péptidos coincidentes con los obtenidos por digestión teórica de las otras proteasas, también se encontraron algunos

péptidos resultantes de la degradación de la papaína pura. En este sentido, el SDS-PAGE podría servir como un paso más en la obtención del producto puro.

1 **IPEYVDWRQK** GAVTPVKNQG SCGSCWAFSA VVTIEGIIKI **RTGNLNEYSE**
 51 **QELLDCDRRS** YGCNGGYPWS ALQLVAQYGI HYRNTYPYEG **VQRYCRSREK**
 101 **GPYAAKTDGV** RQVQPYNEGA LLYSIANQPV SVVLEAAGKD **FQLYRGGIFV**
 151 **GPCGNKVDHA** **VAAVGYGPNY** **ILIKNSWGTG** **WGENGYIRIK** **RGTGNSYGVC**
 201 **GLYTSSFYFPV** **KN**

Cuadro 2. Secuencia aminoácidica de la papaína. En negrita se muestran los péptidos obtenidos por digestión trípica de de la banda electroforética principal del productos obtenido en el ensayo 3a.

Los péptidos encontrados pueden tener dos orígenes: podrían estar presentes en el material crudo y/o se forman durante la purificación. La presencia de bandas de menores pesos moleculares en el SDS-PAGE del extracto crudo, sumado a la capacidad inhibitoria del TT, permite suponer que los péptidos en su mayoría ya se encuentran presentes en gran cantidad en dicho extracto crudo. La purificación con sales permitió separar a muchos de éstos: sin embargo mediante técnicas de proteómica se pudo no sólo confirmar la presencia de estos péptidos contaminantes en el producto purificado sino también saber con bastante exactitud su origen.

m/z(calc)	m/z (obs)	secuencia (principio-final)	Enzima
1001,576	1001,505	LPESVDWR [1-8]	Glicilendopeptidasa
1064,516	1064,542	YPQSIDWR [1-8]	Quimopapaína
1077,536	1077,552	IPEYVDWR [1-8]	Papaína
1135,517	1135,564	NSWGTAWGEK [179-188]	Caricaína
1174,619	1174,528	NSWGPNWGEK [179-188]	Quimopapaína
1226,580	1226,630	NTYPYEGVQR [84-93]	Papaína
1266,681	1266,590	ASGNSPGVCGVYR [196-208]	Glicilendopeptidasa
1323,611	1323,671	ASGNSPGVCGVYR [196-208]*	Glicilendopeptidasa
1475,742	1475,767	RAPGNSPGVCGLYK [195-208]*	Caricaína
1592,724	1592,812	NSWGPGWGENGYIR [179-192]	Glicilendopeptidasa
1596,719	1596,809	NSWGTGWGENGYIR [175-188]	Papaína
2035,036	2035,109	GYQSTSLQYVAQNGIHLR [66- 83]	Glicilendopeptidasa
2055,892	2055,965	TGNLNEYSEQELLDCDR [42- 58]*	Papaína
2384,137	2384,008	NQGSCGSCWAFSAVVTIEGIIK [18- 39]*	Papaína
2775,438	2775,373	VQSNNEGSLNIAIAHQPVSVVVEAGR [113-139]	Glicilendopeptidasa
2932,516	2932,419	GAVTPVRHQGSCGSCWAFSAVATVEGINK [11-39]	Caricaína

1Numeración de papaína. * Péptidos carbamidometilados.

Tabla 8. Comparación entre los péptidos obtenidos por digestion trípica de las bandas de bajo PM del SDS-PAGE de la papaína purificada y la digestión trípica teórica de las proteasas de látex de papaína.

2.2.2. Cambios estructurales de papaína

Se puede tener una idea del grado de estabilidad de una proteína luego de su exposición a solventes orgánicos o a distintas condiciones no naturales a partir de la determinación de cambios en su estructura. El análisis de la estabilidad en este caso, a diferencia de las medidas de actividad residual, es indirecto. Los posibles cambios estructurales pueden o no estar relacionados con la actividad, pueden ser perjudiciales, inocuos e, incluso, pueden favorecer la acción enzimática en determinado contexto. Entre las técnicas más utilizadas para este tipo de estudios encontramos la espectroscopía de fluorescencia, la espectroscopía FTIR, el dicroísmo circular y la calorimetría diferencial de barrido.

La estabilidad de papaína en mezclas con ACN, THF, dioxano y MeOH se estudió mediante espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular (Szabó y col., 2006). Las mismas técnicas y solventes se usaron para determinar la estabilidad de pepsina porcina (Simon y col, 2007). Para el estudio de la estabilidad de las proteasas vegetales, araujaína, funastraína y papaína en trece solventes orgánicos se usó espectroscopia FTIR (Quiroga y col, 2007; Barberis y col, 2006). La proteasa animal quimotripsina se estudió mediante fluorescencia intrínseca luego de su incubación en mezclas conteniendo ACN, MeOH, DMF, dioxano y THF (Kijima y col, 1996).

2.2.2.1. Estudios mediante espectroscopía de fluorescencia

2.2.2.1.1. Tipos de medidas de fluorescencia

2.2.2.1.1.1. Fluorescencia intrínseca

Por excitación a λ entre 290 y 295 nm el Trp emite luz como fluorescencia. Esta emisión dependerá del entorno en el que se encuentre el aminoácido. En particular al analizar la fluorescencia en proteínas resulta de gran importancia la emisión de este residuo, ya que resulta ser mucho mayor que la aportada por los otros dos aminoácidos fluorescentes: fenilalanina y tirosina. Irradiando a las proteínas con luz de rango de λ indicado se logra minimizar la interferencia de esos otros dos residuos. El número de Trp presentes en la proteína y el grado de exposición al medio, es decir, si se hallan en la superficie de la proteína, en huecos, pliegues o surcos o si están completamente internalizados condicionan el espectro de emisión que presente la proteína (Lakowicz, 1999). Este tipo de fluorescencia es denominada intrínseca (FI) ya que es propia de las proteínas por lo que prescinde del uso de sustancias fluorescentes adicionales.

Los estudios por espectroscopía de fluorescencia, analizando los cambios en intensidad y en λ máximo de la emisión fluorescente de los residuos de Trp, se han utilizado para determinar el efecto sobre la estructura de las proteínas de distintos factores como el pH (Edwin y Jagannadham, 1998), la temperatura (Sathish y col., 2007), interacciones con sustancias desnaturizantes (Edwin y col., 2002) y uniones covalentes con distintas sustancias (Szabó y col., 2009), entre otros. Otro dato adicional de estos estudios es el parámetro $I_{330/350}$, calculado como el cociente entre la emisión a 330 nm y la emisión a 350 nm (Herlax y Bakás, 2007). Estos λ son característicos de emisión de Trp en entornos distintos: $\lambda_{\text{max}} = 330$ nm para entornos hidrofóbicos como solventes orgánicos y $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm para entornos polares como el medio acuoso. El cambio del valor de $I_{330/350}$ al cambiar las condiciones de incubación de las proteínas podría interpretarse como un cambio en la conformación e incluso como una desnaturización (Herlax y Bakás, 2007).

En este trabajo, se emplearon dos muestras de papaína pura como modelo de lo que sucedería en el extracto crudo, que contiene cuatro endopeptidasas (papaína, quimopapaína, caricaína y glicil endopeptidasa) y otras proteínas en su composición.

Se realizaron dos tipos de ensayos de FI: ensayos directos e indirectos. Los ensayos directos sólo pudieron realizarse en las mezclas conteniendo ACN y en DMF, ya que el MeOH presentó una gran intensidad de fluorescencia en el rango de emisión. En los ensayos indirectos se separó el solvente y luego las proteínas precipitadas se redisolieron en buffer. A partir de estas soluciones se realizaron los espectros de emisión de fluorescencia. En estos casos se pudieron comparar los espectros con los obtenidos con la papaína nativa en buffer.

Una particularidad que sucede en los ensayos directos es que la proximidad de moléculas de solventes distintos al agua produce cambios característicos en la λ máxima (λ_{max}) y en la intensidad de fluorescencia (Lakowicz, 1999). Estos cambios se producen por la interacción diferencial del fluoróforo con el entorno: la polaridad del mismo condiciona el nivel energético del estado excitado y por lo tanto la energía de la emisión. Se ha visto que solventes más polares estabilizan el estado excitado por lo que las emisiones se vuelven menos energéticas (el λ_{max} se desplaza a λ menores, es decir al rojo). Por otra parte es importante el efecto que producen solventes que pueden formar puentes de hidrógeno con el fluoróforo, en estos casos se observa un cambio en el mismo sentido pero mucho más pronunciado en concentraciones bajas del solvente en cuestión.

A fin de discernir si los posibles cambios en estos parámetros son a causa de la presencia del solvente o si provienen de un cambio en la estructura proteica que produzca el

cambio en el entorno de los Trp, se puede realizar el mismo tipo de medidas de FI sobre un derivado de Trp (ATrEE), en cuyo caso los cambios observados se deben solo a la presencia del solvente (Szabó y col., 2006). Si al cambiar el solvente, la diferencia de λ_{\max} entre el ATrEE y la proteína se mantiene, se podría considerar que el entorno de los Trp sólo ha cambiado en la zona expuesta al solvente y no en la zona en contacto con el resto de la proteína, por lo que puede suponer que no existe, al menos en el entorno del residuo Trp, un cambio conformacional (Kijima y col., 1996).

2.2.2.1.1.2. Uso del ANS

El ANS se une a sitios hidrofóbicos de las proteínas expuestos al solvente. Según la conformación y el tamaño de la proteína puede no existir unión o pueden unirse hasta más de 50 moléculas de fluoróforo por molécula de proteína (Cardamone y Puri, 1992). El ANS emite luz con λ entre 400 y 550 nm luego de ser irradiado con luz cercana a los 380 nm; sin embargo esta propiedad sólo la posee cuando se haya en entornos determinados. Así adquiere la posibilidad de fluorescer si se encuentra en las cercanías de sitios hidrofóbicos o si se haya disuelto en solventes orgánicos (Stryer, 1965). Por esta razón no se pueden registrar medidas directas, como las realizadas usando FI, con el ANS.

El ANS se unirá a proteínas de membrana disueltas, o a proteínas de transporte, pero se une poco a proteínas globulares solubles (Cardamone y Puri, 1992). En proteínas desnaturalizadas completamente, cuando estas adoptan la conformación de ovillo estadístico ocultando todas las zonas hidrofóbicas, la unión del ANS es muy baja. La unión del ANS se considera una medida de la hidrofobicidad superficial de las proteínas (Edwin y Jagannadham, 1998; Cardamone y Puri, 1992).

En los primeros ensayos realizados con la papaína se obtuvo una buena respuesta con concentraciones entre 0,2 y 1,0 μM de papaína mezclada con ANS 78 μM en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, por lo que los valores de concentración usados en el resto de los ensayos estuvieron de acuerdo con estos valores.

2.2.2.1.1.3. Ensayos de transferencia (FRET)

El ANS también se emplea en estudios de transferencia de energía por resonancia (FRET: *fluorescent resonance energy transfer*). Cuando se irradia una muestra proteica en presencia de ANS por luz de $\lambda=292$ nm, las moléculas de Trp de la proteína excitadas pueden transferir energía excitando las moléculas de ANS cercanas. Esto es posible ya que

el pico del espectro de emisión de los Trp proteicos (300 a 400 nm) se solapa con el pico del espectro de excitación del ANS (máximo 380 nm). Las moléculas de ANS excitadas emitirán radiación de fluorescencia en el rango de λ típico del ANS (400 a 550 nm). Este fenómeno se manifiesta por la aparición de un pico en el máximo de emisión del ANS (477 nm), aunque los ANS no reciben una excitación directa, y por una disminución del pico correspondiente a la emisión de los Trp de la proteína (340 nm) (Yang y col., 2004). El grado de transferencia dependerá de la distancia entre dador y aceptor y de la cantidad de superposición de los espectros mencionados (Lakowicz, 1999).

2.2.2.1.2. Ensayos directos con ATrEE

Los espectros obtenidos usando el derivado ATrEE mostraron en buffer acuoso un pico a 350 nm, en ACN 90% en 338 nm, en ACN 99% en 332 nm y en DMF, tanto 90% como 99%, en 336 nm (Ver **Tabla 9**). Aunque los valores de intensidades de fluorescencia fueron muy variables, papaína mostró una intensidad de fluorescencia mayor en ACN 99% que en el resto de los medios investigados (**Figura 11**).

Se calcularon los desplazamientos del máximo de emisión de fluorescencia ($\Delta\lambda$) de papaína en las distintas mezclas de solventes respecto del valor observado buffer de pH 8,0 ($\Delta\lambda = \lambda_{\max}$ en la mezcla acuoso-orgánica - λ_{\max} en el buffer acuoso). Se hallaron $\Delta\lambda$ diferentes para las dos proporciones de ACN estudiadas (-12 nm para 90% y -18 nm para 99%) mientras que fueron iguales para el DMF (-14 nm). El efecto de los solventes parece haber llegado a un máximo en el DMF al 90% y no en el ACN.

El derivado ATrEE disuelto en agua genera un espectro de fluorescencia intrínseca desplazado hacia el rojo (λ_{\max} : 350 nm), debido a la gran polaridad del medio y la formación de puentes de hidrógeno entre el indol del ATrEE y el agua. En el otro extremo, en un entorno apolar, el ATrEE mostraría un espectro estructurado con un máximo en 300 nm (Lakowicz, 1999). El ACN y la DMF poseen polaridades muy similares, mucho menores que el agua pero altas en comparación con otros solventes orgánicos. Por otra parte, debido a su condición de solventes apróticos, no forman puentes de hidrógeno. Estas dos características hacen que los espectros del ATrEE en estos medios presenten máximos intermedios entre esos dos valores (300 y 350 nm). Además se debe considerar que, aunque escasa, existe agua en esas mezclas, por lo que el efecto dado por la formación de puentes de hidrógeno existirá (corrimiento al rojo), especialmente en las mezclas con 10% de agua.

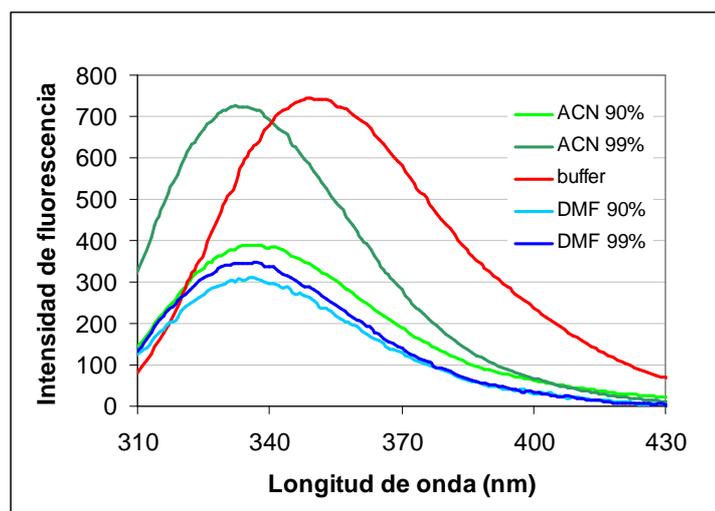


Figura 11. Espectros de fluorescencia de ATrEE disuelto en distintos solventes

2.2.2.1.3. Papaína sin incubar

Espectros de FI. Mostraron grandes picos con máximos entre 341-343 nm para ambas muestras (PPL y PPC). Las λ_{\max} de la papaína están desplazados entre 7 y 9 nm al azul en comparación con los valores observados con el ATrEE en buffer (Ver **Tabla 9**). Esto se explica considerando que el entorno de los residuos Trp de la proteína es menos polar que el entorno del derivado de Trp.

El análisis de estos espectros no es simple ya que existen cinco residuos de Trp en la papaína. Es probable que los espectros correspondan a una suma de las señales provenientes de todos los residuos. Se sabe que residuos internalizados en un entorno completamente hidrofóbico darían una señal con un máximo en 300-310 nm, semejante a la que daría el Trp en un solvente apolar; por otra parte, residuos de Trp completamente expuestos a un medio acuoso darían una señal con un máximo cercano a 350 nm, como en el glucagón (Lakowicz, 1999). Dos de los cinco residuos de papaína se encuentran en el dominio L en hélices α , uno muy expuesto (Trp69) y el otro más interno (Trp26) aunque en un entorno no completamente hidrofóbico. Los otros tres residuos se ubican en el dominio R: Trp7 está en una zona helicoidal, parcialmente expuesto y rodeado por varios residuos hidrofóbicos; el Trp177 se halla muy expuesto en una zona de estructura no definida y el Trp181 se encuentra poco expuesto a la superficie en un giro β (Edwin y Jagannadham, 1998).

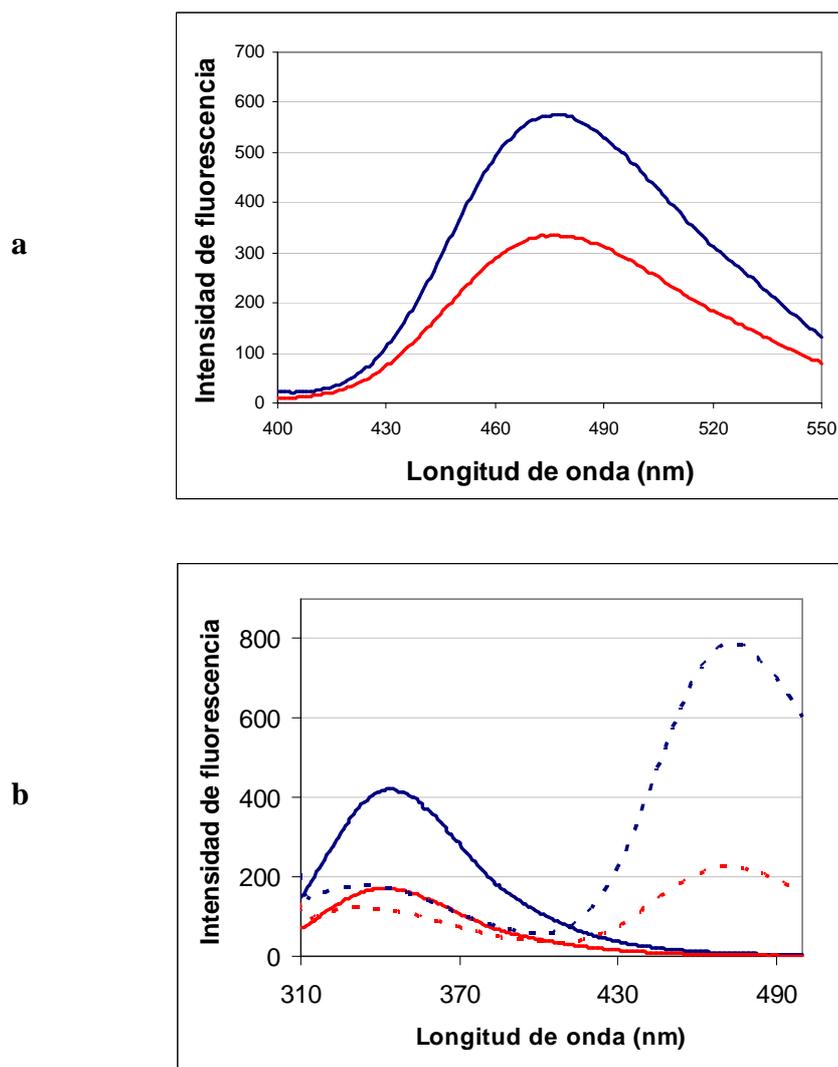
Los espectros de papaína en buffer acuoso mostraron señales coherentes con residuos Trp parcialmente expuestos al medio acuoso. Los residuos más internos en zonas hidrofóbicas deberían generar mayores intensidades de emisión de fluorescencia hacia λ

menores, sin embargo esto no se observó en los espectros. Dicha ausencia podría justificarse por la existencia de uniones por puentes de hidrógeno en las que participe el indol de los mencionados residuos o porque la emisión proveniente de los mismos resultó extinguida por otros residuos de la papaína, como Phe, otros Trp e, incluso, por His (Vos y Engelborghs, 1994). Para simplificar el análisis se puede suponer que la señal proviene de residuos parcialmente expuestos al medio.

Espectros de fluorescencia extrínseca empleando ANS. La unión de esta sonda se produce sobre las zonas hidrofóbicas superficiales de las proteínas. En estos espectros (**Figura 12a**), las muestras PPL mostraron intensidades de emisión de fluorescencia moderadas con máximos en 478 nm, mientras que para las muestras PPC las señales fueron más intensas con máximos en 477 nm. Además se observó que la intensidad de la fluorescencia se incrementó con el aumento de proteínas hasta cierta concentración, en tanto que a valores superiores comenzó a descender. Este fenómeno se puede explicar considerando que al haber más proteínas hay más zonas donde el ANS, que está en exceso, se une. Este aumento de ANS unido aumenta la intensidad de la señal observada. Por otra parte, por encima de una concentración de proteínas es probable que mediante extinción (quenching) colisional se pierda la radiación emitida por esas moléculas de ANS unidas a la proteína. Al aumentar la concentración de proteínas, entonces se perdería cada vez más emisión hasta llegar al punto de no ser detectable por el equipo.

Espectros FRET. Se observaron dos picos, uno alrededor de 340 nm (*pico Trp*) y uno alrededor de 477 nm (*pico ANS*). En la **Figura 12b** se comparan los espectros FRET con los de FI (ya que fueron irradiados a la misma longitud de onda). En la misma se vio un marcado descenso en el *pico Trp* y la aparición del *pico ANS*, cuando en la mezcla se incorporó el ANS.

Realizando el mismo ensayo con distintas concentraciones de proteínas se vio que a bajas concentraciones los picos fueron semejantes en intensidad, mientras que al aumentar la concentración de proteínas aumentó el *pico ANS*, de manera similar a lo que ocurrió en los espectros ANS. La presencia de los dos picos indicó que parte de la luz absorbida por los Trp se transfirió como energía a las moléculas de ANS y parte se emitió directamente como fluorescencia. Se puede pensar en que al menos uno de los Trp expuestos se encuentra cercano a alguna molécula de ANS a la cual transfiere energía. Al mismo tiempo hay uno o más residuos Trp que no transfieren su emisión a ANS ya que aún se observa el *pico Trp*.



Figuras 12. a. Espectros ANS de las muestras de papaína puras en buffer. **b.** Espectros FI (—) y FRET (---) de las mismas. En rojo muestras PPL, en azul muestras PPC.

2.2.2.1.4. Papaína en ACN

Espectros FI. En la **Tabla 9** se resumen los datos de los espectros, tanto los de papaína en ACN 90 y 99%, directos e indirectos, como los de papaína en DMF, MeOH, buffer y todos los correspondientes a ATrEE.

En el caso de las medidas directas de FI, las muestras PPL y PPC en ACN 90% presentaron sus máximos de emisión de fluorescencia a 333 y 334 nm respectivamente, evidenciando un desplazamiento al azul (hacia valores de λ menores) con respecto al buffer. En ACN 99% ese cambio fue más acentuado (λ_{\max} para la muestra PPC fue 327 nm y para la muestra PPL, 330 nm). Se comprobó que la intensidad de emisión aumentó varias veces con respecto a la exhibida en buffer. Esto fue también observado para el ATrEE; sin embargo, el aumento fue mucho más marcado para papaína que para ATrEE. Los valores observados

para el parámetro $I_{330/350}$ también se incrementaron al pasar de buffer a ACN, y fueron mayores a mayor contenido de ACN en la mezcla.

Solventes	Papaína pura		ATrEE	
	λ_{\max}	$I_{330/350}$	λ_{\max}	$I_{330/350}$
ACN 90% ¹	333	1,22	338	1,10
ACN 99% ¹	330	1,30	332	1,26
ACN 90% ²	340	0,96	-	-
ACN 99% ²	342	0,92	-	-
MeOH 90% ²	342	0,96	-	-
MeOH 99% ²	345	1,03	-	-
DMF 90% ¹	332	1,32	336	1,16
DMF 99% ¹	332	1,41	336	1,20
DMF 90% ²	334	1,14	-	-
DMF 99% ²	334	1,19	-	-
Buffer	343	0,94	350	0,67

¹ Determinaciones de FI directa. ² Determinaciones de FI indirecta.

Tabla 9. Valores de λ_{\max} y $I_{330/350}$ de los espectros FI de las muestras PPL y ATrEE incubadas en distintos solventes.

Las muestras incubadas en ACN y redisueltas en buffer (medidas de FI indirecta) mostraron espectros y λ_{\max} de emisión de fluorescencia semejantes a las muestras en buffer (**Figura 13a**). La λ_{\max} para papaína en ACN 90% fue 343 nm y en 99% de ACN fue 342 nm. Estos picos resultaron de mayor intensidad a los de la papaína sin incubar. No se observaron diferencias notorias entre ACN 90% y 99%, así como tampoco se manifestaron cambios significativos luego de distintos tiempos de incubación. El desplazamiento observado en las medidas directas revirtió al redissolver papaína en buffer.

Los espectros de las medidas directas, al igual que los obtenidos con ATrEE en ACN, mostraron un claro desplazamiento de las λ_{\max} a longitudes de onda menores. Sin embargo, el desplazamiento con respecto al buffer en este caso fue de 10 y 13 nm mientras que para el ATrEE había sido de 13 y 18 para 90 y 99% de ACN, respectivamente.

Espectros ANS. En las muestras PPC, se observaron intensidades de fluorescencia muy bajas y, por lo tanto no fue posible determinar los λ_{\max} . En las muestras PPL se vieron intensidades bajas con λ_{\max} dispersos entre 450 y 470 nm, es decir con desplazamientos comprendidos entre 7 y 27 nm a menores λ . Estos cambios se ven, tanto a 90 como a 99%. Los espectros se muestran en la **Figura 13b**.

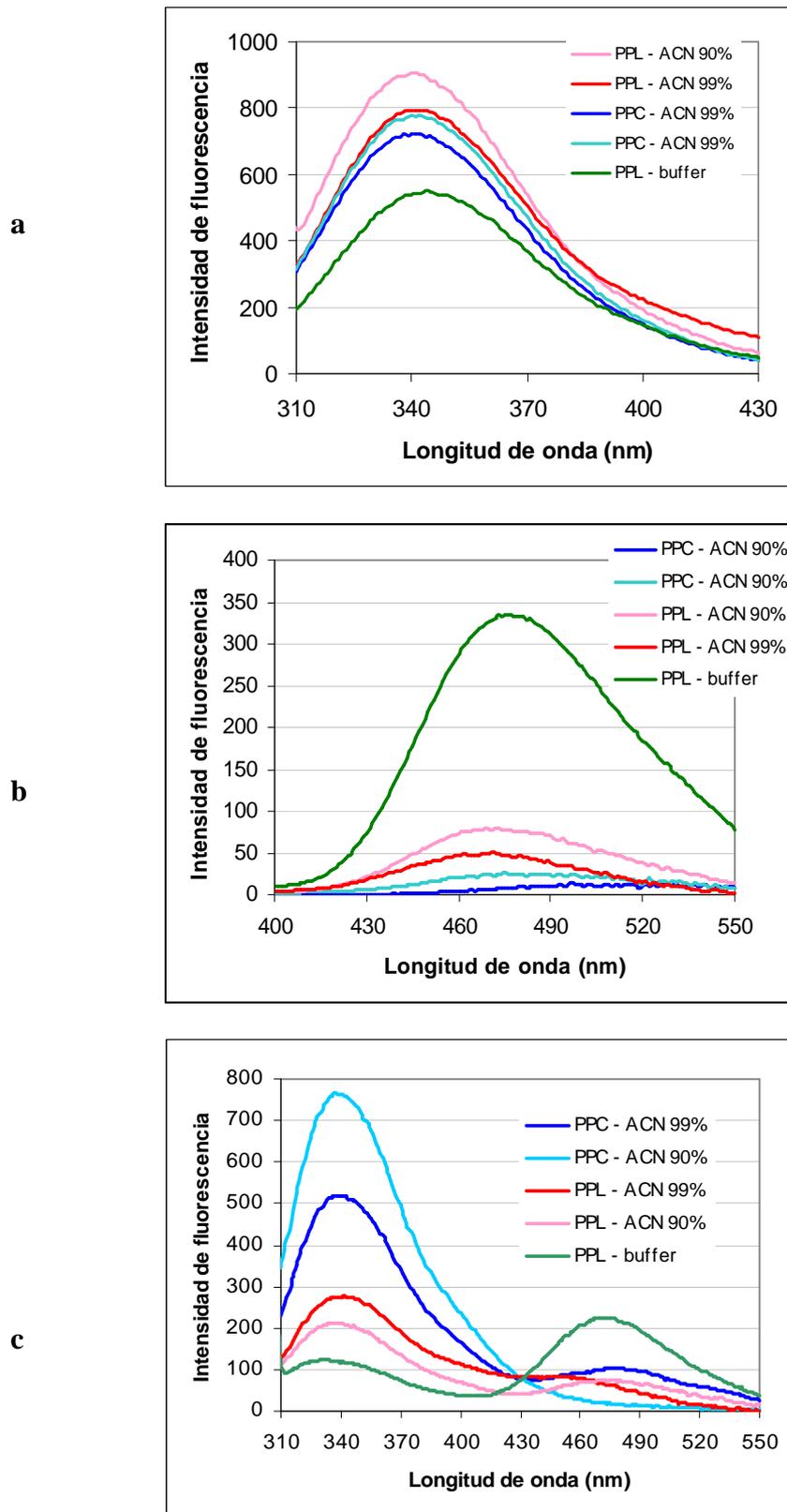


Figura 13. a. Espectros FI indirectos de las papaínas puras (PPL y PPC) incubadas 24 horas en ACN 90 y 99%. **b.** Espectros ANS y **c.** Espectros FRET de las mismas

Espectros FRET. Las muestras PPC mostraron un gran *pico Trp* y no presentaron *pico ANS*, sólo en algunos casos se alcanzó a ver un pequeño hombro en esta zona. En las muestras PPL no se vio la desaparición del *pico ANS*, aunque se observó un predominio evidente del *pico Trp* (**Figura 13c**). Estos resultados resultaron coherentes con los de ANS: para las muestras PPC no se vieron *picos ANS* en los dos tipos de espectros mientras que sí aparecieron en las muestras PPL.

Kijima y col. (1996) establecieron una relación entre el cambio de actividad enzimática (debido a cambio estructural) y el cambio de $\Delta\lambda_{\max}$ entre el que presenta el ATrEE y el de la proteína quimotripsina. Consideraron que el cambio de λ_{\max} de la proteína al cambiar el solvente contiene una componente debida al solvente y una debida a cambios estructurales, mientras que el cambio que sucede para el ATrEE se debe sólo al solvente. En ese sentido propusieron esta expresión:

$$-\Delta\Delta\lambda_{em} = \Delta\lambda^E - \Delta\lambda^{ATrEE} = \Delta\lambda^E(estr) + \Delta\lambda^E(solv) - \Delta\lambda^{ATrEE}(solv) \quad (\mathbf{A})$$

Donde $\Delta\lambda_{em} = \lambda^{ATrEE} - \lambda^E$, $\Delta\lambda^E$ es el cambio de λ para la enzima y $\Delta\lambda^{ATrEE}$ es el cambio de λ para el derivado de Trp.

El cambio provocado por el solvente se minimiza en la resta entre los dos términos de la ecuación y el cambio de $\Delta\lambda$ será producido principalmente por el cambio estructural. La diferencia entre estos valores es atribuible a cambios estructurales. Un valor de 0 para $-\Delta\Delta\lambda_{em}$ habría mostrado que no hubo cambios estructurales. Las muestras de papaína presentaron los valores que se presentan en la **Tabla 10**.

Estas diferencias, junto a las diferencias observadas en intensidad de fluorescencia y las evidenciadas al comparar los distintos valores de $I_{330/350}$ calculados, podrían ser justificadas por un cambio en la estructura de la papaína, es decir que estos cambios no se deberían solo a un efecto del solvente orgánico.

Medio	$\Delta\lambda_{em}$	$-\Delta\Delta\lambda_{em}$
Buffer	350-343 = 7	-
ACN 90%	338-333 = 5	2
ACN 99%	332-330 = 2	5
DMF 90%	336-332 = 4	3
DMF 99%	336-332 = 4	3

Tabla 10. Valores de $\Delta\lambda_{em}$ y $-\Delta\Delta\lambda_{em}$ según la ecuación A para distintos medios.

Los cambios observados en ACN mediante FI indicarían una aparente reversión de la conformación de la papaína al pasar de los medios con alta proporción de este solvente al buffer acuoso original. Sin embargo, los espectros ANS y FRET mostraron diferencias antes y después de incubar.

A pesar de estas diferencias, se puede considerar que los cambios estructurales fueron leves, probablemente a nivel superficial, e incluirían una menor exposición de residuos hidrofóbicos y por ende, una disminución en la unión de ANS. Por otra parte, no afectarían la zona del sitio activo y adyacencias ya que, como se vio en el Capítulo 1, no se encontró afectada la actividad enzimática luego de la incubación. La falta de transferencia se relaciona también con una menor exposición de residuos hidrofóbicos. Por todo esto se puede considerar que el ACN produce cambios que se revierten en parte al redisolverse en buffer pero quedan “secuelas” de esta exposición.

Estos efectos son mayores para las muestras PPC que para las PPL. Esto podría explicarse como un posible efecto protector de las impurezas detectadas en la papaína PPL con respecto a la PPC.

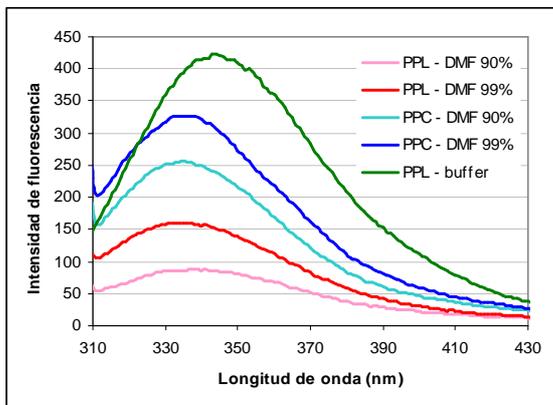
2.2.2.1.5. Papaína en DMF

Espectros FI. En medidas de FI directas se observaron espectros con máximos en 332 nm (**Tabla 9**). Al igual que con ACN, hay un desplazamiento hacia λ menores, sin embargo en este caso fueron observadas mayores intensidades de emisión a 99% que a 90% de solvente orgánico.

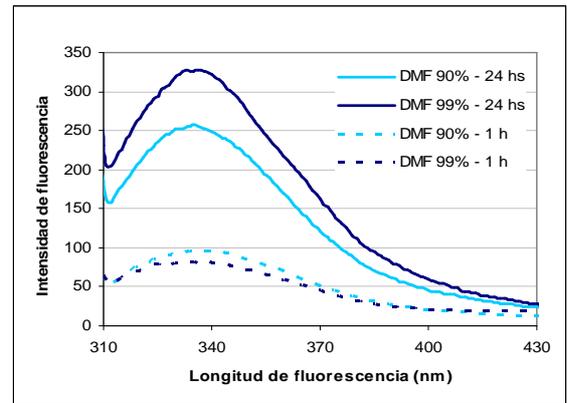
En las medidas indirectas se vieron señales muy intensas considerando que gran parte de las proteínas se pierden en el proceso (ver Capítulo 1 sección 1.2.2.2.3.). Los máximos de los espectros están comprendidos entre 333 y 335 nm (**Figura 14a**). En este caso, las λ_{\max} son similares a las que presentan los espectros de las medidas directas (a diferencia de lo se observó con ACN, donde los espectros revierten a valores de λ_{\max} iguales a los de papaína nativa al redisolverse en buffer). También se vio que las intensidades fueron mucho mayores a 24 horas de incubación que a 1 hora y que el desplazamiento del λ_{\max} fue ligeramente menor para 1 hora (337 nm) (**Figura 14b**).

Espectros ANS. Se observó que a 1 hora de incubación la intensidad es muy baja, mientras que a 24 hs llega a valores apreciables con λ_{\max} entre 473 y 476 nm (sólo ligeramente desplazados con respecto a la nativa). Por otra parte, se observaron intensidades

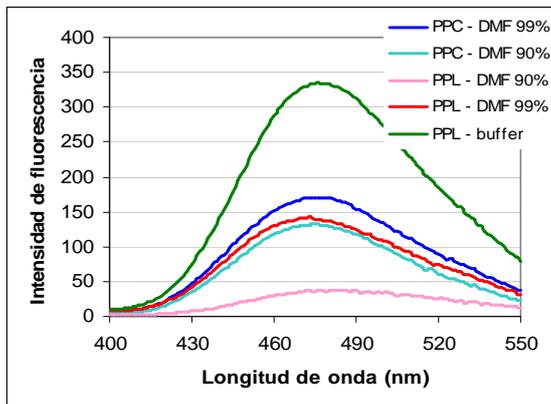
mayores en las muestras PPC que en las PPL, así como señales más intensas en 99% que en 90% de DMF (Figuras 14c y 14d).



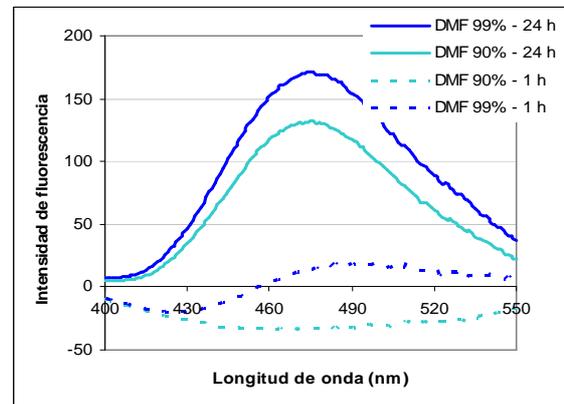
a



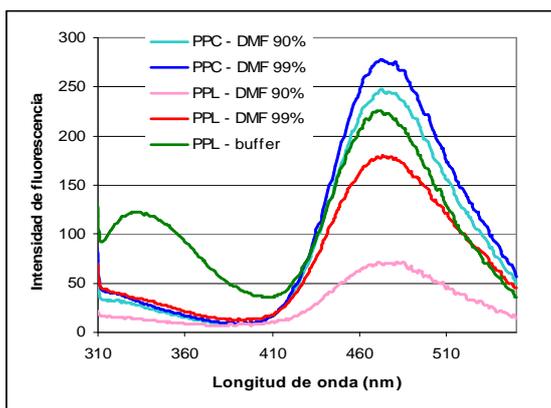
b



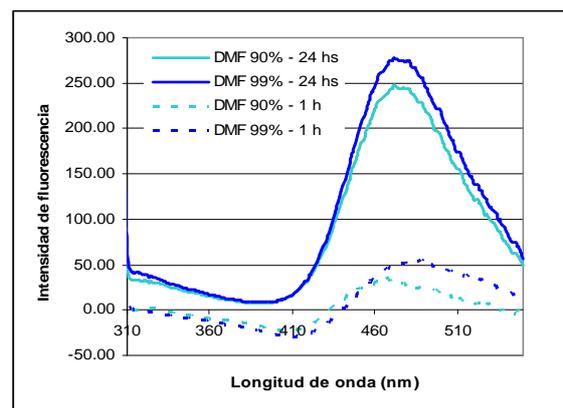
c



d



e



f

Figura 14. a. Espectros FI indirectos de las papaínas puras incubadas 24 horas en DMF 90 y 99%. b. Espectros FI indirectos de PPC incubada 1 y 24 horas en DMF 90 y 99%. c. Espectros ANS de las papaínas puras incubadas 24 horas. d. Espectros ANS de PPC incubada 1 y 24 horas. e. Espectros FRET de las papaínas puras incubadas 24 horas. f. Espectros FRET de PPC incubada 1 y 24 horas.

Espectros FRET. Mostraron, en todos los casos, un *pico* ANS importante y prácticamente nula emisión en la región del Trp. Esto indica que existe una transferencia marcada en todos los espectros analizados. Se vieron diferencias notorias entre 90% y 99% de solvente y entre 1 y 24 horas de incubación (**Figuras 14e y 14f**), lo que es coincidente con lo observado en los espectros de FI y ANS.

El cambio de λ_{\max} en los espectros FI de 343 nm para papaína nativa, a 332 nm incubada en solvente y 335 nm luego de redisolverla en buffer. Los cambios en intensidad entre estos estados se pueden explicar de diversas maneras. Se puede considerar que en la papaína redisuelta quedan restos del solvente unidos, lo que provocaría que el λ_{\max} no vuelva al valor original, pero por otro lado es esperable que en medios con absoluta mayoría de agua esta reemplace rápidamente las moléculas remanentes de DMF. Otra explicación involucraría un cambio conformacional irreversible de la papaína al pasar de buffer a DMF debido a que se observó que existe un componente estructural al analizar el $\Delta\lambda_{\text{em}}$ (**Tabla 10**), además del ya mencionado cambio en las λ_{\max} .

Los ensayos de ANS y FRET refuerzan la hipótesis del cambio conformacional. Por otra parte, se ven en los espectros FI y en los ANS intensidades mayores a las esperables en la papaína nativa, considerando la pérdida de proteínas mencionada.

De acuerdo con los espectros FI indirecta, se podría considerar que existe una disminución de la polaridad en el entorno de los Trp, por lo que los λ_{\max} se desplazan hacia el azul (343 nm a 334 nm). Esta menor polaridad estaría relacionada con cambios en la conformación que provocan aparición de residuos hidrofóbicos cerca de los Trp más expuestos. Estos mismos residuos generarían mayores señales de ANS, ya que proporcionan más sitios de unión a la sonda fluorescente. También se relaciona con el alto nivel de transferencia, ya que los espectros muestran que, prácticamente, toda la energía que absorben los Trp se transfiere a las moléculas de los ANS, esto no sucede en la conformación nativa ya que la transferencia es parcial. El alto nivel de emisión de la FI puede relacionarse también con la exposición de residuos hidrofóbicos, entre ellos otros Trp internos.

Se vieron leves diferencias entre las muestras PPC y PPL. Se comprobó un mayor efecto sobre PPC: esto es coincidente con el efecto apreciado con ACN, donde se explicaba que la PPL puede estar protegida por impurezas de la muestra. También se observaron mayores efectos para 99% que a 90% de solvente orgánico.

Por otra parte, se evidenció que el cambio conformacional inactiva a las enzimas ya que presentaron nula actividad proteolítica especialmente a tiempos largos (ver Capítulo 1). Sin embargo, no se vio el tipo de desnaturalización que sufre la papaína en presencia de cloruro de guanidinio (por ejemplo) ya que la proteína, en presencia del mismo, luego de desplegarse completamente adopta una conformación de ovillo estadístico (random coil) (Edwin y col., 2002), en ese estado los sitios hidrofóbicos se esconden y por lo tanto las señales ANS son nulas.

Fueron notorias en este solvente las diferencias entre incubación durante 1 h y 24 hs (**Figuras 14b, 14d, 14f**). Esto se puede explicar considerando un incremento del cambio conformacional con el tiempo de exposición al DMF. En todos los espectros se observa un marcado aumento de la señal a tiempos largos y señales muy bajas a tiempos cortos. El cambio conformacional a 1 h no superaría el efecto quenching producido en esta nueva conformación, en este caso, donde hay menos cantidad que proteína se podría explicar por extinción por las mismas moléculas de DMF (Fucaloro y col., 1984).

2.2.2.1.6. Papaína en MeOH

Espectros FI. No se pudieron realizar medidas directas en este solvente, debido a su alta emisión en la zona de emisión de los Trp. En las medidas indirectas se ven señales muy bajas en las muestras PPC y levemente mejores en las PPL (**Figura 15a**). Las bajas señales son consistentes con la pérdida de proteínas en el procedimiento de incubación y redisolución en buffer. Por otro lado se vio que, aunque tanto para DMF como para MeOH se recuperan cantidades equivalentes de proteínas en el procedimiento, las señales detectadas luego de incubar en MeOH fueron menores que las observadas usando DMF (ver Capítulo 1, sección 1.2.2.2.3.). Los espectros presentaron intensidades ligeramente mayores para 99% de MeOH que para 90% y no hubo mucha diferencia entre 1 y 24 hs. Con respecto a las λ_{\max} en las muestras con intensidades aceptables se observaron resultados muy variables en algunos casos un poco menores que la papaína nativa (338-340 nm y 333-335 nm). Los parámetros $I_{330/350}$ calculados (**Tabla 9**) en estos casos arrojaron valores muy cercanos a los de papaína en buffer.

Espectros ANS. Tanto para las muestras PPL como para PPC se vieron intensidades de fluorescencia menores que la papaína nativa. En MeOH 99% este descenso fue más marcado. Para altas concentraciones proteicas se observan los efectos de quenching descritos previamente. En muestras PPL se obtuvo un λ_{\max} en 465 nm, es decir desplazado

hacia λ menores con respecto a la nativa, aunque no tanto como en el caso del ACN. En PPC se ve algo parecido aunque no tan desplazado al azul (469nm) (**Figura 15b**).

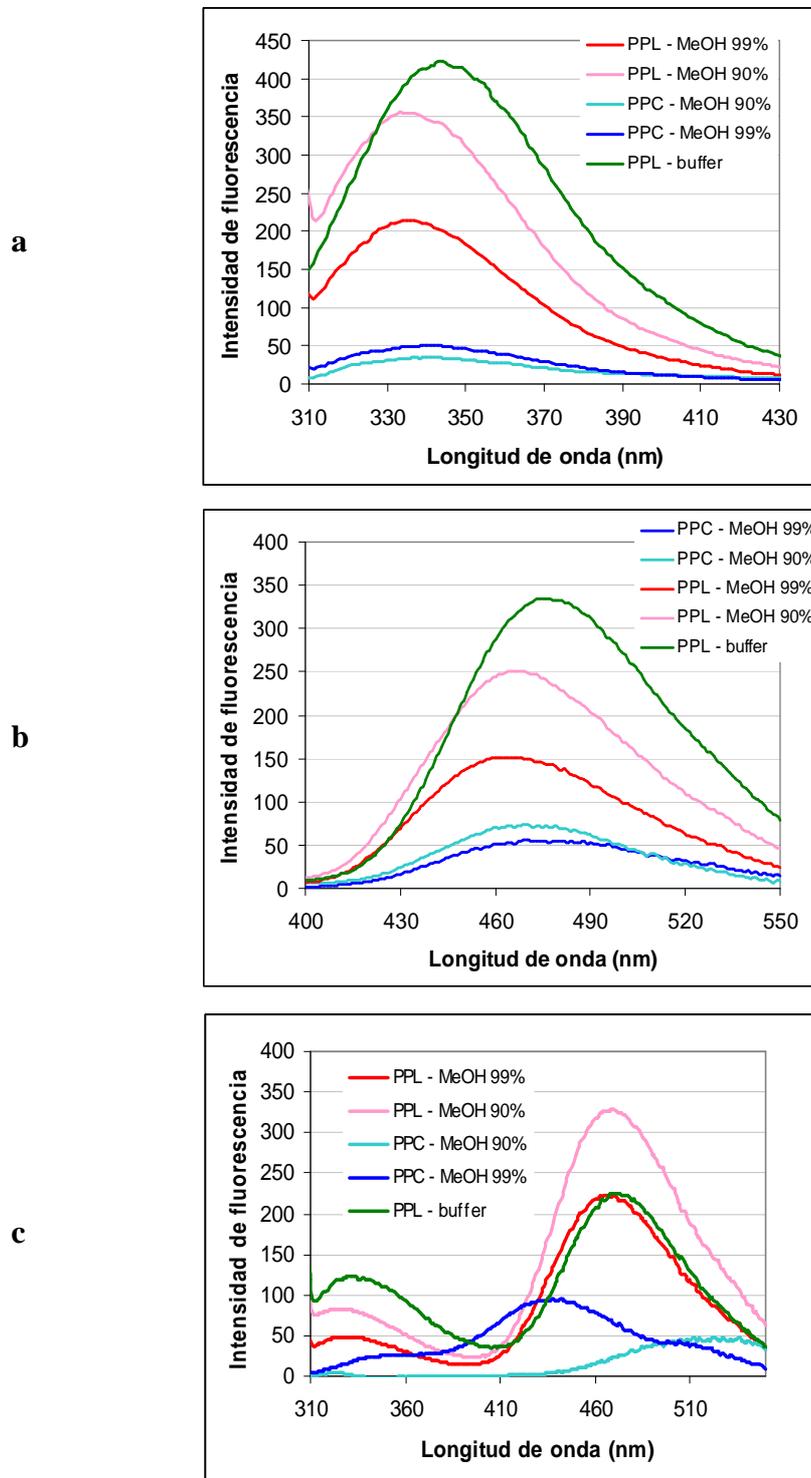


Figura 15. a. Espectros FI indirectos de las papaínas puras (PPC y PPL) incubadas 24 horas en MeOH 90 y 99%. **b.** Espectros ANS y **c.** Espectros FRET de las mismas

Espectros FRET. Se vio una clara transferencia en las muestras PPL, disminuyó el *pico Trp*, con respecto a FI, y aparece un importante *pico ANS*. En las muestras incubadas en MeOH 90% la transferencia fue mayor que en MeOH 99%, hecho coincidente con lo observado en los espectros ANS. Se observa algo similar a lo que ocurre con papaína nativa, pero con intensidades menores. Para las muestras PPC, en cambio, los espectros resultaron de tan baja intensidad que no se pudieron analizar (**Figura 15c**).

Los cambios observados en los espectros FI y ANS de papaína en MeOH con respecto a los que presentó en buffer fueron leves desplazamientos λ_{\max} . Por otro lado, es posible advertir un descenso en las intensidades de estos espectros, atribuibles a la pérdida de proteínas del procedimiento. El MeOH produce que la papaína forme grandes aglomerados insolubles, sin embargo, también es evidente que parte de la papaína permanece soluble y por lo tanto se evidencian disminuciones en las medidas de actividad, proteínas y por lo tanto en las medidas de fluorescencia (Capítulo 1). Estos precipitados, sin embargo, no fueron iguales entre las muestras PPL y PPC. En el primer caso se pudo observar señales significativas sobre las cuales fue posible realizar análisis mientras que para las PPC son tan bajas que eso no fue posible. La papaína que permanece soluble conservó las características de la papaína sin incubar con leves diferencias manifestadas por los espectros. Entre ellas se vio un leve desplazamiento hacia menores λ de la FI. Esto podría deberse a un incremento en la hidrofobicidad en el entorno de los residuos Trp, aunque en mucho menor grado que lo que ocurriría en DMF). Se evidenció además un pequeño corrimiento del λ_{\max} de los espectros de ANS, también observado con los demás solventes. También se observó un aumento en la transferencia explicable por la suposición de aumento del entorno hidrofóbico sobre los Trp, mencionado. Este efecto fue mucho menos marcado que para el DMF.

Por último, el efecto de aglomeración sería mayor al ser mayor la concentración de MeOH y también al pasar más tiempo de incubación, ya que las señales a mayor proporción de solvente orgánico y mayor tiempo de incubación fueron menores.

2.2.2.2. Estudio mediante FTIR

El análisis del espectro infrarrojo de las enzimas en la región de la Amida I (1700 a 1600 cm^{-1}) provee información cuali y cuantitativa de los distintos componentes de la estructura secundaria de la enzima (Barth y Zscherp, 2002; Barth, 2007). La señal Amida I se origina a través de las vibraciones de estiramiento de los grupos carbonilo C=O del grupo

peptídico. El estudio de dicha señal provee información de la estructura secundaria de las enzimas porque está influenciada por pequeñas variaciones de la geometría molecular y por las interacciones puentes de hidrógeno que se producen en el interior de las proteínas.

La deconvolución de la banda Amida I de las muestras de papaína, PPC y PPL, permitió establecer que está compuesta por ocho a diez bandas que corresponden a la hélice alfa, lámina beta, giros beta y estructura desordenada (Quiroga y col., 2007; Ghosh, 2005). La **Tabla 11** indica los números de onda y las asignaciones de las señales infrarrojas de la estructura secundaria de la papaína (Barth, 2007; Kong y Yu , 2007; Foresti y col., 2010; Lau y col., 2004).

El FTIR-ATR reemplaza, como se detalló en la sección 2.1.2.2.1 el H₂O por D₂O. Este procedimiento permite observar las señales IR en la zona de Amida I (1700-1600 cm⁻¹) sin la perturbación introducida en los espectros por la intensa señal de agua a 1640 cm⁻¹ [$\delta(\text{OH})$].

Los resultados obtenidos mediante ambos métodos fueron muy similares, por lo que para realizar el análisis de los espectros se consideró el proveniente de FTIR-ATR por su mayor exactitud.

Número de onda (cm ⁻¹)	Estructura asignada
1610-1618	Agregados
1625-1628	Lámina β
1631-1634	Lámina β
1635-1640	Lámina β
1642-1648	Desordenado
1655-1658	Hélice α
1668-1672	Giro β
1674-1680	Giro β
1680-1687	Giro β
1697	Lámina β

Tabla 11. Asignación de picos de la deconvolución de los espectros de FTIR.

Como se vio anteriormente, la papaína es una enzima consistente en una cadena polipeptídica simple plegada en dos dominios de tamaño similar, pero de distinta conformación. Estos dominios son denominados L (izquierdo) y R (derecho), siendo la estructura secundaria predominante la hélice α para el dominio L y la hoja plegada β para el dominio R. La molécula está plegada de tal forma que entre los dos dominios queda una hendidura donde se encuentra el sitio activo; los aminoácidos de la tríada catalítica

proviene de ambos dominios. La triada está compuesta por Cys 25 en una hélice α del dominio L, His 159 en hoja β y Asn 175 en estructura al azar, ambas en el dominio R, el residuo Gln 19 que también cumple un rol importante en la catálisis enzimática, se ubica en una estructura al azar del dominio L (Kamphuis y col., 1984).

La estructura cristalográfica de Kamphuis y colaboradores (1984), almacenada en el protein data bank (PDB) mostró, para las dos principales estructuras secundarias porcentajes entre 25 y 30% para las hélices α y entre 17 y 22% para las hojas β .

Los porcentajes de cada estructura en papaína incubada en distintos medios se muestran en la **Figura 16**.

En buffer bórico-borato 0,1 M de pH 8, papaína presentó un 23% de hélice α y 26% de hoja plegada β , porcentajes similares a los datos de la estructura cristalográfica (Kamphuis y col., 1984). También fue similar a los datos obtenidos por otros autores usando FTIR-ATR y otras técnicas (Szabó y col., 2006; Goormaghtigh y col., 1990; Kamphuis y col., 1984; Oberg y col., 2003). En la **Figura 17a** se muestran los espectros deconvolucionados de papaína (muestra PPL) en buffer bórico-borato 0,1 M de pH 8.

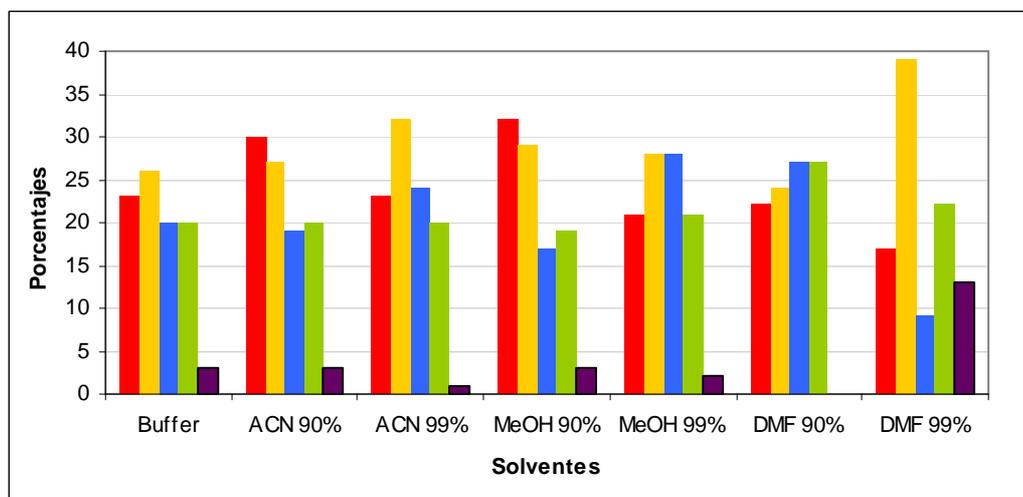


Figura 16. Porcentajes de estructuras secundarias en papaína incubada en distintos solventes obtenidos mediante espectroscopía FTIR-ATR. ■ Hélices α , ■ láminas β , ■ giros β , ■ estructuras al azar, ■ agregados.

Los cambios en ACN 90% fueron superficiales, sin afectar notoriamente su actividad. El principal cambio en la estructura secundaria se debió al aumento de estructuras hélice α (**Figura 16**). El espectro deconvolucionado se muestra en la **Figura 17b**. En ACN 99%, en cambio se ve, principalmente, un aumento de láminas β (**Figuras 16 y 17c**).

Los cambios en ambos medios se pueden interpretar como una mayor estructuración que afecta la exposición de distintos residuos. Como mediante los estudios de fluorescencia se observó una escasa unión de ANS y nula transferencia, se puede suponer que estos cambios redujeron la exposición de Trp y de zonas hidrofóbicas, siendo este comportamiento levemente más acentuado para ACN 99% que 90%. Sin embargo, estas modificaciones estructurales se darían en regiones alejadas del sitio activo, ya que la actividad catalítica no se vio afectada. Por otro lado, estos cambios otorgarían una mayor estabilidad a la proteína ya que vemos que la actividad no se pierde en el tiempo de incubación (Capítulo 1).

En presencia de MeOH 90%, la deconvolución de los espectros FTIR-ATR mostró un aumento de estructura hélice α que podría deberse a una transición conformacional desde regiones al azar, además se ve un leve aumento de láminas β (**Figura 16**). Este comportamiento fue similar al observado en EtOH al 90% (Szabó y col., 2006). En la **Figura 17d** se ve el espectro deconvolucionado de la papaína en este medio.

Aunque los cambios en la estructura secundaria observados en MeOH 90% son similares a los de ACN 90%, en MeOH 90% la actividad enzimática disminuyó un 50% (Capítulo 1). Estos cambios, por lo tanto, no estarían involucrando las mismas regiones de la papaína. En el caso del MeOH 90% las modificaciones en la estructura, al parecer menores, estarían ocasionando un cambio conformacional parcial en el sitio activo, mientras que en ACN 90% ocurrirían superficialmente. Por otro lado, y en forma inversa a ACN 90%, estas modificaciones no afectan significativamente la exposición de Trp y regiones hidrofóbicas ya que los espectros de fluorescencia no muestran diferencias importantes con los vistos en papaína en buffer acuoso.

En MeOH 99%, en cambio, se observó un aumento de giros β , un leve aumento en la proporción de lámina β y estructuras desordenadas y un descenso de hélice α (**Figuras 16 y 17e**). La pérdida de actividad observada puede deberse a la desaparición de hélices α del dominio L ya que la Cys 25 del sitio activo se encuentra en una de ellas. Por otra parte las nuevas estructuras β permitirían que residuos hidrofóbicos queden expuestos explicando los espectros de FI y FRET. Al igual que en MeOH 90% los cambios más drásticos se darían en cerca del sitio activo.

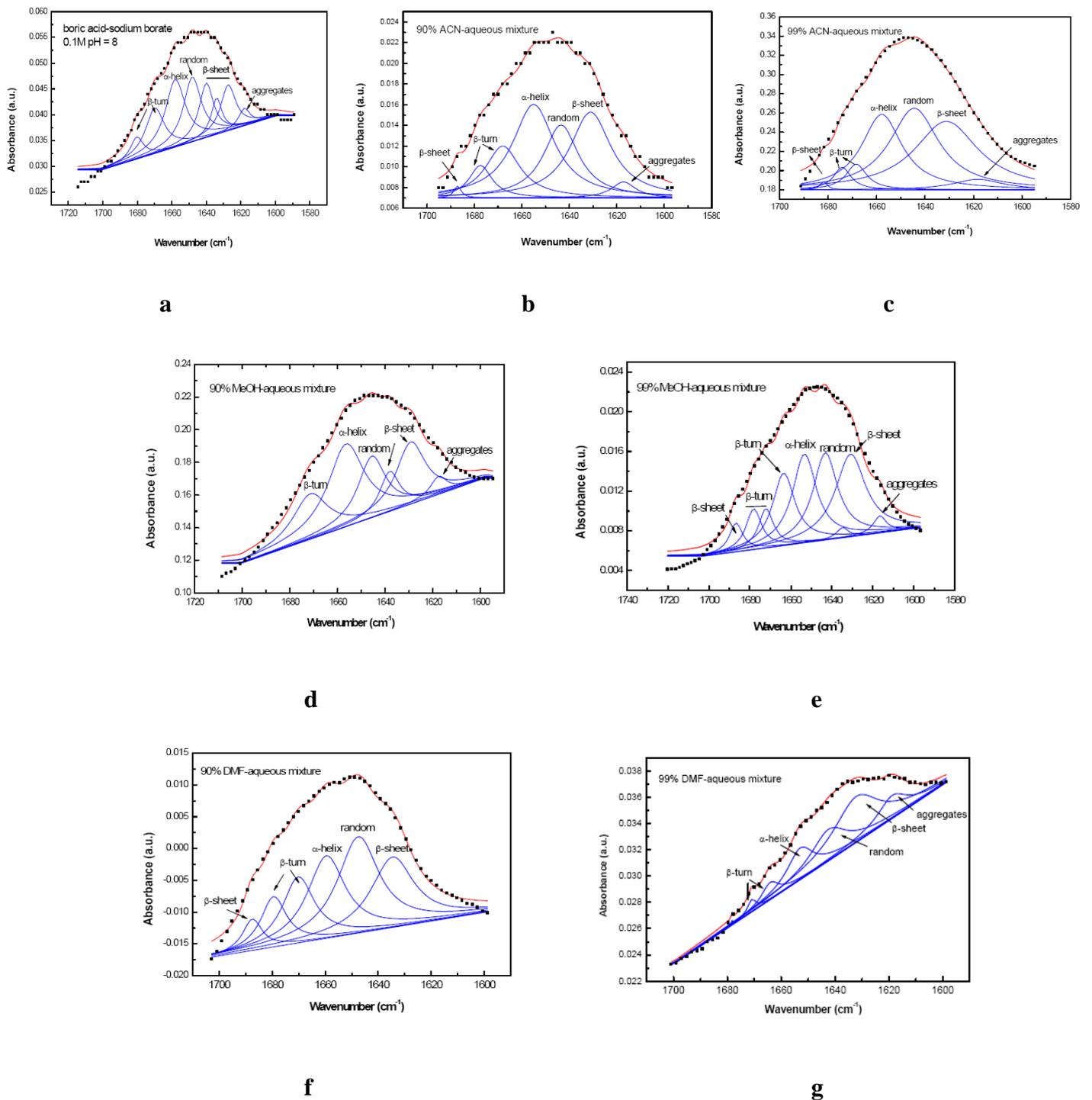


Figura 17. a. Espectro FTIR deconvolucionado de papaína, muestra PPL, (banda Amida I) en buffer bórico-borato de pH 8,5. b. en ACN 90%. c. en ACN 99%. d. en MeOH 90%. e. en MeOH 99%. f. en DMF 90%. g. en DMF 99%

En DMF 90% se incrementaron levemente los giros β y las estructuras al azar, mientras que las proporciones de estructuras hélices α y láminas β disminuyen (**Figuras 16** y **17f**). Es decir, las modificaciones observadas fueron leves con respecto a la papaína en

buffer. Estos resultados contrastan con los drásticos cambios observados mediante los estudios de fluorescencia. Se podría proponer que se formaron bolsillos hidrofóbicos en la superficie enzimática debido al aumento de los giros β y las estructuras al azar para explicar los cambios en los espectros de fluorescencia, especialmente cuando se empleó la sonda ANS. Por otra parte, estos cambios afectaron seriamente e irreversiblemente el sitio activo de la papaína.

Los cambios observados en DMF 99% fueron los más notables: gran aumento en la proporción de estructuras láminas β y agregados y disminución de hélice α y giros β (**Figuras 16 y 17g**). La magnitud de los cambios, en este caso, sí se pudo correlacionar bien con lo observado en los estudios por fluorescencia y con las medidas de actividad enzimática ya que en ellos también se observaron cambios notorios. Estos cambios explicarían la pérdida absoluta de actividad y la exposición de residuos hidrofóbicos que generaron las alteraciones en los espectros de fluorescencia.

2.3. Conclusiones

2.3.1. Purificación de papaína

Se logró purificar papaína a partir de dos fuentes distintas, un extracto hidrosoluble obtenido en nuestro laboratorio (pap L) y un extracto crudo comercial (pap F), mediante un método muy simple. La purificación constó de dos pasos de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (de 0,45 y 0,4% de saturación) y un paso de precipitación con NaCl, mediante los cuales se separó papaína de las otras proteasas. Se eligió este método por su simplicidad y porque puede ser escalado a nivel industrial con bajos costos. Todos los pasos se realizaron en presencia de tetrionato sódico (TT) en distintas concentraciones, para preservar la actividad enzimática. De esta manera se evitó la oxidación del sitio activo de la papaína. La mejor concentración de TT encontrada fue 30 mM. La purificación así realizada tuvo rendimientos de alrededor del 3% (6,8 mg/g de sólido con el máximo de actividad). Para el extracto comercial, en cambio se obtuvieron mejores rendimientos en ausencia de TT (5,6 mg/g de sólido, 2%) probablemente debido a la presencia de otros agentes estabilizantes que pudieran interferir con el TT y la purificación. Se considera que si se usara TT desde las primeras etapas de recolección del látex se podrían obtener mejores rendimientos (Espin e Islam, 1998).

Se usaron variadas técnicas para determinar la pureza del producto: SDS-PAGE, IEF y zimogramas, cromatografías de intercambio iónico, espectrometría de masas MALDI-TOF y PMF. Cada técnica aportó datos valiosos sobre la purificación pero sólo con el análisis de los PMF del producto liofilizado y de las bandas de la SDS-PAGE demostraron que se obtuvo un producto altamente purificado, así como la naturaleza y el origen de las escasas impurezas aún presentes. Se confirmó que el producto purificado contenía papaína pura y que las impurezas observadas como bandas de bajos PM en las SDS-PAGE fueron péptidos provenientes de los cuatro proteasas.

2.3.2. Estabilidad de papaína en distintos medios acuoso-orgánicos

Los distintos análisis mediante espectroscopías de fluorescencia y FTIR-ATR fueron útiles para profundizar sobre las causas de los cambios observados en la actividad proteolítica de la papaína purificada cuando fue expuesta a distintos solventes. Esta información, además, podría relacionarse con lo que sucede con los extractos crudos ya que, en lo que se refiere a actividad residual, presentan un comportamiento similar a la papaína pura, como se vio en el Capítulo 1. Estos estudios resultan de importancia para analizar la posibilidad del uso de las enzimas como biocatalizadores en este tipo de medios.

Los sistemas investigados contenían 1 ó 10% de buffer acuoso de pH 8,0 y 90 ó 99% de ACN, MeOH o DMF. Se observó una estructura ligeramente más compacta y estructurada en todos los medios investigados cuando se la comparó con la de la proteína en un ambiente acuoso. Sin embargo, no se detectaron grandes cambios en las estructuras secundarias como se ha observado para otras enzimas (Bordusa, 2002).

En ACN se vio que la actividad varía muy poco a pesar de la mayor estructuración que mostraron los estudios espectroscópicos. Esto puede explicar porque el ACN es uno de los solventes de elección para las reacciones biocatalizadas de formación de uniones peptídicas. El MeOH provocó un descenso grande en la actividad enzimática, el que podría explicarse por la formación de agregados proteicos insolubles y por los cambios en la estructura secundaria que deformarían el sitio activo de la papaína, aunque mediante fluorescencia no se vieron cambios importantes. DMF, un cosolvente que aumenta la solubilidad de derivados de aminoácidos comúnmente usados como sustratos en las determinaciones de actividad hidrolítica (Fernández y col., 1991), demostró ser el solvente más agresivo de los tres ensayados en este estudio, ya que provocó la inactivación de la papaína luego de 1 h de incubación. Los estudios de fluorescencia revelaron un cambio

global irreversible en la ubicación de los Trp luego de 24 hs. de incubación. Sin embargo en DMF 90% sólo se observaron cambios menores en la estructura secundaria. Estos cambios provocaron la pérdida irreversible de la actividad catalítica.

Los ensayos espectroscópicos indicaron una pérdida de flexibilidad de la papaína, hecho observado en otros estudios (Bordusa, 2002). Sin embargo este efecto no explica por qué los resultados de la actividad caseinolítica residual son distintos en cada caso. Esto podría relacionarse por la capacidad de algunos solventes de producir leves modificaciones en lugares que no afectan al sitio activo, mientras que otros lo hacen esencialmente en el mismo, en mayor o menor grado provocando la inactivación parcial o total de la enzima.

De acuerdo a estos resultados se confirmó que el ACN fue el menos nocivo de los solventes ensayados, en lo referente a la estabilidad estructural y catalítica de la papaína. El uso del MeOH podría restringirse a tiempos cortos de ensayo y proporciones no muy elevadas de dicho solvente. Finalmente, se confirmó la nocividad del DMF como cosolvente en altas proporciones como medio para usar estas enzimas, hecho también observado en otras proteasas con excepción de la subtilisina. Esta observación impone una limitación importante en el uso de la papaína ya que el DMF (como el DMSO) es capaz de disolver azúcares y aminoácidos de difícil disolución en otros solventes (Pedersen y col., 2003).

2.4. Bibliografía

- Abdelkafi, S., Ogata, H., Barouh, N., Fouquet, B., Lebrun, R., Pina, R., Scheirlinckx, F., Villeneuve, P., Carriere, F. (2009). Identification and biochemical characterization of a GDSL-motif carboxylester hydrolase from *Carica papaya* latex. *Bioch Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lip*, **1791**: 1048-1056
- Albeck, A.; Kliper, S. (1997). Mechanism of Cysteine Protease Inactivation by Peptidyl Epoxides. *Biochem. J.*, **322**: 879-884.
- Azarkan, M.; El Moussaoui, A.; van Wuytswinkel, D.; Dehon, G.; Looze, Y. (2003). Fractionation and Purification of the Enzymes Stored in the Latex of *Carica papaya*. *J. Chrom. B*, **790**: 229-238.
- Baines, B.S.; Brocklehurst, K. (1979). A Necessary Modification to the Preparation of Papain from any High-Quality Latex of *Carica papaya* and Evidence for the Structural Integrity of the Enzyme Produced by Traditional Methods. *Biochem J.*, **177**: 541-548.
- Barrett, A., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (2004). *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, pp. 1072-1074.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim, Biophys. Acta-Bioenergetics*, **1767**: 1073-1101.
- Barth, A., Zscherp, C. (2002). What vibrations tell about proteins?. *Q. Rev. Biophys.*, **35**: 369-430.
- Baskin, S.I.; Kirby, S.D. (1990). The Effect of Sodium Tetrathionate on Cyanide Conversion to Thiocyanate by Enzymatic and Non-enzymatic Mechanisms. *J. Appl. Toxicol.*, **10**: 379-382.
- Blumberg, S.; Schechter, I.; Berger, A. (1970). The Purification of Papain by Affinity Chromatography. *Eur. J. Biochem.*, **15**: 97-102.
- Boller, T. (1986). *Plant Proteolytic Enzymes*, Vol. 1; CRC Press Inc: Boca Ratón, Florida; 76 pp.
- Bordusa F. (2002). Proteases in organic synthesis. *Chem Rev*; **102**: 4817-4867.
- 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**: 248-254
- Brocklehurst, K.; Carlsson, J.; Kierstan, M.P.J.; Crook, E.M. (1973). Preparation of Fully Active Papain from Dried Papaya Latex. *Biochem. J.*, **133**: 573-584.

- Bruno, M.A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., López, L. M. I. (2008). Purification and characterization of Hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *Protein J*, **27**: 426-433
- Burke, D.E.; Lewis, S.D.; Shafer, J.A. (1974). A Two-Step Procedure for Purification of Papain from Extract of Papaya Latex. *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**: 30-36.
- Cardamone M., Puri, N.K. (1992). Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.*; **282**: 589–593.
- Domínguez de María, P.; Sinisterra, J.V.; Tsai, S.-W.; Alcántara, A.R. (2006). *Carica papaya* Lipase (CPL): An Emerging and Versatile Biocatalyst. *Biotechnol. Adv.*, **24**: 493-499.
- Domsalla, A., Melzig, M.F. (2008). Occurrence and properties of proteases in plant lattices. *Planta Med.* **74**: 699–711
- Drenth, J., Kalk, K.H. and Swen, H.M. (1976). Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain. *Biochemistry* **15**: 3731-3738
- Edwin, F., Jagannadham, M.V. (1998). Sequential Unfolding of Papain in Molten Globule State. *Biochem. Biophys. Res. Comm* **252**: 654-660
- Edwin, F., Yagya Valkya Sharma, Jagannadham, M.V. (2002). Stabilization of Molten Globule State of Papain by Urea. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **290**: 1441-1446
- El Mossaui, A.; Nijs, M.; Paul, C.; Witjens, R.; Vincentelli, J.; Azarkan, M.; Looze, Y. (2001). Revisiting the Enzymes Stored in the Laticifers of *Carica papaya* in the Context of Their Possible Participation in the Plant Defence Mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**: 556-570.
- Espin, N.; Islam, M.N. (1998). Stabilization of Papain from Papaya Peels. *Food Sci. Technol. Int.*, **4**: 179-187.
- Falkner, J.A., Kachman, M., Veine, D.M., Walker, A., Strahler, J.R., Andrews, P.C. (2007). Validated MALDI-TOF/TOF mass spectra for protein standards. *J Am Soc Mass Spectrom.* **18**: 850–855.
- Fernández MM, Clark DS, Blanch HW. (1991). Papain kinetics in the presence of a watermiscible organic solvent. *Biotechnol Bioeng*; **37**: 967-972.
- Foresti ML, Valle G, Bonetto R, Ferreira ML, Briand LE. (2010). FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. *Appl Surf Sci*; **256**: 1624-1635.
- Fucaloro, A. F., Forster, L. S., Campbell, M. K. (1984). Fluorescence quenching of indole by dimethylformamide. *Photochemistry and Photobiology.* **39**: 503–506.
- Gateway to isoelectric point service. <http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>. Last Updated: Wednesday, 7 June 1995. Accessed on-line: 03/10/2009.
- Ghosh, S. (2005). Conformational study of papain in the presence of sodium dodecyl sulfate in aqueous medium. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **41**: 209-216.
- Gianazza, E., Righetti, P.G. (1980). Facts and artifacts in isoelectric focusing, In “*Electrophoresis*” 79 Radola, B.J., Ed.) Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 129-140.
- Goormaghtigh E, Cabiaux V, Ruyschaert JM. (1990). Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by ATR-FTIR on hydrated films. *Eur J Biochem*; **193**: 409-420.
- Hatch, R.C.; Laflamme, D.P.; Jain, A.V. (1990). Effects of Various Known and Potential Cyanide Antagonists and a Glutathione Depletor on Acute Toxicity of Cyanide in Mice. *Vet. Hum. Toxicol.*, **32**: 9-16.
- Herlax, V., Bakás, L. (2007). Fatty acids covalently bound to a-hemolysin of *Escherichia coli* are involved in the molten globule conformation: implication of disordered regions in binding promiscuity. *Biochemistry.* **46**: 5177-5184.
- Kamphuis IG, Kalk KH, Swarte MBA, Drenth J. (1984). Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J Mol Biol*; **179**: 233-256.
- Kijima, T., Yamamoto, S., Kise, H. (1996). Study on tryptophan fluorescence and catalytic activity of a-chymotrypsin in aqueous-organic media. *Enzyme and Microbial Technology.* **18**: 2-6
- Kimmel, J.R.; Smith, E.L. (1954). Crystalline Papain. I. Preparation, Specificity, and Activation. *J. Biol. Chem.*, **207**: 515-531.
- Kong J, Yu S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin*; **39**: 549-559.
- Lakowicz, J.R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York,, p. 475
- Lang A, Hatscher C, Kuhl P. (2007). Papain-catalysed synthesis of Z-L-aminoacylantipyridine amides from Z-protected amino acid esters and 4-aminoantipyridine. *Tetrahedron Lett*; **48**: 3371-3374.
- Lau R.M., Sorgedragger M.J., Carrea G., van Rantwijk F., Secundo F., Sheldon R.A. (2004). Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity. *Green Chem*; **6**: 483-487.
- Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). Acceso online: 26/07/2010),
- Matsumoto, K., Yamamoto, D., Ohishi, H., Tomoo, K., Ishida, T., Inoue, M., Sadatome, T., Kitamura, K., Mizuno, H. (1989). Mode of

- binding of E-64-c, a potent thiol protease inhibitor, to papain as determined by X-ray crystal analysis of the complex. *FEBS Lett.* **245**: 177-180
- Monti, R.; Basilio, C.A.; Trevisan, H.C.; Contiero, J. (2000). Purification of Papain from Fresh Latex of *Carica papaya*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, **43**: 501-507.
- Morcelle, S. R.; Trejo, S. A.; Canals, F.; Avilés, F. X.; Priolo, N. S. (2004). Funastrain c II, a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*. *Protein J.*, **23**: 205-215
- Morcelle, S.R.; Caffini, N.O.; Priolo, N. (2004). Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. *Fitoterapia*. **75**: 480-493
- Murachi, T., Tudzuki, T., Okumura, K. (1975). Photosensitized Inactivation of Stem Bromelain. Oxidation of Histidine, Methionine, and Tryptophan Residues. *Biochemistry*, **14**: 249-255.
- Napper, A.D., Bennett, S.P., Borowski, M., Holdrige, M.B., Leonard, M.J.C., Rogers, E.E., Duan, Y., Laursen, R.A., Reinhold, B., Shames, S.L. (1994). Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem. J.* **301**: 727-735.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988). An Improved Procedure for Staining of Proteins Following Separation in Polyacrylamide Gels is Described which Utilizes the Colloidal Properties of Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**: 255-262.
- Nie, H.-L., Chen, T.-X.; Zhu, L.-M. (2007). Adsorption of Papain on Dye Affinity Membranes: Isotherm, Kinetic, and Thermodynamic Analysis. *Sep. Purif. Technol.*, **57**: 121-125.
- Nitsawang, S.; Hatti-Kaul, R.; Kanasawud, P. (2006). Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme Microb. Technol.* **39**:1103-1107.
- Oberg, K.A., Ruysschaert, J.M., Goormaghtigh, E. (2003). Rationally selected bases proteins: a new approach to selecting proteins for spectroscopic secondary structure analysis. *Protein Sci.* **12**: 2015-2031.
- Obregón, W.D., C.S. Liggieri, S.R. Morcelle, S.A. Trejo, F.X. Avilés, N.S. Priolo. (2009) Biochemical and PMF MALDI-TOF analyses of two novel papain-like proteinases. *Protein Pept. Lett.* **16**: 1323-1333.
- Obregón, W.D.; Arribére, M.C.; Morcelle del Valle, S.; Liggieri, C.; Caffini, N.O.; Priolo, N.S. (2001). Two New Cysteine Endopeptidases Obtained from the Latex of *Araujia hortorum* Fruits. *J. Protein Chem.*, **20**: 17-25.
- Pedersen, N.R., Wimmer, R., Matthiesen, R., Pedersen, L.H., Gessesse, A. (2003). Synthesis of sucrose laurate using a new alkaline protease. *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**: 667-673
- Perkins, D.N.; Pappin, D.J.C.; Creasy, D.M.; Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**: 3551-3567.
- Philips, F.; Gilman, A.; Koelle, E.S.; Allen, R.P. (1947). The Effect of Tetrathionate *in vivo* and *in vitro* on the Activity on Succinoxidase. *J. Biol. Chem.*, **167**: 209-217.
- Priolo, N.; López, L.M.I.; Arribére, M.C.; Natalucci, C.L.; Caffini, N.O. (1991). New Purified Plant Proteinases for the Food Industry. *Acta Aliment.*, **20**: 189-196.
- Quiroga, E., Camí, G., Marchese, J., Barberis, S. (2007). Organic solvents effect on the secondary structure of araujiain hI, in different media. *Biochem. Eng. J.* **35**: 198-202.
- Sathish, H.A., Kumar, P.R., Prakash, V. (2007). Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain. *Int J Biol Macromol*; **41**: 383-390.
- Schägger, H.; von Jagow, G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**: 368-379.
- Scion Image (<http://www.scionimage.com/> Accessed on line 10/08/2008).
- Sluyterman, L., DeGraaf, M. (1972). The effect of salts upon the pH dependence of the activity of papain and succinyl-papain. *Biochim Biophys Acta* **258**: 554-561
- Stryer, L. (1965). The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: A fluorescent probe of non-polar binding sites. *Journal of Molecular Biology.* **13**: 482-495
- Szabó A, Kotórmán M, Laczkó I, Simon LM. (2006). Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents. *J Mol Catal B: enzymatic*; **41**: 43-48.
- Szabó, A., Kotormán, M., Laczkó, I., Simon, L.M. (2009). Improved stability and catalytic activity of chemically modified papain in aqueous organic solvents. *Process Biochemistry*, **44**: 199-204
- Takahashi, N.; Yasuda, Y.; Kashiko, G.; Tokiko, M.; Murachi, T. (1973). Multiple Molecular Forms of Stem Bromelin. *J. Biochem.*, **74**: 355-357.
- Thomas, M.P.; Verma, C.; Boyd, S.M.; Brocklehurst, K. (1995). The Structural Origins of the Unusual Specificities Observed in the Isolation of Chymopapain M and Actinidin by Covalent Chromatography and the Lack of Inhibition of Chymopapain M by Cystatin. *Biochem. J.*, **306**: 39-46.

- Vos, R., Engelborghs, Y. (1994). A fluorescence study of tryptophan-histidine interactions in the peptide anantin and in solution. *Photochemistry and Photobiology*. **60**: 24 -32
- Westergaar, J.L.; Hackbarth, C.; Treuhaft, M.W.; Roberts, R.C. (1980). Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures. *J. Immunol. Meth.* **34**:167-175.
- Yang, L., Dordick, J.S., Garde, S. (2004). Hydration of Enzyme in Nonaqueous Media Is Consistent with Solvent Dependence of Its Activity. *Biophys. J.*, **87**: 812-821.

Fitoproteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica en medios acuoso-orgánicos

C A P Í T U L O 3



Inmovilización de proteasas y caracterización de biocatalizadores

Este capítulo describe la preparación de biocatalizadores y su caracterización. Para ello se usaron los extractos crudos de las proteasas vistos en el Capítulo 1, papaína y araujaína. Dichos extractos se inmovilizaron mediante adsorción simple sobre dos soportes de bajo costo y gran disponibilidad: TiO_2 y poliamida.

En el primer caso estudiado se emplearon araujaína y TiO_2 (anatasa), un óxido inorgánico presentado como un fino polvo blanco de gran área superficial. Como no existen antecedentes de inmovilización de proteasas sobre este soporte inorgánico, se plantearon una serie de procedimientos de inmovilización cambiando las concentraciones de los extractos y los medios de incubación. A continuación, se desarrolló un minucioso seguimiento de los procesos evaluando la cinética y la selectividad de la adsorción del extracto crudo y de las proteasas sobre el soporte en cada uno de los procedimientos. Posteriormente se estudiaron varias características de los biocatalizadores preparados como la actividad amidásica, la desorción y la reutilización en medios acuosos.

En el segundo caso se prepararon dos biocatalizadores adsorbiendo las proteasas sobre poliamida, un polímero poroso granulado. Después de describir el procedimiento, dados los antecedentes del uso de este soporte con proteasas, se realizó una exhaustiva caracterización para evaluar su actividad esterásica, la desorción y la reutilización en medios acuosos, así como la selectividad ante distintos sustratos sintéticos derivados de aminoácidos.

Índice

3.1. Experimental	148
3.1.1. Inmovilización de araujaína en TiO ₂	148
3.1.1.1. Procedimiento de la inmovilización	148
3.1.1.2. Seguimiento de la inmovilización	148
3.1.1.3. Caracterización del biocatalizador.....	149
3.1.1.3.1. Actividad amidásica	149
3.1.1.3.2. Desorción enzimática del biocatalizador.....	150
3.1.1.3.3. Ensayos de reutilización.....	151
3.1.2. Inmovilización de papaína y araujaína sobre poliamida.....	151
3.1.2.1. Preparación de los biocatalizadores.....	151
3.1.2.2. Caracterización de los biocatalizadores en poliamida.....	152
3.1.2.2.1. Medidas de actividad.....	152
3.1.2.2.2. Ensayos de desorción enzimática	152
3.1.2.2.3. Ensayos de reutilización	153
3.1.2.2.4. Selectividad de los biocatalizadores	153
3.2. Resultados y Discusión.....	154
3.2.1. Inmovilización de araujaína en TiO ₂	154
3.2.1.1. Seguimiento de la inmovilización	155
3.2.1.1.1. Medidas de absorbancia a 280 nm.....	155
3.2.1.1.2. Determinación de proteínas.....	159
3.2.1.1.3. Actividad caseinolítica	162
3.2.1.2. Caracterización de los biocatalizadores.....	163
3.2.1.2.1. Actividad amidásica	163
3.2.1.2.2. Desorción enzimática	164
3.2.1.2.3. Reutilización de los biocatalizadores	167
3.2.2. Inmovilización de papaína y araujaína sobre poliamida.....	168
3.2.2.1. Caracterización de los biocatalizadores.....	168
3.2.2.1.1. Actividad de los biocatalizadores producidos	168
3.2.2.1.2. Ensayos de desorción	169
3.2.2.1.2.1. Blancos de desorción.....	169
3.2.2.1.2.2. Desorción de enzimas.....	171
3.2.2.1.3. Ensayos de reutilización.....	174
3.2.2.1.4. Actividad hidrolítica de los biocatalizadores frente a distintos sustratos sintéticos	177
3.3. Conclusión	179
3.3.1. Inmovilización de araujaína sobre TiO ₂	179
3.3.2. Inmovilización de papaína y araujaína sobre poliamida.....	180
3.4. Bibliografía	180

3.1. Experimental

3.1.1. Inmovilización de araujaína en TiO₂

3.1.1.1. Procedimiento de la inmovilización

El material vegetal usado fue un extracto crudo enzimático liofilizado de *Araujia hortorum* (araujaína) cuya obtención se detalla en la sección 1.1.1.1. del Capítulo 1. Distintas cantidades de ese extracto crudo (ver **Tabla 1**) se disolvieron en 50 ml de agua destilada y se centrifugaron a 9600×g durante 45 min a 4°C para separar componentes insolubles. Como los extractos mostraron tener mayor actividad caseinolítica en rango de pH alcalinos (Priolo y col., 2000) también se disolvió el extracto en buffer bórico borato 0,1 M pH 8,5. Las soluciones resultantes se mezclaron con 1,0 g de TiO₂ y se dejaron incubando durante 24 hs a 4°C, con agitación magnética (350 rpm), de manera de afectar lo menos posible la actividad enzimática (Foresti y Ferreira, 2007). Durante esta incubación se tomaron muestras a distintos tiempos para hacer el seguimiento. Pasadas las 24 hs, las mezclas se centrifugaron a 9600×g durante 3 min a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes, se lavaron los sólidos resultantes con agua destilada y se repitió la centrifugación. Los biocatalizadores producidos se secaron hasta peso constante en estufa a 30°C.

Solución	Masa de extracto crudo (mg)	Solvente	Biocatalizador
a	200	Agua destilada	A
b	400	Agua destilada	B
c	800	Agua destilada	C
a*	200	Buffer pH: 8,5	A*

Tabla 1. Composición de las soluciones de partida para la inmovilización de araujaína en TiO₂

3.1.1.2. Seguimiento de la inmovilización

Se tomaron muestras de 0,5 ml de la solución inicial antes de mezclar con el TiO₂ a 5, 10, 15, 30 y 60 min y a 2, 4, 6 y 24 hs después de comenzada la incubación. Las muestras se filtraron usando filtros de nylon (0,45 μm), para separar el sólido y las soluciones se mantuvieron a -20°C hasta los análisis posteriores.

En primer término, se registraron los espectros UV-V, entre 200 y 700 nm, de la solución b al comienzo y al final de su inmovilización. A partir de la diferencia entre

ambos espectros se calculó el espectro teórico de la fracción de extracto crudo de araujaína adsorbido.

Considerando estos espectros, se midió la absorbancia a 280 nm de las muestras tomadas durante la inmovilización en un espectrofotómetro Agilent 8453E UV-Visible.

Además se determinó el contenido proteico de las mismas usando el método de Bradford (1976) y seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Se midió el contenido proteico de la solución inicial de araujaína y de las muestras tomadas a distintos tiempos.

Por otra parte, se realizó la medida de actividad proteolítica de la araujaína y de las muestras usando caseína como sustrato (Arribére y col., 1998). La mezcla de reacción (MR) se preparó agregando a 0,1 ml de muestra 1,1 ml de solución de caseína al 1% en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8,0 con cisteína 5 mM. Se incubó en baño a 37°C y se detuvo a los 10 min por adición de 1,8 ml de TCA (ácido tricloroacético) 5%. Los tubos se dejaron a 4°C durante una hora y se centrifugaron a 3900×g durante 30 min y se midió la absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes. La actividad fue definida como unidades caseinolíticas (Ucas) según fue indicado en el Capítulo 1.

En todos los casos se hicieron diluciones adecuadas para que las mediciones estuvieran comprendidas en el rango de cada método.

3.1.1.3. Caracterización del biocatalizador

3.1.1.3.1. Actividad amidásica

Se usó el sustrato PFLNA (L-piroglutamil-L-fenilalanil-L-leucina *p*-nitroanilida) para determinar la actividad hidrolítica de los biocatalizadores inmovilizados ya que es un sustrato específico para cisteín proteasas (Filippova y col., 1984).

Las muestras empleadas fueron suspensiones de los biocatalizadores (5 mg/ml) en buffer fosfato 0,1 M pH 6,5 con EDTA 0,1mM y DTT 3 mM. El medio de reacción fue el mismo buffer. Se preparó una solución stock de PFLNA 1,5 mM en DMSO (dimetilsulfóxido); dicha solución fue agregada a la mezcla de reacción para llegar a una concentración de 0,15 mM. La incubación de la muestra en ese medio de reacción se hizo en estufa a 37°C y con agitación orbital de 200 rpm durante 10 min. Las reacciones se detuvieron usando ácido acético 30% v/v (**Tabla 2**). Posteriormente, las MR se centrifugaron a 3900×g durante 20 min y se midió la absorbancia de la *p*-nitroanilina liberada a 410 nm del sobrenadante. Mediante una curva de calibración se calcularon las unidades internacionales, es decir, la cantidad de enzima que produce 1 μmol de *p*-

nitroanilina por minuto en las condiciones del ensayo. También se determinó la actividad en el extracto crudo de araujaína de manera de poder calcular el porcentaje de actividad retenido en el biocatalizador.

Componente de la mezcla de reacción	Concentración	Volumen
Suspensión de biocatalizador en buffer.	5 mg/ml	0,4 ml
Buffer fosfato 0,1 M pH 6,5; EDTA 0,1 mM; DTT 3 mM		1,62 ml
PFLNA en DMSO	1,5 mM	0,18 ml
Acido acético	30%	0,5 ml

Tabla 2. Componentes, concentraciones y volúmenes en la mezcla de reacción de actividad amidásica.

3.1.1.3.2. Desorción enzimática del biocatalizador

Se prepararon suspensiones de 5 mg/ml de los distintos biocatalizadores en buffer fosfato 0,1 M pH 6,5 con EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM. A 0,4 ml de estas suspensiones se les agregó 1,62 ml del mismo buffer con distintas concentraciones de KCl. Se dejaron incubando durante distintos tiempos en agitación a 200 rpm en estufa a 37°C (**Tabla 3**). Se centrifugaron las muestras a 4500 rpm, 5 min, 4°C y se separaron los sobrenadantes de los sólidos.

Biocatalizador	Tiempo (min)	Buffer
A	3	con KCl 0,3 M
C	3	con KCl 0,3 M
A	20	con KCl 0,3 M
C	20	con KCl 0,3 M
A	8	sin KCl
B	8	sin KCl
C	8	sin KCl
A	8	con KCl 0,1 M
A	8	con KCl 0,2 M
A	8	con KCl 0,3 M

Tabla 3. Condiciones para el estudio de la desorción enzimática desde el biocatalizador. A, B y C biocatalizadores producidos a partir de las solución a, b y c, respectivamente.

Se midió actividad amidásica en los sobrenadantes y los sólidos de acuerdo con lo detallado en la sección anterior. En el caso de los sobrenadantes, directamente se adicionó el sustrato. Los sólidos, en cambio, se resuspendieron en 1,62 ml de buffer antes del agregado de PFLNA.

Los ensayos permitieron comparar tanto tiempos de incubación, biocatalizadores, como fuerzas iónicas (a partir de las distintas concentraciones de KCl) como se detalla en la **Tabla 3**.

3.1.1.3.3. Ensayos de reutilización

Para estos ensayos se utilizó el biocatalizador preparado a partir de 200 mg de araujaína con 1,0 g de TiO₂ en agua destilada (A). Se realizaron ensayos de hidrólisis con PFLNA como se describe en las secciones anteriores durante 10 min. Para detener la reacción se colocaron los tubos en un baño de hielo, en lugar de agregar ácido acético, que inactivaría permanentemente al biocatalizador. Se centrifugaron inmediatamente y se separaron las fases. A los sobrenadantes se les agregó el ácido acético y se midió la absorbancia a 410 nm. Por otra parte, a los sólidos se los lavó con agua destilada y se los centrifugó nuevamente. Los sólidos lavados fueron resuspendidos en el buffer fosfato previamente mencionado y se repitió el ensayo de actividad amidásica. Este procedimiento se repitió tres veces más. Los resultados se expresaron como porcentajes respecto a la primera medida de actividad.

3.1.2. Inmovilización de papaína y araujaína sobre poliamida

3.1.2.1. Preparación de los biocatalizadores

Se prepararon suspensiones enzimáticas a partir del extracto enzimático crudo liofilizado de látex de *Araujia hortorum* (ver Capítulo 1) y de papaína comercial Fluka en buffer bórico borato 0,1 M pH 8,5 con DTT 50 mg/ml. Para ello, se pesaron 300 mg de araujaína y se suspendieron en 3 ml del buffer. Esta suspensión se mezcló con 3,0 gramos de poliamida y se agitó enérgicamente durante 10 minutos para asegurar una distribución homogénea (Clapés y col., 1999). El producto fue liofilizado durante 30 horas. Los biocatalizadores producidos se nombraron como Ara/pol y Pap/pol. Además se preparó una mezcla entre 1 ml del buffer mencionado con 1,0 g de soporte, se agitó y liofilizó de igual manera que la muestra. Estas últimas preparaciones (Bco/pol) se usaron como blancos en algunos de los ensayos.

3.1.2.2. Caracterización de los biocatalizadores en poliamida

3.1.2.2.1. Medidas de actividad

Se midió concentración de proteínas por el método de Bradford y actividad caseinolítica en las soluciones de araujiána siguiendo el protocolo descrito en 3.1.1.2.

La actividad de los biocatalizadores (Ara/pol y Pap/pol) se determinó mediante medidas de actividad esterásica usando Z-Ala *p*-nitrofenil éster como sustrato. El mismo fue disuelto en acetonitrilo para obtener una solución stock 1 mM, en tanto que la concentración final en la mezcla de reacción fue de 0,04 mM. El ensayo se realizó en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Se midió espectrofotométricamente la absorbancia del *p*-nitrofenol liberado a $\lambda=405$ nm en forma continua con el tiempo, en celda termostatzada a 37°C con agitación constante. Simultáneamente se realizaron blancos usando Bco/pol para descontar el *p*-nitrofenol liberado por hidrólisis espontánea en iguales condiciones (Ascenzi y col., 1983). Cada muestra se hizo por triplicado. Como medida de la actividad en cada caso se calculó la pendiente de la curva de cinética en la zona de incremento lineal de la absorbancia en función del tiempo. Posteriormente se normalizaron los valores de pendientes a una masa fija de los biocatalizadores (5 mg). Se realizó una curva estándar de *p*-nitrofenol para calcular las unidades enzimáticas internacionales (UI, definidas como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo).

3.1.2.2.2. Ensayos de desorción enzimática

Se pesaron entre 5 y 6 mg de los Ara/pol, Pap/pol y Bco/pol y se colocaron en tubos con tapa. Se incubaron durante 0, 1, 2, 5, 10 y 30 min, en 2,4 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 con EDTA 2 mM. Posteriormente se separaron los sobrenadantes mediante pipetas Pasteur y se midió actividad enzimática tanto en los sobrenadantes como en los sólidos remanentes.

Estas medidas se desarrollaron por el método cinético y se usó el sustrato sintético Z-Gly *p*-nitrofenol 1,0 mM en ACN. En el caso de sólidos, se agregó sobre los mismos 2,4 ml del mismo buffer y 100 μ l del sustrato (0,04 mM en la mezcla de reacción) e inmediatamente se comenzó la lectura cinética a 405 nm, registrando la absorbancia cada 3 seg. A los sobrenadantes se les agregó 100 μ l del sustrato y se realizaron las mismas lecturas.

Todas las medidas fueron realizadas a 37°C durante 90 seg. Cada muestra se hizo por triplicado. Como medida de la actividad en cada caso se calculó la pendiente de la curva en la zona de incremento lineal de la absorbancia en función del tiempo. Posteriormente se normalizó estos valores de pendientes a un valor fijo de los biocatalizadores y los sólidos (5 mg). Para obtener la medida de actividad de las enzimas a las medidas (Δ UAs/seg) de las muestras se les restó las medidas de los blancos respectivos.

3.1.2.2.3. Ensayos de reutilización

Se midió actividad esterásica con Z-Gly-*p*-nitrofenil éster como se describió anteriormente sobre muestras de 5 mg de los biocatalizadores, registrando la cinética de liberación de *p*-nitrofenol durante 2 min. Se separaron las fases usando pipetas Pasteur y se descartaron los sobrenadantes. Los sólidos remanentes se lavaron con un pequeño volumen de agua destilada para retirar el sustrato y/o producto remanente. Una vez retirada el agua de lavado se procedió a medir nuevamente la actividad esterásica. Este procedimiento se repitió cinco veces. Lo mismo se realizó con Bco/pol como ensayo blanco.

3.1.2.2.4. Selectividad de los biocatalizadores

Siguiendo el mismo procedimiento de medida de actividad por cinética descrito en 3.1.2.2.1. se evaluó la actividad de ambos biocatalizadores usando distintos sustratos sintéticos. Los sustratos *p*-nitrofenilados usados fueron: Z-Ala-*p*-nitrofenil éster, Z-Gly-*p*-nitrofenil éster y Z-Leu-*p*-nitrofenil éster. Se realizaron blancos usando soluciones del buffer con DTT 0,1 mg/ml. Además de los sustratos *p*-nitrofenilados se usó Z-Arg-*p*-nitroanilida como sustrato; en ese caso el buffer usado fue fosfatos 0,1 M pH 7,4, EDTA 1 mM y la solución stock del sustrato fue 20 mM en DMF (0,8 mM en la mezcla de reacción). Las medidas se realizaron por cuadruplicado.

3.2. Resultados y Discusión

3.2.1. Inmovilización de araujaína en TiO₂

En la Introducción de esta tesis se revisó en profundidad la importancia de la inmovilización de enzimas, en particular de proteasas, para la producción de biocatalizadores eficientes para ser usados en distintos tipos de síntesis orgánica.

Entre los posibles soportes propuestos figuran los óxidos inorgánicos. La investigación y uso de este tipo de soportes presenta una serie de ventajas: tienen un bajo costo y alta disponibilidad, para la inmovilización de enzimas en estos soportes se usa métodos de inmovilización muy simples, poseen una gran área superficial y una escasa reactividad y, por el momento, su utilización como soportes de enzimas es poco común.

Estos óxidos, en presencia de agua, generan un pH específico en su superficie que se puede medir como pH superficial en el punto de carga cero (pzc) mediante medidas electroforéticas (Deo y col., 1994). Los óxidos que potencialmente pueden usarse como soportes (MgO, γ -Al₂O₃, ZrO₂, TiO₂, Nb₂O₅, SiO₂) en medios acuosos, poseen distintos pzc superficial. El TiO₂, resultaría mejor soporte para enzimas que otros óxidos ya que presenta un pH en pzc de 6,0 a 6,4. Óxidos más ácidos o básicos podrían desactivar a las enzimas.

El TiO₂ (titania) es el principal pigmento blanco en el mundo, se encuentra en pinturas, pigmentos de colores, tinta para impresión, plásticos, esmaltes, fibras artificiales, papel y gomas (Yuan y Luo, 1997). No resulta tóxico para el ambiente y constituye un aditivo alimenticio certificado por los EEUU (U.S. Department of Health & Human Services). Es usado en una gran diversidad de industrias como en la manufactura de chocolate blanco, cosméticos, pasta de dientes, pantallas solares y quesos. Como no posee actividad química en organismos y no es venenoso, la titania, se vuelve interesante no sólo como aditivo alimenticio sino también en la tinción y en el embalado de alimentos, en la cosmética y en la medicina. Por otra parte, tiene buenas propiedades mecánicas, electrónicas y ópticas.

Existen investigaciones acerca del uso de TiO₂ como soporte para la inmovilización de enzimas. La lipasa B de *Candida antarctica* se ha inmovilizado por adsorción en titania (Foresti y col., 2010), una enzima degradadora de pesticidas fue inmovilizada sobre polipropileno cubierto por dióxido de titanio (Zhang y col., 2006), la peroxidasa de rabanito fue adsorbida sobre conjuntos de nanotubos de TiO₂ y sobre films

delgados de titania sol-gel (Liu y Chen, 2005; Yu y Ju, 2002). Sin embargo, no hay reportes sobre inmovilizaciones de proteasas sobre dióxido de titanio.

3.2.1.1. Seguimiento de la inmovilización

Para el seguimiento de la inmovilización se realizaron tres análisis en paralelo que proporcionan información complementaria. Las medidas de absorbancia a 280 nm sirvieron para estimar la cantidad de araujaína adsorbida al soporte y el ensayo de Bradford permitió la cuantificación de las proteínas remanentes en la solución, y por lo tanto saber cuanto se adsorbió. Las medidas de actividad caseinolítica, por su parte, permitieron estimar la retención de proteasas específicamente desde la solución del extracto crudo de araujaína. Las tres medidas dan información de manera indirecta, ya que se estudia lo que no se unió al soporte a distintos tiempos.

3.2.1.1.1. Medidas de absorbancia a 280 nm

Los espectros UV-Vis registrados para las soluciones iniciales y finales del ensayo con la solución b, y la diferencia entre ellos se muestran en la **Figura 1**. Los espectros de las soluciones son muy similares; sin embargo, la ligera diferencia en la forma e intensidad de los mismos permitió obtener el tercer espectro. Este último, presenta un pico levemente corrido hacia el rojo con un máximo en, aproximadamente, 280 nm y se puede interpretar como el espectro de la fracción adsorbida sobre el TiO₂. La longitud de onda coincide con el máximo de absorbancia que presentan los residuos aromáticos de las proteínas (Dumm, 1989).

En base a estos datos, se midió absorbancia a 280 nm de las muestras tomadas a distintos tiempos en los procesos de inmovilización. Se graficaron isothermas de adsorción calculando en cada tiempo el porcentaje adsorbido usando la siguiente ecuación:

$$\% EC_{Ads} = \frac{A_{280}SO - A_{280}t}{A_{280}SO} \times 100 \quad \mathbf{A}$$

Donde %EC_{Ads} es el porcentaje de extracto crudo adsorbido sobre el soporte, A₂₈₀SO es la absorbancia a 280 nm de la solución de araujaína antes de mezclarla con el TiO₂ y A₂₈₀t es la absorbancia a 280 nm de las muestras tomadas a los tiempos t.

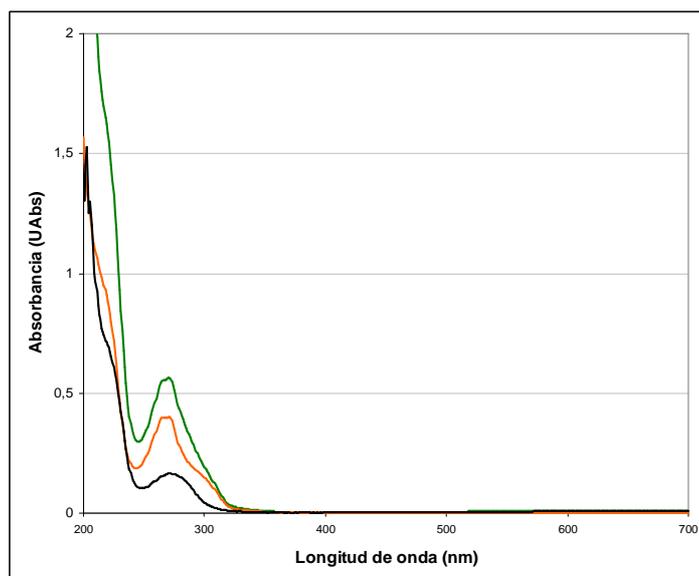


Figura 1. Espectros UV-Vis de la solución b antes (—) y después (—) de la inmovilización sobre TiO₂ y espectro de la fracción de extracto crudo adsorbido (—), calculado como diferencia entre los dos anteriores.

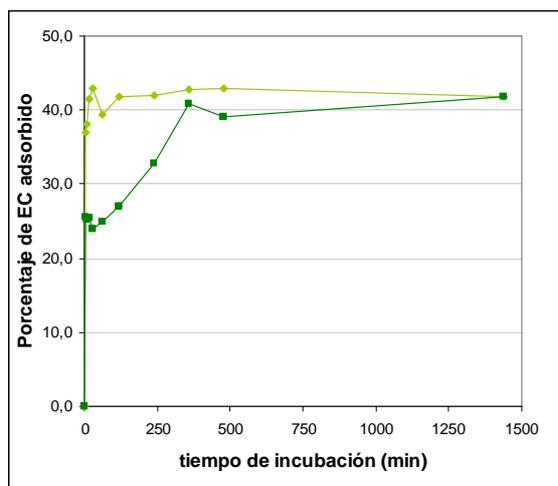


Figura 2. Isothermas de adsorción de las soluciones a (—) y a* (—) sobre 1,0 g de TiO₂. Se grafica el porcentaje de extracto crudo adsorbido (según la ecuación A) en función del tiempo de incubación de la mezcla.

La **Figura 2** muestra la isoterma de adsorción de los ensayos donde se mezclaron 200 mg de extracto crudo de araujaína con 1,0 g de soporte tanto en agua destilada como en buffer. En ambos casos la adsorción llega a un máximo entre el 41% y 43% con respecto a los valores iniciales de absorbancia. En buffer la inmovilización es más rápida que en agua destilada. El máximo de adsorción se alcanzó entre los 5 y los 10 min en el buffer bórico-borato, mientras que en agua se logró luego de 6 hs de incubación.

En la **Figura 3** se observan las isotermas correspondientes a los ensayos con distintas cantidades de araujiaina y agua destilada como medio de inmovilización. Se ve que las isotermas correspondientes a 200 y 400 mg de extracto crudo de araujiaina muestran un rendimiento de inmovilización similar, de alrededor de un 40%. Por lo que, la cantidad total adsorbida desde 400 mg de extracto crudo duplica la adsorbida desde 200 mg del mismo. En cambio, al observar la isoterma correspondiente a 800 mg de extracto crudo sólo un 18% es adsorbido por el soporte.

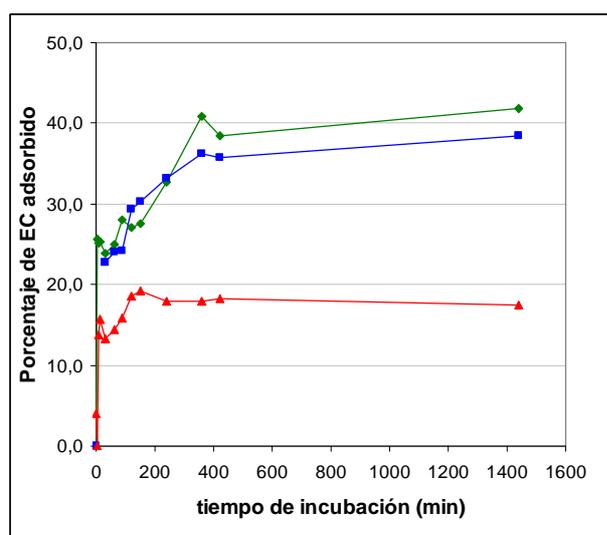


Figura 3. Isotermas de adsorción de las soluciones a (—), b (—) y c (—) sobre 1,0 g de TiO_2 . Los parámetros graficados son los mismos de la Figura 2.

La diferencia en la velocidad de adsorción entre las soluciones a y a* (en agua y buffer, respectivamente) se puede explicar considerando que al pH del buffer (8,5) existirían en el soporte y las proteasas cargas opuestas por lo que las interacciones electrostáticas entre ellos se reforzarían. El sólido a ese pH se carga negativamente, principalmente gracias a la especie Ti_2O^- (Oliva y col., 2003). Las endopeptidasas presentes en el látex, en cambio, a ese pH poseen carga neta positiva ya que sus pI son más alcalinos (*araujiaina h I* y *araujiaina h III* tienen un pI mayor que 9,3 mientras que el de *araujiaina h II* es 8,9) (Priolo y col., 2000; Obregón y col., 2001). Aunque a pH 8,5 las proteasas están sólo débilmente cargadas por la cercanía de este pH a sus pI, las cargas generadas sobre la superficie del TiO_2 parecen suficientes para provocar una intensa y rápida interacción. A pH menores (el pH del agua destilada debido a la carbonatación producida por el aire disuelto, es menor a 7) los grupos predominantes en la superficie del sólido son Ti_2OH por lo que las interacciones serían menores y la adsorción más lenta. En

varios casos se menciona a las interacciones electrostáticas como las responsables de la adsorción de distintas proteasas sobre adsorbentes sintéticos (Arai y Norde, 1990; Lui y Wang, Y.C. Yang, 1995; Yang y col., 2002; Zhang y col., 2006; Zoungrana y col., 1997). Se ha descrito la adsorción de distintos aminoácidos o proteínas sobre la superficie del TiO_2 en función de interacciones electrostáticas entre la superficie cargada negativamente del sólido y los grupos cargados positivamente (p.e. NH_3^+). También se han propuesto interacciones a través de puentes de Ca^{+2} de zonas negativas de los aminoácidos o proteínas con el soporte e interacciones generadas por el reemplazo de grupos hidróxido por los grupos $-\text{COO}^-$ de la proteína en su unión con los Ti (Rezwan y col., 2005).

Que el valor máximo de adsorción sea el 40% del extracto crudo sugiere la presencia de un componente o de un grupo de componentes en el extracto crudo de araujaína que son adsorbidos selectivamente sobre el TiO_2 . Cuando se duplicó la cantidad de extracto en contacto con titanía (hasta 400 mg) también se obtuvo un rendimiento constante de aproximadamente el 40%. Es decir también se duplicó la adsorción del extracto crudo la titanía, lo que indicaría que el área disponible en 1,0 g de TiO_2 no es limitante para la adsorción del crudo en estos ensayos (con soluciones a y b). La hipótesis de que sólo un tipo de componente (en un 40% de proporción) es adsorbido en el TiO_2 se ve reforzada con estos resultados. En la solución quedarían numerosos compuestos que presentan absorbancia a 280 nm, entre ellos péptidos y compuestos con anillos purínicos o pirimidínicos, como ácidos nucleicos y nucleótidos (Dumm, 1989).

Los resultados con la solución c, en cambio, indican un menor porcentaje de inmovilización (18%). Este descenso en la eficiencia se puede explicar de dos maneras: a) presencia de aglomeración en la solución de araujaína y/o b) saturación del soporte. Se sabe que en el látex hay presencia de otros componentes como gomas, péptidos y ácidos nucleicos. Dichos componentes, especialmente las gomas, podrían promover la agregación de todos los componentes del extracto crudo de araujaína, limitando su adsorción sobre el soporte. Sin embargo, las gomas y otros compuestos insolubles están en menores concentraciones en el extracto crudo que en el látex, ya que la mayoría se eliminan en el paso de centrifugación.

Por otra parte, es posible que exista una saturación del soporte al usar cantidades de extracto crudo mayores a 400 mg. El rendimiento obtenido usando 800 mg del mismo es aproximadamente la mitad del obtenido con 400 mg, es decir, las cantidades adsorbidas de extracto crudo en ambos casos son similares (**Tabla 4**); en cambio las cantidades remanentes en la solución son mucho mayores en el ensayo c. Sin embargo no

se puede determinar si existe formación de monocapas o multicapas ya que la preparación enzimática tiene una composición muy compleja. Si se usara una preparación enzimática pura que contiene una sola proteasa de dimensiones conocidas, como es el caso de papaína o de varias lipasas como la CALB (Drenth y col., 1968; Uppenberg y col., 1994), un cálculo simple considerando el área BET del TiO₂ daría la cantidad de enzima teórica que se necesita para formar una monocapa en la adsorción.

Biocatalizador	Masa de extracto crudo contactada con TiO ₂ (mg)	Contenido de proteínas del extracto crudo (mg)	Cantidades adsorbidas en 5 min (mg)		Cantidades máximas adsorbidas (mg)	
			Extracto crudo	Proteínas	Extracto crudo	Proteínas
A	200	50	50	50	84	50
B	400	100	96	100	156	100
C	800	200	112	116	144	140
A*	200	50	76	50	84	50

Tabla 4. Masa de extracto crudo y proteínas adsorbidas en los primeros 5 minutos de contacto y al final del proceso por todos los biocatalizadores sintetizados.

3.2.1.1.2. Determinación de proteínas

En primer término se determinó la concentración de proteínas a tiempo 0, es decir sobre las soluciones iniciales (**Tabla 4**). En todos los casos se obtuvieron valores cercanos al 25% de contenido proteico sobre la masa total de extracto crudo de araujaína usado.

En base a los resultados de concentración de proteínas en el sobrenadante se construyeron isotermas de adsorción graficando porcentaje de proteínas adsorbidas en función del tiempo de incubación. En la **Figura 4** se muestran las isotermas correspondientes a la mezcla de 200 mg de extracto crudo de araujaína en agua destilada y en buffer. Las isotermas muestran que independientemente del medio existe una rápida adsorción de proteínas sobre el soporte. Cinco minutos de contacto fueron suficientes para retirar del medio entre el 97 y 98% del contenido total de proteínas, sugiriendo una fuerte atracción entre ellas y la superficie de la titania.

Al usar 400 mg de extracto crudo de araujaína se observa un perfil semejante (**Figura 5**). Sin embargo al mezclar 800 mg del mismo con TiO₂ la adsorción no fue completa, lográndose una adsorción máxima de 69%.

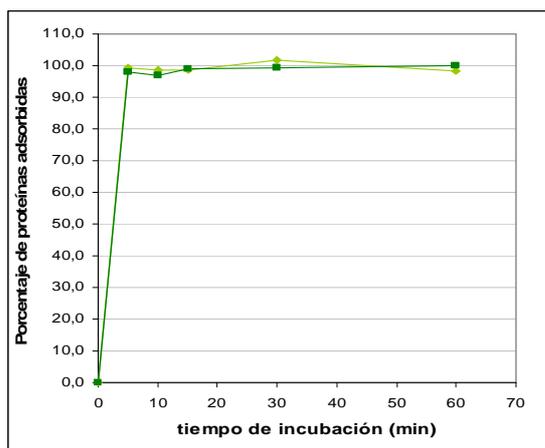


Figura 4. Isotermas de adsorción de proteínas sobre TiO_2 de las soluciones a (—) y a* (—) graficadas como porcentaje de proteínas adsorbidas en función del tiempo

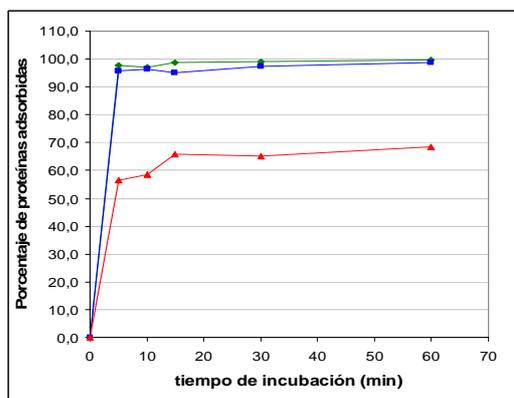


Figura 5. Isotermas de adsorción de proteínas sobre TiO_2 de las soluciones a (—), b (—) y c (—) graficadas como porcentaje de proteínas adsorbidas en función del tiempo

Resulta notorio que cuando sólo un 40% del extracto crudo es adsorbido (en las soluciones a, a* y b), la totalidad de las proteínas presentes en el crudo sean rápida y selectivamente adsorbidas sobre el TiO_2 . Esta idea se refuerza por el cambio hacia una λ de 280 nm en el máximo de absorbancia del espectro calculado con respecto al de la solución b original que se ve en la **Figura 1**.

Por otro lado, comparando las isotermas de adsorción obtenidas por medida de absorbancia a 280 nm y por cuantificación de proteínas de las soluciones a y b, se vio que, mientras la isoterma de proteínas alcanza una meseta a los 5 min de inmovilización, la adsorción del extracto crudo muestra un incremento en 2 pasos. Las isotermas de extracto crudo alcanzan un valor entre 24 y 25% a los 5 min de contacto y luego de lo

cual presentan un incremento menos pronunciado que llega finalmente a un máximo del 40% (**Figura 3**). Si se considera que la cantidad total de proteínas en el extracto crudo de araujaína es de aproximadamente un 25% y que éstas son adsorbidas totalmente en los primeros 5 minutos de la inmovilización (**Tabla 4**, columnas 4 y 5), se puede suponer que el primer componente en adsorberse son las proteínas. El resto de las sustancias adsorbidas (un 15% del extracto crudo), se adsorberían en segundo término al soporte y con velocidades de adsorción menores. Por lo cual se puede considerar que tienen menor atracción por el soporte inorgánico.

En el ensayo realizado con 800 mg de extracto crudo de araujaína, la determinación de proteínas mostró dos pasos de adsorción proteica, a los 5 minutos un 58% de las mismas fue retirado desde la solución mientras que se alcanza un valor final de adsorción de un 70% después de los 20 min (ver **Figura 5**). Por otra parte se observa, en la isoterma de adsorción (**Figura 3**), que a los 5 min de contacto con el TiO₂ se retira del medio entre un 14 y un 15% del extracto crudo. Posteriormente con una baja velocidad de adsorción se llega al 18%. Considerando nuevamente que aproximadamente un 25% del extracto crudo son proteínas los resultados demuestran que en los primeros 5 minutos hay una adsorción selectiva de proteínas. En este catalizador la adsorción sería principalmente de proteínas (**Tabla 4** línea 3). Esto se ratifica porque el 18% de extracto crudo adsorbido en TiO₂ en este caso es exactamente el 25% del porcentaje total de proteínas adsorbidas. Observando la **Tabla 5** se evidenció la alta concentración de proteínas en este biocatalizador ya que en ella se muestran los datos en términos de masa total de extracto crudo /masa total de biocatalizador y también en términos de masa de proteínas /masa total de biocatalizador.

Biocatalizador	Extracto crudo inicial (mg)	Extracto crudo adsorbido (mg)	Proteínas adsorbidas (mg)	Masa de extracto crudo / masa de catalizador (%)	Masa de proteínas / masa de catalizador (%)
A	200	84	50	7,7	4,6
B	400	156	100	13,5	8,7
C	800	144	140	12,6	12,2
A*	200	84	50	7,7	4,6

Tabla 5. Porcentaje de extracto crudo de araujaína y proteínas en los biocatalizadores.

Por otra parte, el ensayo realizado en buffer (última fila de la **Tabla 4**) pone en evidencia un comportamiento distinto en el cual hay un único paso de adsorción visto en las medidas de absorbancia a 280 nm (**Figura 2**). Como ya se mencionó en la sección

anterior, la diferencia de carga entre la superficie negativa de la titania y las proteínas ligeramente positivas puede ser el motivo de las altas velocidades de adsorción. En ese caso las fuerzas iónicas determinan la existencia de un sólo paso de adsorción total con un rendimiento final entre 39 a 42%.

3.2.1.1.3. Actividad caseinolítica

Se midió la actividad proteolítica de las muestras usando caseína como sustrato de acuerdo al método descrito por Arribére y col. (1998). En la **Figura 6** se muestra la disminución de la actividad proteolítica en el sobrenadante de las muestras obtenidos a distintos tiempos.

En la misma se ve la disminución de la actividad caseinolítica durante el proceso de inmovilización. Mientras en los ensayos con 200 y 400 mg se ve una rápida y prácticamente completa caída de la actividad en sólo 5 minutos, en el ensayo con 800 mg se llega a una meseta de alrededor del 64% de disminución de actividad que se mantiene hasta el final del procedimiento.

Es probable que las enzimas extraídas del sobrenadante no conserven su actividad en los mismos valores cuando estén adsorbidas sobre el soporte. Para probar esta hipótesis serían necesarios otros ensayos.

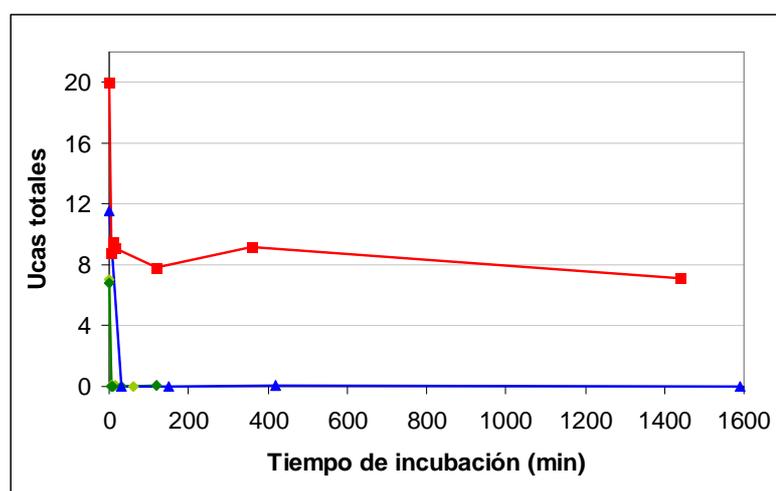


Figura 6. Actividad caseinolítica a distintos tiempos en el sobrenadante durante la incubación de las soluciones a* (—), a (—), b (—) y c (—) con 1,0 g de TiO₂

Los resultados de actividad caseinolítica ratifican lo discutido en la sección anterior. Las proteasas, al ser una fracción importante de las proteínas totales del extracto crudo, se adsorben rápida y completamente en los casos de las soluciones menos

concentradas. Mientras que en la solución c la adsorción llega a un 64%, valor muy cercano al encontrado para la adsorción de proteínas.

3.2.1.2. Caracterización de los biocatalizadores

3.2.1.2.1. Actividad amidásica

Para determinar la actividad enzimática retenida sobre el TiO_2 se usó la hidrólisis del sustrato PFLNA. El método original (Filippova y col., 1984) incluye KCl 0,3 M en el medio de reacción. Dicho componente incrementa sensiblemente la fuerza iónica del medio: esto podría ocasionar desorción en los biocatalizadores producidos en los cuales las fuerzas de unión entre enzima y soporte son esencialmente iónicas. Dicha desorción se analiza detalladamente en la sección 3.2.1.2.2. Por esta razón se evaluó la posibilidad de retirar del medio de reacción la sal KCl. Para ello se determinó actividad enzimática sobre una solución de araujaína libre en medios con y sin KCl. Los resultados de actividad específica fueron: 2,3 UI/mg en ausencia de KCl y de 2,6 UI/mg en presencia de KCl 0,3 M. Dada la pequeña diferencia entre ambos ensayos se excluyó este componente de los medios de reacción usados para las medidas de actividad amidásica.

En esas condiciones, la actividad de los biocatalizadores fue de 0,19 UI/mg de proteína. Este resultado de actividad fue similar en todos los biocatalizadores obtenidos excepto en el que se preparó en buffer (A*). En ese caso la actividad amidásica fue un 50% menor que la obtenida con el biocatalizador preparado en agua destilada (A).

Considerando la actividad específica de la araujaína libre (2,3 UI/mg) y del biocatalizador (0,19 UI/mg), las proteasas inmovilizadas mostraron un porcentaje de recuperación de actividad de alrededor del 8%. Se advierte que existe un notorio descenso de la actividad del biocatalizador con respecto a la araujaína libre, probablemente por inactivación de las proteasas. La reducción de la actividad puede relacionarse con cambios conformacionales en la enzima cuando entra en contacto con la superficie del TiO_2 . De hecho se cree que el cambio conformacional en las proteínas, debido al aumento en la entropía, podría ser una importante fuerza impulsora de la adsorción (Zoungrana y col., 1997). El reordenamiento estructural produce usualmente estados más desordenados, y el correspondiente aumento de la entropía provee una fuerza extra para la adsorción. Se ha reportado que esta fuerza extra puede provocar adsorción, aún en situaciones desfavorables de interacción electrostáticas entre proteínas y superficies (Ball y Jones, 1996). En el caso de la inmovilización realizada en buffer de pH 8,5 pareciera que la

distorsión estructural es mayor, ya que la caída de actividad también lo es. La causa de este fenómeno podrían ser las fuertes interacciones electrostáticas generadas en este medio, ya que se sabe que mayores interacciones proteína-superficie ocasionan mayores cambios conformacionales (Kondo y Mihara, 1996).

Otra razón para explicar la pérdida de actividad de los catalizadores podrían ser efectos de desnaturalización durante el secado al final del proceso. En particular, el tiempo empleado en ese paso es un factor importante ya que se comprobó que una disminución en el tiempo de secado de 48 a 24 horas produjo un aumento al triple de la actividad final del biocatalizador.

A pesar de este bajo porcentaje de recuperación, la actividad encontrada en el biocatalizador aún resulta interesante, no sólo en términos absolutos, sino también tomada como porcentaje con respecto a la enzima nativa. Los valores de actividad retenida, usando PFLNA, en biocatalizadores preparados con papaína y funastraína adsorbidos sobre poliamida dieron valores de 25 y 23% respectivamente (Morcelle y col., 2006). Otros estudios dieron un 16% de actividad retenida para una proteasa de calidad alimentaria inmovilizada sobre agarosa derivatizada (Bakalinsky y Boulton, 1985). Aunque hacen falta más estudios para optimizar la actividad retenida por el biocatalizador, el bajo costo de la fuente enzimática y del propio soporte lo vuelven interesante para potenciales aplicaciones.

3.2.1.2.2. Desorción enzimática

El KCl presente en el medio de reacción incrementa la actividad hidrolítica sobre el PFLNA de los biocatalizadores (Filippova y col., 1984), sin embargo la fuerza iónica que genera en el medio provoca desorción proteica desde el soporte.

Al probar con dos de los biocatalizadores (A y C) a dos tiempos distintos se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Figura 7**. En todos los casos se ve que la actividad registrada en el sobrenadante es mayor que la del sólido remanente. Esta diferencia se incrementa cuando el tiempo de incubación es mayor. En el caso de las medidas de actividad del sobrenadante del biocatalizador C el sustrato se consume totalmente y se llega al máximo de generación de producto, por lo que no se advierte diferencias en el tiempo.

Hay una importante desorción enzimática aún a tiempos cortos (3 min) en ambos biocatalizadores y se observa que al aumentar el tiempo de contacto con el buffer aumenta la cantidad de enzima liberada.

En los ensayos realizados con los biocatalizadores A, B y C a un tiempo de 8 minutos de incubación en el buffer sin KCl se obtuvieron los resultados de la **Figura 8**.

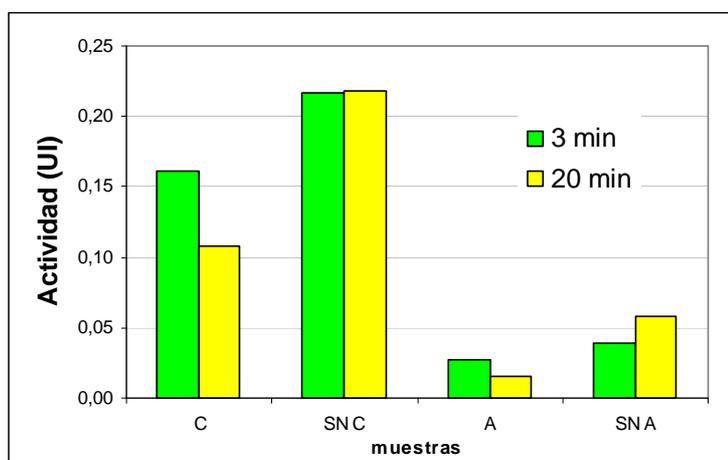


Figura 7. Desorción de araujaína desde los biocatalizadores A y C. Medidas de actividad amidásica en sólidos y sobrenadantes a distintos tiempos. A y C, sólidos remanentes luego de la incubación. SN A y SN C, sobrenadantes de los mismos.

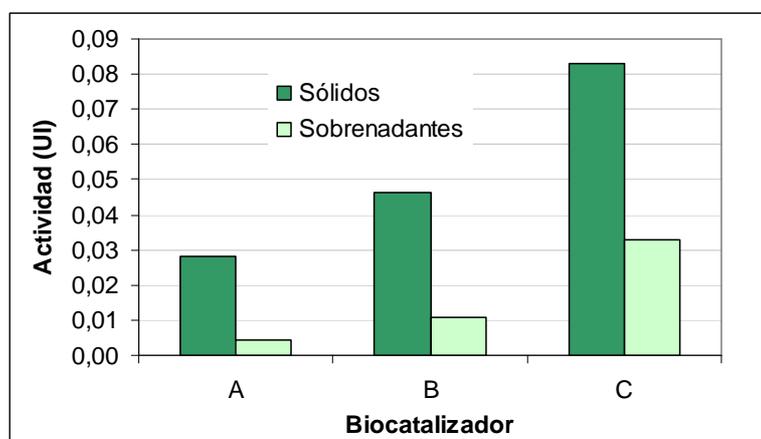


Figura 8. Actividades en sobrenadantes y sólidos en los biocatalizadores A, B y C después de incubarlos 8 minutos en buffer sin KCl.

Se vio que la actividad en los sobrenadantes, aún luego de tiempos de 8 min de incubación, es mucho menor que lo que ocurre cuando el buffer contiene KCl 0,3 M, dejando en claro la importancia de la fuerza iónica para el grado de desorción. Por otra parte, el porcentaje de actividad en los sobrenadantes con respecto al remanente en los sólidos aumentó del biocatalizador A al C (A. 15%, B. 23% y C 40%). Para entender este mayor porcentaje de liberación se debe considerar que al pasar del biocatalizador preparado con 200 mg de extracto crudo al de 800 mg, la cantidad de proteína adsorbida

es mayor y, probablemente, con menos interacciones con el soporte. Estas proteínas en multicapa o más débilmente unidas al TiO_2 se liberarán más fácilmente provocando el aumento en la proporción de enzimas del sobrenadante.

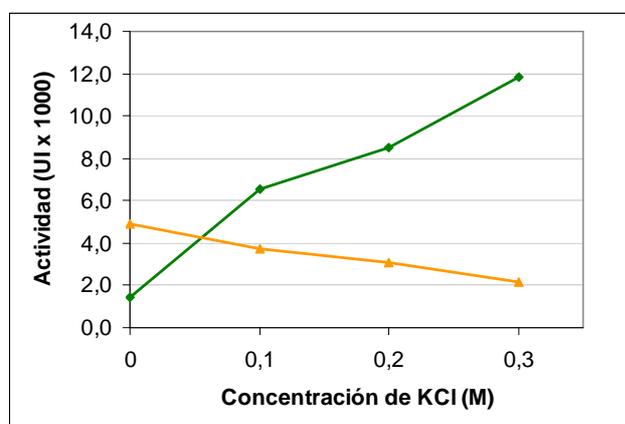


Figura 9. Actividad de sobrenadantes (—) y sólidos (—) del biocatalizador A para distintas concentraciones de KCl.

En la **Figura 9** se muestra la liberación de enzima (expresada en unidades de actividad) desde el biocatalizador A a distintas concentraciones de KCl entre 0 y 0,3 M en el medio de incubación. El aumento de KCl provocó un aumento en la liberación de enzima. En presencia de KCl 0,3 M se encontró en el sobrenadante una actividad de alrededor del 85% de la actividad total, mientras que en ausencia de KCl esta actividad fue sólo de un 23%.

Por otra parte, se notó que el aumento de la actividad en el sobrenadante es muy superior al descenso de la actividad del sólido (**Figura 9**). Se puede concluir que las enzimas liberadas son mucho más activas que las que permanecen unidas al soporte. La inactivación parcial que sufren las proteasas al inmovilizarse se revierte al liberarse del mismo. Sin embargo, dado que la actividad enzimática del sobrenadante al usar KCl 0,3 M como máximo alcanza un 26% de la actividad de la araujaína libre en las mismas condiciones, se debe considerar que existe un grado de inactivación irreversible en las enzimas, producida por interacción con la superficie del dióxido.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia un alto nivel de desorción en presencia de KCl, reforzando así la hipótesis de que el mecanismo de adsorción está basado en interacciones electrostáticas. Por otra parte, se vio que la adsorción de araujaína sobre TiO_2 genera una inactivación parcial que no se recupera aún cuando se desorbe, probablemente producto por un cambio irreversible en la conformación de la

enzima nativa. Un hecho similar se encontró al incubar α -quimotripsina con un soporte de silica: las estructuras helicoidales de la enzima sufrieron una fuerte reducción y no se recuperó la conformación nativa (Zoungrana y col., 1997).

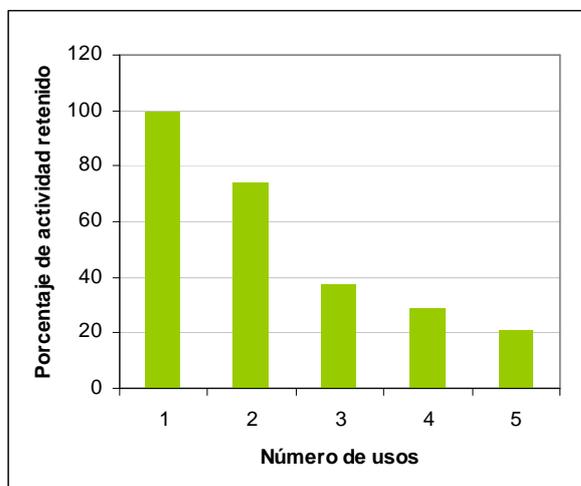


Figura 10. Porcentaje de actividad retenida, con respecto a la inicial, en cinco ciclos de uso del biocatalizador A.

3.2.1.2.3. Reutilización de los biocatalizadores

Se probó la reutilización de los biocatalizadores usando la hidrólisis de PFLNA en ausencia de KCl. En la **Figura 10** se muestran las medidas de actividad amidásica en usos sucesivos del biocatalizador. La actividad enzimática sufrió una reducción gradual en cada paso.

A pesar de no tener KCl, el medio provocó la liberación de enzimas desde el soporte. Además de la pérdida en los lavados intermedios también se debe considerar la posible pérdida de actividad por el esfuerzo mecánico al agitar vigorosamente para resuspender el sólido en el buffer o el agua posteriormente a cada centrifugación. A pesar de estas caídas de actividad aún el quinto ciclo de uso se mantuvo un 20% de la actividad inicial.

Para un estudio más completo de estos biocatalizadores, la actividad, la desorción, la reutilización y la estabilidad de estos biocatalizadores debería ser probada en medios acuoso orgánicos. Resultaría razonable suponer que en este tipo de medios los procesos de desorción mencionados previamente serán menores dada las bajas polaridades de estos medios.

3.2.2. Inmovilización de papaína y araujaína sobre poliamida

Se han realizados varios estudios sobre el uso de este material polimérico poroso como soporte de proteasas para la preparación de biocatalizadores útiles en distintas reacciones de síntesis orgánica. La poliamida puede ser usada en medios con bajas actividades acuosas presentando altas velocidades de reacción y altos rendimientos gracias a su conveniente hidrofiliidad y su gran área superficial (Capellas y col., 1994). En este sentido, la proteasa α -quimotripsina inmovilizada se usó en la formación de enlaces ésteres (Adlercreutz, 1991) y enlaces peptídicos (Capellas y col., 1994) con muy buenos resultados; papaína y otras proteasas vegetales inmovilizadas fueron usadas en síntesis peptídica (Morcelle y col., 2006) y en la síntesis de surfactantes basados en arginina (Clapés y col. 1999; Morcelle. y col., 2009).

Se inmovilizaron las proteasas estudiadas mediante adsorción simple sobre poliamida siguiendo el método propuesto por Clapés y col. (1999). Las suspensiones enzimáticas fueron preparadas usando un buffer de pH óptimo para el uso de ambas proteasas considerando que luego de la liofilización conservarán el estado de ionización adecuado (Klibanov, 2001). Además se agregó DTT en gran cantidad de manera de mantener un ambiente reductor que mantenga funcional la cisteína del sitio activo de estas cisteín proteasas.

La liofilización de la mezcla permite una rápida y eficiente adsorción de proteasas, sales y otros componentes de los extractos sobre la poliamida, aunque podría ocasionar cierto grado de inactivación.

3.2.2.1. Caracterización de los biocatalizadores

3.2.2.1.1. Actividad de los biocatalizadores producidos

Se midió la actividad enzimática y el contenido proteico de los biocatalizadores sintetizados y de las suspensiones de los extractos enzimáticos originales. Los resultados se resumen en la **Tabla 6**.

Aunque la proporción de proteínas en los extractos crudos fue similar se observó que papaína posee una actividad específica entre un 60% a 70% de la que presenta araujaína. Esta diferencia se incrementa cuando se inmoviliza ya que la actividad específica del Pap/pol fue de un 32% de la observada con Ara/pol. El porcentaje de recuperación de actividad enzimática obtenido en Ara/pol fue del 18,5% y para Pap/pol

del 9%, aunque como se describe más adelante este porcentaje puede estar influido por el grado de desorción enzimática.

	Araujiaína	Papaína
Proteínas (mg/mg de extracto crudo) ¹	0,24	0,30
Actividad enzimática (Ucas/mg de extracto crudo) ^{1,2}	1,70	1,30
Actividad específica (Ucas/mg proteínas) ^{1,2}	7,08	4,33
Actividad específica (UI/mg extracto crudo) ³	6,758	4,527
Actividad específica (UI/mg proteínas) ³	28,158	15,09
Actividad específica biocatalizador (UI/mg EI) ³	0,109	0,035
Actividad específica biocatalizador (UI/mg extracto crudo) ³	1,253	0,402
Actividad específica biocatalizador (UI/mg proteínas) ³	5,221	1,34

¹En la solución original. ²Usando como sustrato caseína. ³Usando como sustrato Z-Ala-p-nitrofenil éster. EI: Enzima inmovilizada. extracto crudo:EI = 0,087.

Tabla 6. Medidas de actividad y proteínas en los biocatalizadores de araujiaína y papaína en poliamida y en las soluciones iniciales

3.2.2.1.2. Ensayos de desorción

3.2.2.1.2.1. Blancos de desorción

La composición de los biocatalizadores (extracto crudo de araujiaína, DTT y sales del buffer sobre poliamida) y la naturaleza de las fuerzas involucradas en la inmovilización (iónicas, de Van der Waals, etc.), permiten suponer que, de existir desorción desde el soporte, la misma será tanto de proteínas como de DTT y otras sustancia adsorbidas en el proceso. La hidrólisis del sustrato será promovida por la acción enzimática (tanto adsorbida como libre), pero existe incertidumbre acerca de si el DTT podría provocar cierto grado de hidrólisis *per sé*.

Para discriminar la acción enzimática presente en la fase líquida (la enzima desorbida del soporte) de la acción del DTT también liberado, se diseñaron los ensayos blancos. Para ello se prepararon sólidos donde se adsorbió DTT disuelto en buffer en la poliamida (Bco/pol). Este blanco se llevó a cabo para esclarecer si el DTT hidroliza o no el sustrato y, en caso de hidrolizarlo, la proporción de la misma. En la **Figura 11** se muestran cómo el DTT en el soporte y el material desorbido afecta la hidrólisis del sustrato.

Estos ensayos mostraron que hay una importante desorción del DTT desde la poliamida. En la **Figura 11** se ve que la hidrólisis del sustrato provocada por el DTT se incrementa en el sobrenadante a medida que aumenta el tiempo de incubación. Este incremento fue importante en los primeros dos minutos y más leve durante la primera

media hora. Por otra parte, también se observó que la hidrólisis producida por el sólido remanente disminuye hasta un 25% de lo observado en tiempos cortos y que la caída en la hidrólisis en los dos primeros minutos no fue tan acentuada como el aumento de la misma en el sobrenadante.

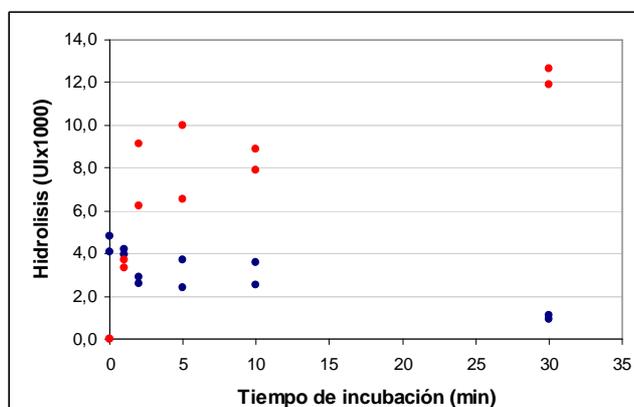


Figura 11. Variación de la hidrólisis del Z-Gly-*p*-nitrofenil éster en función del tiempo de incubación, en fase sólida (●) y en los sobrenadantes (●) respectivos en los ensayos blanco (Bco/pol).

Otros ensayos permitieron comprobar que, en las soluciones de buffer acuoso usadas, el sustrato no sufrió hidrólisis en los tiempos ensayados; sin embargo, al agregar DTT en el buffer espontáneamente (sin acción enzimática) comenzó a hidrolizarse. Medidas con distintas concentraciones de DTT permitieron saber que dicho efecto aumenta a medida que se eleva la concentración de DTT hasta 75 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en valores superiores la hidrólisis no sigue aumentando.

El cambio en el ritmo de desorción del DTT que se ve en la **Figura 11**, puede tener distintas explicaciones: a) agotamiento del DTT en la fase sólida, b) desorción rápida inicial de DTT unido débilmente al soporte y luego desorción más lenta, c) saturación del líquido que inhiba la desorción de más DTT, o d) que el incremento de DTT en el líquido no se acompañe por aumento en la hidrólisis del sustrato porque se llegó a un máximo de esta reacción. Aunque no se sepa con certeza cual es el motivo de este comportamiento se puede suponer que el DTT tendrá un comportamiento similar al analizar la desorción desde los biocatalizadores.

El cambio que se vio en los sólidos remanentes luego de los dos primeros minutos, no acompaña el gran aumento que mostraron los sobrenadantes, es decir, la aparición de DTT en el sobrenadante no produjo un descenso equivalente en el sólido. Aún cuando, evidentemente, hay menos DTT en el sólido, este mantuvo un gran porcentaje de su

efecto sobre la hidrólisis (más del 61% al menos hasta los 10 minutos) y probablemente conserve el mismo efecto protector de la actividad enzimática.

3.2.2.1.2.2. Desorción de enzimas

En las **Figuras 12 y 13** se muestran los valores de actividad específica en sólidos y sobrenadantes de los biocatalizadores Pap/pol y Ara/pol respectivamente, incubados en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 a distintos tiempos.

Los resultados obtenidos para ambos biocatalizadores (Ara/pol y Pap/pol) muestran que las enzimas se desorbieron desde sus soportes. Esta desorción fue mayor a medida que aumentó el tiempo de exposición del biocatalizador al buffer. La actividad específica en el sobrenadante para Ara/pol tiende a 0,122 UI/mg de biocatalizador y para Pap/pol a 0,061 UI/mg de biocatalizador, mientras que ambos sólidos tienden a 0,012 UI/mg de biocatalizador.

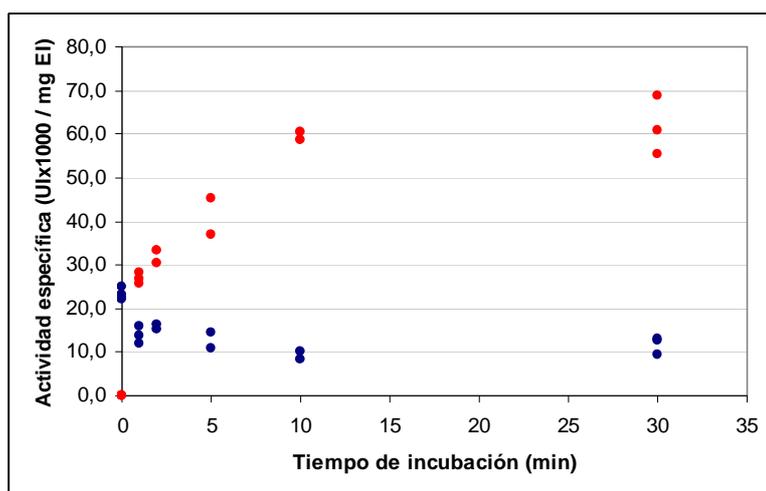


Figura 12. Actividad esterásica, sobre Z-Gly-*p*-nitrofenil éster, en sólidos remanentes (●) y sobrenadantes (●) en función del tiempo de incubación del biocatalizador Pap/pol. EI: Enzima inmovilizada

Se observó una marcada diferencia de actividades iniciales entre ambos catalizadores (0,065 UI para Ara/pol y 0,025 UI para Pap/pol). Aunque en las soluciones de enzimas se comprobó que araujaína tiene más actividad que papaína (**Tabla 6**), la gran diferencia en este caso, evidencia otro tipo de fenómeno, que se revisará más adelante.

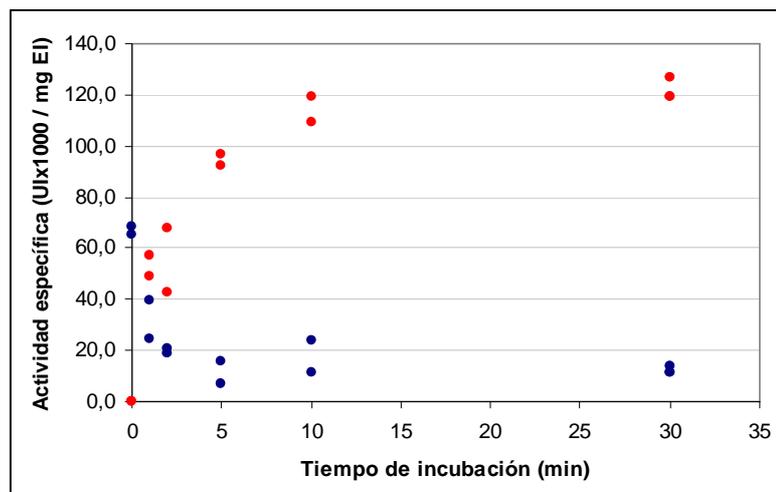


Figura 13. Actividad esterásica, sobre Z-Gly-*p*-nitrofenil éster, en sólidos remanentes (●) y sobrenadantes (●) en función del tiempo de incubación del biocatalizador Ara/pol. EI: Enzima inmovilizada

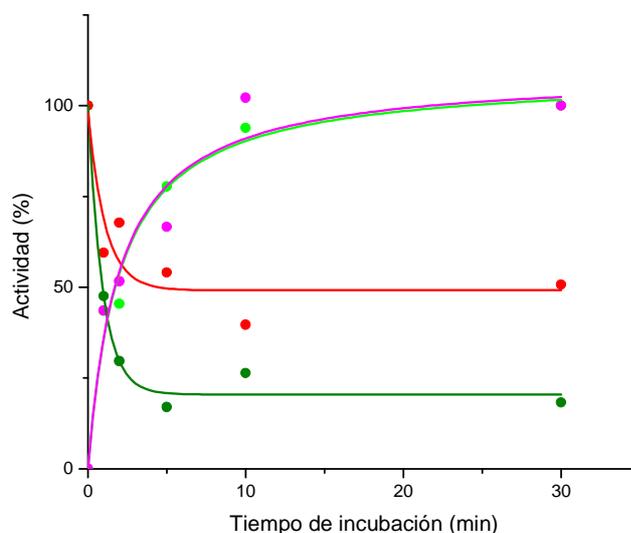


Figura 14. Porcentaje de actividad en función del tiempo de incubación para Ara/pol y Pap/pol en sobrenadantes y sólidos remanentes. El 100% para los sólidos es el valor de actividad sin incubación. El 100% para los sobrenadantes es el valor de actividad obtenido a un tiempo de incubación de 30 minutos. Sólido remanente de Ara/pol (●), sobrenadante de la incubación de Ara/pol (●), sólido remanente de Pap/pol (●), sobrenadante de la incubación de Pap/pol (●).

Se vio que los biocatalizadores perdieron actividad a lo largo de la incubación. Esta pérdida en ambos casos se dio principalmente en los primeros segundos. Después de

los primeros 5 minutos, la actividad permanece aproximadamente constante en el tiempo. Para poder hacer una mejor comparación, en la **Figura 14** se grafican la actividades de ambos biocatalizadores, pero en términos porcentuales, considerando el 100% en el caso de los sólidos a la actividad sin incubación y para los sobrenadantes a la actividad a los 30 minutos de incubación. La actividad del sólido Ara/pol tiende a 20,4% del valor inicial, del sólido de Pap/pol a 49,1%.

A partir de las **Figuras 12 y 13**, donde se advierte que los aumentos de las actividades en los sobrenadantes son mucho mayores a los descensos en los sólidos, se puede concluir que la actividad de las enzimas libres será mayor que las inmovilizadas, posiblemente debido a una inactivación parcial de las enzimas adsorbidas. Este fenómeno fue observado también con los biocatalizadores preparados usando TiO_2 .

En todos los casos los valores de los ensayos blancos fueron mucho menores que los de los biocatalizadores; en la mayoría de los casos resultaron despreciables. Por eso, si bien es útil restar el valor de los blancos al de las muestras (como se planteó en la sección Experimental) para obtener resultados más exactos, el comportamiento observado corresponde principalmente a la actividad enzimática tanto en el sólido como en el sobrenadante. En los dos biocatalizadores se observó una importante desorción de proteínas en los primeros minutos, al igual de lo que se vio en los ensayos con Bco/pol. Sin embargo, para ambos biocatalizadores la desorción a los 2 minutos fue de un 50% de lo que se desorbe a los 30 minutos, mientras que para el Bco/pol este valor fue del 77%. Es decir, la forma en la que las especies se desorben en uno y otro caso son distintas.

Como se vio existe una rápida desorción de una fracción importante de las enzimas cuando se exponen los biocatalizadores al medio acuoso, por lo tanto se debe considerar que esa desorción también ocurre durante el procedimiento de medida de actividad. Considerando este hecho, se puede suponer que la actividad observada en los sólidos se divide en dos: la que tiene la enzima que se libera más la de la enzima inmovilizada remanente en el soporte. La fracción liberada durante el ensayo de actividad, sin embargo, sólo será importante en las medidas a tiempos cortos de incubación, ya que se espera que en tiempos más largos (5, 10, 30 min) la desorción ocurra, en su mayor porcentaje, durante la incubación y no durante medida de actividad. Por esto, se puede considerar que las actividades obtenidas a estos tiempos son propias de la enzima inmovilizada y que la misma estará fuertemente adsorbida sobre la poliamida.

Por otra parte, se ve que la actividad de los sólidos no varía demasiado entre estos tiempos, pero, la actividad de los sobrenadantes sí aumenta. Esto se puede explicar

suponiendo que entre los minutos 5 y 30 se desorben lentamente (por su mayor afinidad por el soporte) algunas moléculas más de enzima al medio. Esta pérdida no afectará significativamente la actividad del biocatalizador remanente dado que se liberarán pocas enzimas y que estas tienen una baja actividad unidas al soporte. Sin embargo, estas pocas enzimas liberadas sí pueden tener un efecto importante en el sobrenadante por la evidente multiplicación de su actividad en ese estado.

Siguiendo estos razonamientos además, se podría afirmar que la gran diferencia de actividades iniciales de los biocatalizadores se explica por la mayor velocidad de desorción de la araujaína y por el incremento de la actividad de las enzimas cuando se liberan.

De todo este análisis se puede concluir que:

- Las enzimas se liberan en los primeros 5 minutos de exposición del biocatalizador al medio acuoso (al igual que el DTT) pero aún a los 30 minutos de exposición se encuentran buenos niveles de actividad en los sólidos.

- A pesar de tener una actividad casi tres veces menor en el biocatalizador con papaína se observa que ambos catalizadores a tiempos largos de incubación tienen actividades semejantes. Por lo que es remarcable la estabilidad mostrada por Pap/pol comparada con Ara/pol.

- La desorción del DTT en el intervalo de 5 a 30 minutos no repercutió en la actividad del biocatalizador por lo que también podemos suponer que el DTT restante es suficiente para favorecer la actividad enzimática.

- Existen dos tipos de uniones generadas en la preparación de los biocatalizadores. Las más débiles provocan una gran pérdida de enzimas y DTT en los primeros minutos de contacto con el solvente acuoso, mientras que por otro lado una fracción de ambos compuestos queda más fuertemente unida a la poliamida.

3.2.2.1.3. Ensayos de reutilización

La **Figura 15** muestra la hidrólisis del sustrato provocado por Bco/pol en función del número de usos. Se vio una caída de un 79% en el nivel de hidrólisis del primero al segundo uso. Los pasos siguientes también exhibieron un descenso pero no tan pronunciado, del segundo al tercero cae un 36% y siguió disminuyendo hasta llegar a un valor aparentemente estable entre un 8 y un 9% del valor original.

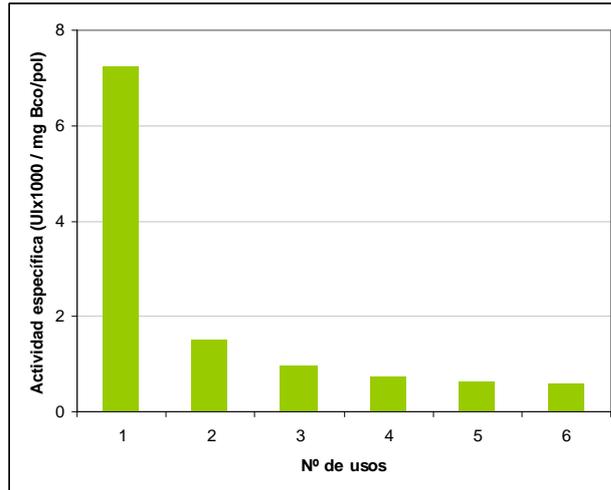


Figura 15. Hidrólisis del sustrato Z-Gly-*p*-nitrofenil éster en función del número de usos del preparado Bco/pol.

En las **Figuras 16 y 17** se muestra la actividad en cada ciclo de uso para los biocatalizadores Pap/pol y Ara/pol respectivamente. En ambos casos se vio una caída muy importante de actividad en el segundo uso con respecto al primero. Para Ara/pol estuvo entre el 93 y 96% mientras que para Pap/pol entre 80 y 90%. Luego de este brusco descenso, la actividad enzimática siguió disminuyendo pero a un ritmo menor. La caída en la actividad parece tender a un valor estable para un número alto de reutilizaciones. En el caso de Ara/pol este valor estuvo entre 0,9 y 1,2% de la actividad original ($1,02 \times 10^{-3}$ - $1,05 \times 10^{-3}$ UI / mg de biocatalizador) y en el caso de Pap/pol entre 4 y 6% ($1,2 \times 10^{-3}$ - $1,5 \times 10^{-3}$ UI / mg de biocatalizador). Dado estos resultados se vio que, aunque la primera medida fue mucho mayor para Ara/pol, la última resultó ser mayor para Pap/pol, este resultado es coherente con lo observado en los ensayos de desorción.

La medida de actividad del primer uso implicó un tiempo de exposición del biocatalizador al buffer acuoso de 2 min (tiempo de medida de la cinética), por lo tanto, la actividad registrada durante el segundo uso podría compararse con la medida de desorción a los 2 min ya que en ambos casos el tiempo de exposición total del biocatalizador al buffer es el mismo. Esta comparación para Ara/pol muestra que en el ensayo de desorción la actividad cayó hasta un 30% mientras que en la reutilización esta misma llega al 4%. Para Pap/pol los porcentajes fueron 60 y 10% respectivamente. La diferencia que se vio entre ambos ensayos puede estar dada por el paso de enjuague del biocatalizador posterior a la medida de actividad. Por lo tanto, se puede suponer que en ese paso, cuando el biocatalizador se contactó con medio fresco, aunque el mismo fuera

sólo agua destilada (de fuerza iónica menor al buffer), se favoreció un grado de liberación enzimática muy superior a la que se vio, aún a tiempos mucho más largos en los ensayos de desorción ya que en estos el medio fue siempre el mismo.

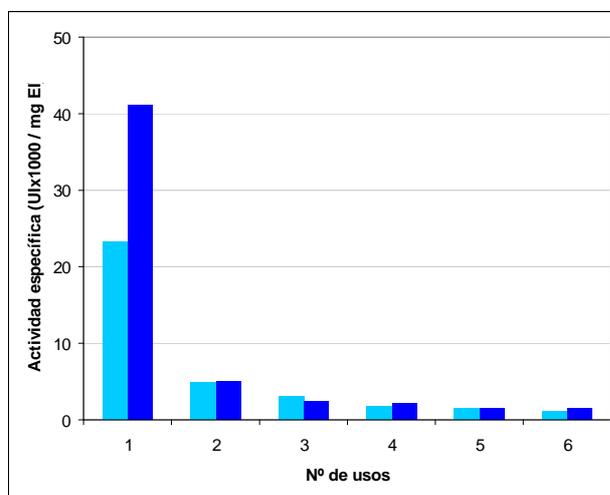


Figura 16. Actividad esterásica de Pap/pol en función del número de usos. EI: Enzima inmovilizada

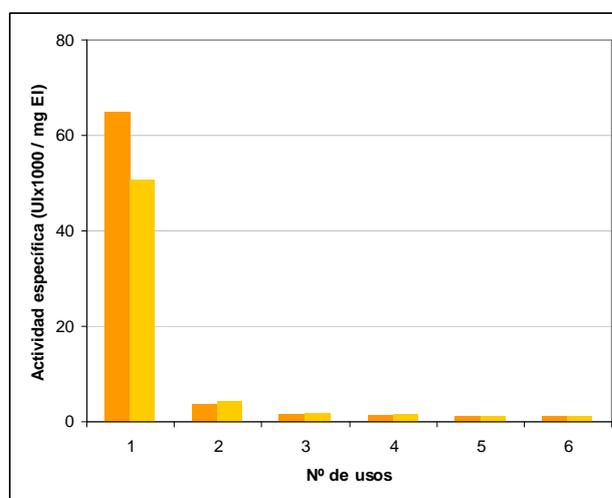


Figura 17. Actividad esterásica de Ara/pol en función del número de usos. EI: Enzima inmovilizada

Los pasos siguientes de reutilización, como se realizaron a partir del biocatalizador remanente del paso previo, no fueron comparables a los ensayos de desorción. Se observó que la caída de actividad continúa cuando se aumenta el número de reutilizaciones. Sin embargo, la actividad enzimática parece converger a valores que, si

bien fueron bajos en comparación a los valores originales, se mantienen en el tiempo. Esto es evidencia de que una fracción, tanto de proteínas como de DTT, permaneció muy firmemente unida a la poliamida, aún luego de la exposición del biocatalizador a medios frescos (buffer y agua alternadamente),

Los bajos resultados obtenidos de actividad debidos a los sucesivos lavados, pusieron en evidencia que existe una gran parte de las proteínas que estaban muy débilmente unidas a la poliamida (descenso observado en los ensayos de desorción y segundo uso). Esta unión podría ser en forma de multicapas. Además se evidenció la existencia de una fracción más firmemente unida que sin embargo no soportó los procesos de enjuague y renovación del medio. Hay que considerar, por otra parte, que estas liberaciones se dan especialmente porque los medios a los que se expusieron los biocatalizadores tienen alta fuerza iónica y alta constante dieléctrica; esto no sucedería en el caso de que el medio contenga proporciones importantes de solventes orgánicos.

3.2.2.1.4. Actividad hidrolítica de los biocatalizadores frente a distintos sustratos sintéticos

En la **Figura 18** se muestran los resultados de las medidas de cinética de ambos biocatalizadores y los ensayos en blanco usando los cuatro sustratos sintéticos elegidos. En la **Tabla 7** se indican los valores de actividad específica obtenidos a partir de la diferencia de las pendientes de las medidas cinéticas de los biocatalizadores con los blancos, considerando, además, la masa de proteínas adsorbida en cada uno.

Los ensayos blanco mostraron que la hidrólisis espontánea, promovida por la presencia de DTT en el medio fue de 0,046; 0,021; 0,013; 0,0004 UI (μ moles de producto generado por minuto) para *Z-Ala-p*-nitrofenil éster, *Z-Gly-p*-nitrofenil éster, *Z-Leu-p*-nitrofenil éster y *Z-Arg-p*-nitroanilida, respectivamente. Cuanto menor es la velocidad de aparición de producto más estable es el sustrato en el medio acuoso reductor.

Los resultados de las cinéticas realizadas mostraron una clara preferencia de ambos biocatalizadores por el sustrato derivado de Ala, a pesar de que la generación de *p*-nitrofenol por hidrólisis inducida por el DTT resulta ser más alta que en el resto de los sustratos. La preferencia Ara/pol por el derivado de Ala fue tan pronunciada que antes de los 5 segundos del ensayo, todo el sustrato se hidrolizó. Por otra parte Ara/pol mostró una preferencia similar por los otros dos sustratos ésteres, mientras que Pap/pol muestra el doble de actividad cuando reacciona con el derivado de Gly.

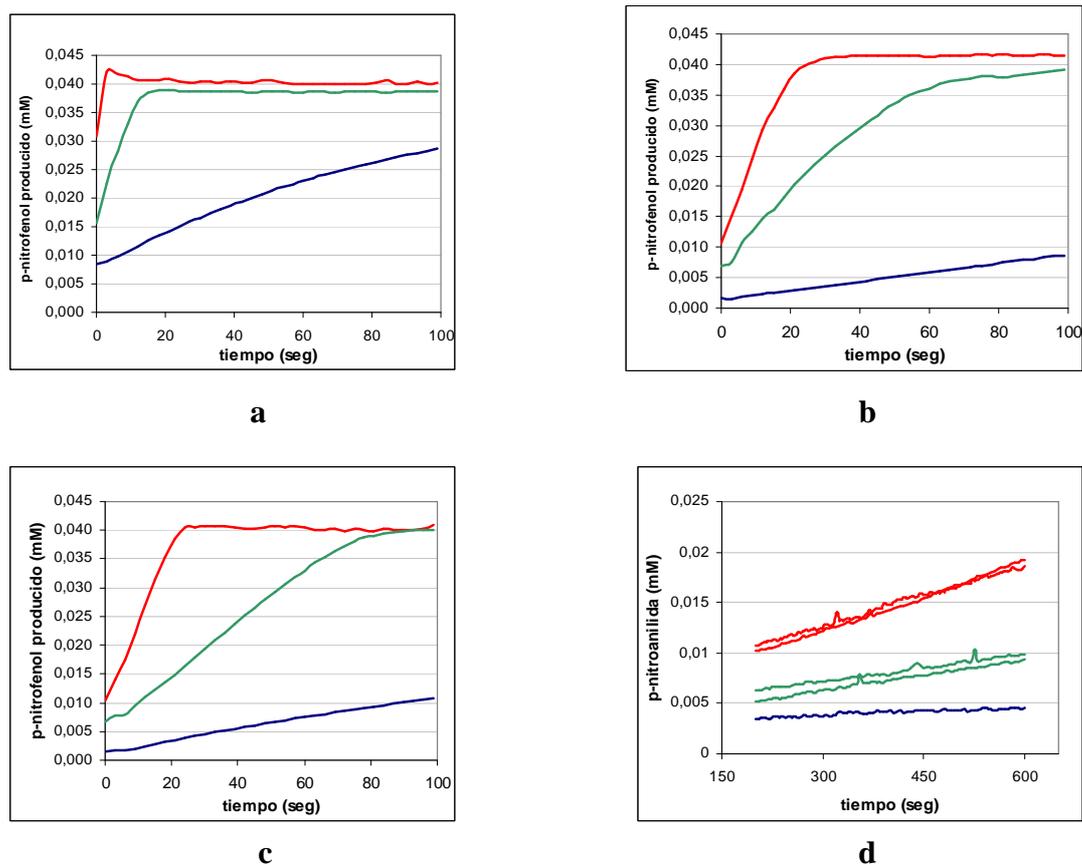


Figura 18. Medidas de cinética de Ara/pol, Pap/pol y blancos con distintos sustratos sintéticos. **a.** Z-Ala-*p*-nitrofenil éster. **b.** Z-Gly-*p*-nitrofenil éster. **c.** Z-Leu-*p*-nitrofenil éster. **d.** Z-Arg-*p*-nitroanilida. Ara/pol (—), Pap/pol (—) y Bco/pol (—).

Biocatalizador	Sustrato	Actividad específica*
Ara/pol	Z-Ala-pNf	0,109
Ara/pol	Z-Leu-pNf	0,037
Ara/pol	Z-Gly-pNf	0,041
Ara/pol	Z-Arg-pNA	0,00048
Pap/pol	Z-Ala-pNf	0,035
Pap/pol	Z-Leu-pNf	0,008
Pap/pol	Z-Gly-pNf	0,016
Pap/pol	Z-Arg-pNA	0,00017

* μ moles de producto en la mezcla de reacción por min. por mg de enzima inmovilizada

Tabla 7. Actividad específica de Ara/pol y Pap/pol con los distintos sustratos sintéticos.

En todos los casos se observó que el biocatalizador conteniendo araujaína resulta mucho más activo que el producido con papaína, aunque en esta observación no consideramos el fenómeno de desorción revisado en secciones anteriores. Pap/pol mostró

una actividad, del 32% usando Z-Ala-pNf, 22% con Z-Leu-pNf, 39% con Z-Gly-pNf y 35% con Z-Arg-pNa respecto de la de Ara/pol.

La actividad observada con estos sustratos permitió apreciar la versatilidad de ambas enzimas para hidrolizar efectivamente enlaces éster además de los amida. También la capacidad de aceptar grupos como nitrofenilo o nitroanilida en la posición S1' y del grupo Z en S2 (ver **Figura 19**). En este trabajo, se estudió la preferencia de los biocatalizadores por sustratos derivados de distintos aminoácidos, no sólo para estudiar el comportamiento en reacciones hidrolíticas sino para prever las afinidades por sustratos en reacciones de síntesis. Con respecto a este tipo de reacciones se espera que sustratos derivados de Ala que se unan por el grupo carboxilo del aminoácido sean eficientemente incorporados por las enzimas, pero también esperamos que sean aceptados los sustratos derivados de Leu y Gly.

3.3. Conclusión

3.3.1. Inmovilización de araujiaina sobre TiO₂

Siguiendo un procedimiento de adsorción simple se logró inmovilizar un extracto crudo rico en proteasas cisteínicas sobre dióxido de titanio. Mediante medidas UV-Vis se observó que la adsorción de proteínas es altamente selectiva; en sólo 5 minutos de contacto con la titania las proteínas fueron prácticamente indetectables en la solución del extracto crudo. Mediante determinaciones de actividad caseinolítica se confirmó que la adsorción de proteasas es rápida y completa. Se determinó también, que usando 800 mg de extracto crudo se logró saturar el soporte a diferencia de la que ocurre con 200 y 400 mg, y que se obtienen mejores resultados al usar agua en lugar de buffer de pH 8,5.

Por otra parte, se comprobó que los fenómenos de desorción enzimática en medios acuosos son un grave problema para el uso de estos biocatalizadores en este tipo de medios y que este fenómeno es más importante a medida que aumenta la fuerza iónica del medio. En este mismo sentido, se observó una importante pérdida de actividad luego de algunos ciclos de reutilización en medios acuosos.

La actividad recuperada en el biocatalizador con respecto a la del extracto crudo es de un 8% al medir actividad amidásica. A pesar de esta pérdida de actividad, el biocatalizador producido es bueno dado los bajos costo del extracto crudo como fuente de proteasas y del soporte y porque se comprobó que la presencia de proteínas activas en el biocatalizador

3.3.2. Inmovilización de papaína y araujaína sobre poliamida

Se profundizó el estudio de estos biocatalizadores usados previamente en reacciones de síntesis. Se observó que la actividad recuperada en ambos biocatalizadores luego de la inmovilización es de un 18,5% para araujaína y del 9% para papaína.

En medios acuosos, como los empleados en las medidas de actividad hidrolítica, se vio que existe un fenómeno de desorción muy importante en ambos biocatalizadores, siendo éste más pronunciado en el caso de Ara/pol, hecho que no la convertiría en una opción adecuada para su uso en estos medios. Los estudios de reutilización ratificaron esta observación. Por último, se vio que tanto Ara/pol, como Pap/pol fueron activos frente a los sustratos sintéticos ensayados, siendo el derivado de Ala el preferido de ambos.

3.4. Bibliografía

- Adlercreutz, P. (1991). On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. *Eur J Biochem* **199**:609–614.
- Arai, T., Norde, W. (1990). The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 2. Sequential and competitive adsorption. *Colloids Surf.*, **51**: 17-28.
- Arribére, M.C., Cortadi, A.A., Gattuso, M.A., Bettiol, M. P., Priolo, N.S., Caffini, N.O. (1998). Comparison of Asclepiadaceae latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. cysteine peptidases. *Phytochem. Anal.* **9**:267-273.
- Ascenzi, P., Sleiter, G., Antonini, E. (1983). Effect of N-substituents on the alkaline hydrolysis of p-nitrophenyl esters of L-alanine, glycine and B-alanine. *Gazzetta Chimica Italiana.* **113**: 859-861.
- Bakalinsky, A.T., Boulton, R. (1985). The Study of an Immobilized Acid Protease for the Treatment of Wine Proteins. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**: 23-29.
- Ball, A., Jones, R.A.L. (1995). Conformational changes in adsorbed proteins. *Langmuir* **11**: 3542-3548.
- 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**: 248-254
- Capellas, M., Benaiges, M.D., Caminal, G., Gonzalez, G., López-Santfín, J., Clapés, P. (1996). Influence of water activity and support material on the enzymatic synthesis of a CCK-8 tripeptide fragment. *Biocatal Biotrans.* **13**:165–178.
- Clapés, P., Morán, C., Infante, M.R. (1999). Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. *Biotechnol. Bioeng.*, **63**: 333-43.
- Deo, G., Wachs, I.E., Haber, J. (1994). Vanadium Oxide Monolayer Catalysts. *Crit. Rev. Surf. Chem.* **4**: 141.
- Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M., Wolthers, B.G. (1968). Structure of papain. *Nature* **218**:929-932.
- Dumm, M.J., in: Harris F.E.L.V., S. Angal (Eds.), Protein purification methods—a practical approach, IRL Press, Oxford, 1989.
- Filippova, I. Yu., Lysogorskaya, E. N., Oksenoit, E. S., Rudenskaya, G. N., Stepanov, V. M. (1984). L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide-A chromogenic substrate for thiol proteinase assay. *Analytical Biochemistry.* **143**: 293-297
- Foresti, M.L., Ferreira, M.L. (2007). Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 769–777.
- Foresti, M.L., Valle, G., Bonetto, R., Ferreira, M.L., Briand, L.E. (2010). FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. *Applied Surface Science*, **256**: 1624-1635
- Gupta, M.N., Roy, I. (2004). Enzymes in organic media: forms, functions and applications, *Eur. J. Biochem.* **271**: 2573-83.

- Guzmán, F., Barberis, S., Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electron. J. Biotechnol.* **10**: 279-314.
- Klibanov, A. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-6.
- Kondo, A., Mihara, J. (1996). Comparison of Adsorption and Conformation of Hemoglobin and Myoglobin on Various Inorganic Ultrafine Particles. *J. Colloid Interface Sci.* **177**: 214-221.
- Liu, S., Chen, A., (2005). Coadsorption of Horseradish Peroxidase with Thionine on TiO₂ Nanotubes for Biosensing. *Langmuir*, **21**: 8409
- Lui H.S., Yang, Y.C. (1995). The sorption of lysozyme and ribonuclease onto ferromagnetic nickel powder 2. Desorption and competitive adsorption. *Colloids & Surfaces B*, **5**: 35-42.
- Morán, C., Infante, M.R., Clapés, P. (2001). Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of rac-1-O-(N^α-acetyl-L-aminoacyl) glycerol derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**: 2063-70.
- Morcelle, S. R., Barberis, S., Priolo, N., Caffini, N.O., Clapés, P. (2006). Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe. *J Mol Catal B: Enzymatic*, **41**:117-124
- Morcelle, S.R., Liggieri, C.S., Bruno, M.A., Priolo, N.S., Clapés, P. (2009). Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **57**: 177-182.
- Obregón, W.D., Arribére, M.C., Morcelle del Valle, S., Liggieri, C., Caffini, N.O., Priolo, N.S. (2001). Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.* **20**:17-25.
- Oliva, F.Y., Avalle, L.B., Camara, O.R., de Pauli, C.P. (2003). Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO₂ particles. *J. Coll. Int. Sci.*, **261**: 299-311.
- Piera, E., Infante, M.R., Clapés, P. (2000). Chemo-enzymatic síntesis of arginine-based gemini surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **70**: 323-31.
- Priolo, N., Morcelle del Valle, S., Arribére, M.C., López, L.M.I., Caffini, N. (2000). Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.* **19**:39-49.
- Priolo, N.; López, L.M.I.; Arribére, M.C.; Natalucci, C.L.; Caffini, N.O. (1991). New Purified Plant Proteinases for the Food Industry. *Acta Aliment.*, **20**: 189-196.
- Rezwan, K., Meier L.P., Gauckler, L.J. (2005). A prediction method for the isoelectric point of binary protein mixtures of bovine serum albumin and lysozyme adsorbed on colloidal titania and alumina particles. *Langmuir*, **21**: 3493-3497.
- Uppenberg, J. Hansen, M.T. Patkar, S., Jones, T.A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*. *Structure* **2**: 293-308.
- Yang, H.W., Viera, C., Fischer J., Etzel, M.R. (2002). Purification of a large protein using ion-exchange membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **41**: 1597-1602.
- Yu, J., Ju, H. (2002). Preparation of Porous Titania Sol-Gel Matrix for Immobilization of Horseradish Peroxidase by a Vapor Deposition Method. *Anal. Chem.* **74**: 3579-3583.
- Yuan Q., Luo, N. (1997) Development, Application, Research and Production of Titanium Dioxide in China. *Chem. Ind. Eng. Prog.*, **5**.
- Zhang Q., Tang, B., Fang, L., Zhang, C. (2006). Immobilized enzyme for pesticide degrading on polypropylene loaded TiO₂ membrane. *Trans. CSAE* **22**: 19.
- Zhang, X. Bai R., Tong, Y.W. (2006). Selective adsorption behaviors of proteins on polypyrrole-based adsorbents. *Sep. Purif. Technol.*, **52**: 161-169.
- Zougrana, T., Findenegg G., Norde, W. (1997). Structure, Stability, and Activity of Adsorbed Enzymes. *J. Coll. Int. Sci.*, **190**: 437-448.

Fitoproteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica en medios acuoso-orgánicos

C A P Í T U L O 4



Síntesis de derivados peptídicos empleando fitoproteasas como biocatalizadores

En este capítulo se describen los ensayos de síntesis de Z-aa-amidas realizados empleando los biocatalizadores que se describen en el capítulo anterior.

Se realizó la síntesis de péptidos isostéricos en las que se hizo (**Figura 1**) reaccionar un dador de acilo (un aminoácido unido por el grupo alfa amino a un grupo protector carbobenzoxi, Z-), con nucleófilos tales como aminoalcoholes. Entre ellos se forma un enlace amida catalizado por las enzimas inmovilizadas.

Como primer paso se seleccionaron las mejores condiciones de reacción para lo cual se ensayaron distintas condiciones:

- mecanismos de reacción: control cinético y termodinámico,
- medios de reacción: distintos solventes y mezclas de solventes,
- biocatalizador libre o inmovilizado.

Determinadas las mejores condiciones, se estudió la especificidad que mostraron ambos catalizadores. Se usaron tres tipos de nucleófilos: etanolamina (glicinol), 3-amino-1-propanol (β -alaninol) y 3,3-dietoxipropan-1-amina, así como dos dadores de acilo: Z-Ala y Z- β -Ala.

Índice:

4.1. Experimental	185
4.1.1. Síntesis enzimática de Z-aa-amidas.....	185
4.1.1.1. Síntesis bajo control cinético	185
4.1.1.2. Síntesis enzimática bajo control termodinámico	185
4.1.1.3. Análisis por HPLC-MS	187
4.2. Resultados y discusión	187
4.2.1. Síntesis enzimática de Z-aa-amidas.....	187
4.2.1.1. Selección de los medios, del mecanismo de reacción y de los biocatalizadores	188
4.2.1.2. Especificidades de las fitoproteasas	190
4.2.1.2.1. Especificidad del subsitio S1'	191
4.2.1.2.2. Especificidad del subsitio S1	194
4.3. Conclusiones	194
4.4 Bibliografía	195

4.1. Experimental

4.1.1. Síntesis enzimática de Z-aa-amidas

4.1.1.1. Síntesis bajo control cinético

Se prepararon distintas mezclas de reacción disolviendo las cantidades del dador de acilo (Z-Ala-OMe) y del nucleófilo glicinol, que se indican en la **Tabla 1** en el solvente o mezcla de solventes respectiva. A 2 ml de mezclas así preparadas, se les agregó 200 mg de papaína inmovilizada en poliamida (Pap/pol). La preparación de este biocatalizador se detalló en el Capítulo 3. Cuando se usó la enzima araujaína libre, a la mezcla de sustratos en buffer $\text{NaHCO}_3\text{-NaCO}_3$ 0,1 M pH 10 con EDTA y DTT 5 mM, se le agregó 20 mg del extracto crudo enzimático.

Las reacciones se desarrollaron en viales cerrados de 4 ml bajo atmósfera de nitrógeno a 25°C en un agitador orbital (150 rpm). Se tomaron muestras de 100 μl a distintos tiempos (hasta 96 hs) y se detuvieron por el agregado de 20 μl ácido acético (HAc) glacial.

Medio de reacción	Dador de acilo	Nucleófilo	Biocatalizador
ACN 0,5% H_2O (v/v)	Z-Ala-OMe (20 mM)	Glicinol (30 mM)	Pap/pol
ACN 1,5% H_2O (v/v)	Z-Ala-OMe (20 mM)	Glicinol (30 mM)	Pap/pol
ACN 4% H_2O (v/v)	Z-Ala-OMe (20 mM)	Glicinol (30 mM)	Pap/pol
Metil-tert-butil éter (MTBE) saturado en H_2O	Z-Ala-OMe (20 mM)	Glicinol (30 mM)	Pap/pol
Diisopropil éter (DIPE) saturado en H_2O	Z-Ala-OMe (20 mM)	Glicinol (30 mM)	Pap/pol
Buffer $\text{NaHCO}_3\text{-NaCO}_3$ 0,1 M pH 10 con EDTA y DTT 5 mM	Z-Ala-OMe (5 mM)	Glicinol (90 mM)	Araujiaína libre

Tabla 1. Condiciones de reacción para la síntesis enzimática bajo control cinético.

4.1.1.2. Síntesis enzimática bajo control termodinámico

Para preparar las mezclas de reacción se disolvió en agua una masa del derivado aminoacídico (Z-aa) suficiente para preparar 2 ml de concentración 10 mM. A estas suspensiones se les agregó la solución stock de nucleófilo 100 mM hasta que el pH de la mezcla llegara a 7,0 y posteriormente se liofilizaron para eliminar el agua. Los liofilizados fueron redissueltos en 2 ml del medio de reacción correspondiente. Las concentraciones de dador de acilo y nucleófilo en todos los casos fueron similares entre sí, 10 mM en los ensayos

detallados en la **Tabla 2** y 5 mM en los de las **Tablas 3 y 4**. Las reacciones se desarrollaron en viales cerrados de 4 ml bajo atmósfera de nitrógeno a 25°C en un agitador orbital (120 rpm). Los biocatalizadores (4 UI de actividad enzimática) se agregaron a 2 ml de la solución de reactivos para comenzar la reacción. Durante la misma, se tomaron muestras de 100 µl a 1, 3, 6, 24, 48 y 72 horas. A cada muestra se le agregó 20 µl HAc glacial para detener la reacción.

Medio de reacción	Dador de acilo	Nucleófilo	Biocatalizador
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (10 mM)	Glicinol (10 mM)	Pap/pol
ACN 4% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (10 mM)	Glicinol (10 mM)	Pap/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (10 mM)	Glicinol (10 mM)	Ara/pol
ACN 4% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (10 mM)	Glicinol (10 mM)	Ara/pol

Tabla 2. Mezclas de reacción para síntesis por control termodinámico tomando como variables los biocatalizadores y los medios de reacción.

Medio de reacción	Dador de acilo	Nucleófilo	Biocatalizador
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (5 mM)	Glicinol (5 mM)	Pap/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (5 mM)	β-alaninol (5 mM)	Pap/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (5 mM)	3,3-dietoxipropan-1-amina (5 mM)	Pap/pol

Tabla 3. Mezclas de reacción para síntesis por control termodinámico tomando como variables los nucleófilos

Medio de reacción	Dador de acilo	Nucleófilo	Biocatalizador
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (5 mM)	Glicinol (5 mM)	Pap/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (5 mM)	Glicinol (5 mM)	Ara/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-β-Ala (5 mM)	Glicinol (5 mM)	Pap/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-β-Ala (5 mM)	Glicinol (5 mM)	Ara/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (5 mM)	β-alaninol (5 mM)	Pap/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-Ala (5 mM)	β-alaninol (5 mM)	Ara/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-β-Ala (5 mM)	β-alaninol (5 mM)	Pap/pol
ACN 1% H ₂ O (v/v)	Z-β-Ala (5 mM)	β-alaninol (5 mM)	Ara/pol

Tabla 4. Mezclas de reacción para síntesis por control termodinámico tomando como variables los biocatalizadores, los dadores de acilo y los nucleófilos.

Para optimizar el método, se modificaron algunas variables de la reacción. Se usaron distintos medios [ACN con 1 ó 4% (v/v) de agua] y distintas concentraciones de reactivos (5 ó 10 mM). Además se comparó la efectividad de los dos biocatalizadores (Ara/pol y Pap/pol) y la selectividad de los mismos para distintos dadores de acilo (Z-Ala y Z-β-Ala) y distintos

nucleófilos (glicinol, β -alaninol y 3,3-dietoxipropan-1-amina). Las distintas mezclas de reacción se describen en las **Tablas 2, 3 y 4**.

4.1.1.3. Análisis por HPLC-MS

Las reacciones fueron monitoreadas por HPLC-MS (Agilent 1100 LC/MSD) empleando una columna Lichrosphere RP C18 (5 μ m, 250 \times 4 mm, Merck). Las condiciones cromatográficas fueron: solvente A, H₂O 0,1 % (v/v) TFA, solvente B, CH₃CN: H₂O 80:20 0,1% (v/v) TFA; velocidad de flujo 1 ml/min; gradiente de 10% a 70% de B en 25 min; detección a 215 nm. En algunos casos, se hicieron análisis en los mismos solventes A y B sin el agregado de TFA. La cuantificación fue realizada a partir de las áreas de los picos según el método del estándar externo. La caracterización de cada pico fue hecha por ES-MS en modo positivo.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Síntesis enzimática de Z-aa-amidas

Existe una demanda cada vez más importante de péptidos modificados con buenos perfiles de estabilidad y propiedades farmacocinéticas optimizadas. Estos compuestos pueden tener actividad inhibitoria de proteasas, y son importantes para el tratamiento de enfermedades tales como el SIDA (Sarubbi y col., 1993), dengue (Yin y col., 2006) y malaria (Ersmark y col., 2005), gracias a que se podrían unir al sitio activo de las proteasas. Por esta misma característica, también pueden emplearse como ligandos para purificar proteínas por cromatografía de afinidad (Voyushina y col., 1999).

La obtención de precursores como peptidil aminoalcoholes y peptidoaldehídos por la vía química usual, suelen involucrar la reducción de los derivados de aminoácidos y/o péptidos empleando NaBH₄-I₂, previa derivatización del grupo α -COOH con pentaclorofenol (Naqvi y col., 1999); mientras que la oxidación de los peptidil aminoalcoholes se realiza usando ácido *o*-iodobenzoico en acetato de etilo calentando a reflujo (Oceio y col., 2005). En contraste, el empleo de enzimas es una alternativa ventajosa a estos procesos químicos tradicionales de manufactura de productos farmacéuticos (Khmelnitsky y Rich, 1999). Como se vio en la Introducción, los métodos biocatalíticos evitan pasos de protección y desprotección, disminuyendo el uso de reactivos y solventes peligrosos así como de condiciones extremas de reacción. En el caso que se estudia en el presente trabajo, el hallazgo de peptidasas capaces de catalizar la síntesis de esta clase de moléculas tiene un rol

preponderante. El ensayo de dos biocatalizadores preparados a partir de proteasas vegetales, la selección de las condiciones de reacción óptimas y el estudio de las especificidades de las mismas, son pasos primarios y fundamentales para poder aplicar dichas enzimas en la síntesis de estos compuestos.

4.2.1.1. Selección de los medios, del mecanismo de reacción y de los biocatalizadores

En las reacciones realizadas por control cinético (dador de acilo: Z-Ala-OMe) se observó que la reacción transcurre lentamente (**Tabla 5**) excepto en aquella catalizada por papaína libre en buffer NaHCO_3 - Na_2CO_3 0,1 M de pH 10, en la que a las 6 hs de reacción se obtuvo el rendimiento máximo en la formación del producto Z-Ala-glicinol. Por otro lado, utilizando Pap/pol, se obtuvieron rendimientos similares a las 48 hs., usando metil-terbutil éter (MTBE) y diisopropil éter (DIPE). En ACN con bajos porcentajes de agua se obtuvieron menores rendimientos, observándose que los mismos decaían cuando se aumentó el porcentaje de agua del 0,5% al 1,5% v/v.

Medio de reacción	Biocatalizador	Dador de acilo	Rendimiento máximo % (tiempo)
ACN 0,5% H_2O	Pap/pol	Z-Ala-OMe	47% (96 hs)
ACN 1,5% H_2O	Pap/pol	Z-Ala-OMe	16,5% (48 hs)
ACN 4% H_2O	Pap/pol	Z-Ala-OMe	16,3% (48 hs)
MTBE	Pap/pol	Z-Ala-OMe	55,7% (48 hs)
DIPE	Pap/pol	Z-Ala-OMe	59,1% (48 hs)
Buffer acuoso pH 10	Ara libre	Z-Ala-OMe	60% (6 hs)
ACN 1% H_2O	Pap/pol	Z-Ala	69% (72 hs)
ACN 1% H_2O	Ara/pol	Z-Ala	54,9% (72 hs)
ACN 4% H_2O	Pap/pol	Z-Ala	67% (72 hs)
ACN 4% H_2O	Ara/pol	Z-Ala	8,3 % (72 hs)

Tabla 5. Resultados en conversión máxima a tiempos determinados de los ensayos realizados para optimizar el medio de reacción y el mecanismo de control.

De los resultados de las reacciones transcurridas bajo control termodinámico se observa que las mejores conversiones (69% a las 72 h de reacción) en Z-Ala-glicinol fueron obtenidas con papaína inmovilizada en poliamida como biocatalizador. En el caso de Ara/pol, se puso de manifiesto una gran dependencia con el contenido de agua presente en el medio: en ACN con 1% de agua la actividad fue 7 veces mayor que en ACN con 4% de agua, mientras

que Pap/pol presentó prácticamente la misma actividad. Por otra parte, con Pap/pol se observaron valores de actividad mucho mejores en el método por control termodinámico que la reacción realizada bajo control cinético (**Tabla 5**).

De los dos mecanismos de reacción se prefirió el control termodinámico debido a dos razones principales. En primer lugar, porque se obtuvieron mejores resultados. En segundo lugar, porque con el control cinético se presentaron dos desventajas: 1) la necesidad de activar el dador de acilo y 2) la aparición indeseada del subproducto de hidrólisis del mismo (Z-Ala).

Con respecto al solvente, si bien los éteres ensayados dan buenos rendimientos, se ha comprobado (Capítulos 1 y 2) que el ACN con baja proporción de agua es un solvente que no afecta la actividad de las proteasas, por eso se eligió este medio para las reacciones siguientes. Se determinó, además, que la cantidad de agua de la mezcla con la que se obtuvieron mejores conversiones usando control termodinámico fue de 1%.

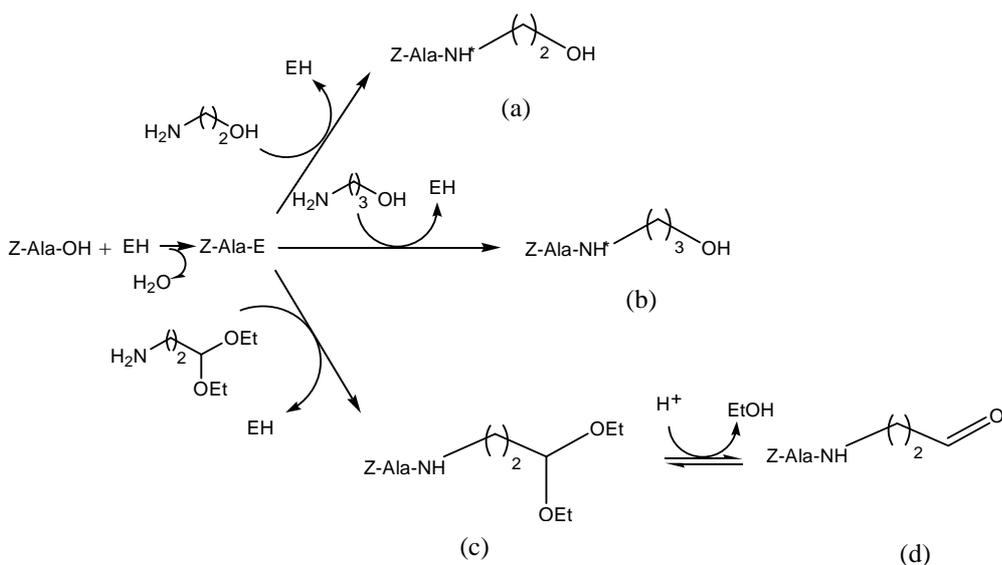


Figura 1. Esquema de síntesis por control termodinámico de Z-alanilamidas empleando papaína como biocatalizador. EH: papaína. Nucleófilos: glicinol (n=2), β-alaninol (n=3) y 3,3-dietoxipropan-1-amina. Medio de reacción: ACN con 1% agua (v/v). **a.** Z-Ala-glicinol. **b.** Z-Ala-β-alaninol. **c.** Z-Ala-dietoxipropanamida. **d.** Z-Ala-β-alaninal.

A pesar de que el rendimiento obtenido con araujaína libre es de los más altos, se prefirió el uso de enzimas adsorbidas sobre poliamida, ya que permite una fácil separación del biocatalizador desde la mezcla de reacción.

Se lograron altos porcentajes de conversión usando Pap/pol y Ara/pol en ACN con agua bajo control termodinámico. En este sistema Pap/pol fue mejor que Ara/pol. Este último,

por otra parte demostró ser muy sensible a la cantidad de agua, limitándose su uso a los medios con 1% de agua

En la **Figura 1** se muestran las reacciones catalizadas por los biocatalizadores mediante control termodinámico.

4.2.1.2. Especificidades de las fitoproteasas

En las síntesis propuestas catalizadas por las preparaciones proteolíticas inmovilizadas, se consideró que papaína y araujaína tienen especificidades similares, dada su pertenencia a la misma familia (C1) y subfamilia (C1A) (Rawlings y col., 2010).

Ambas proteasas requieren de un residuo hidrofóbico en la posición P2 (subsitio S2) (Rawlings y col., 2010), usando la nomenclatura propuesta por Schechter y Berger, (1967) (**Figura 2**). En las síntesis ensayadas esta posición está ocupada por el grupo protector N^{α} -carboboixi (Z-) de los dadores de acilo usados.

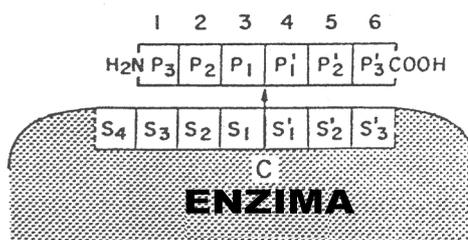


Figura 2. Esquema de la terminología de los subsitios específicos de las proteasas con las características complementarias del sustrato. El sitio activo de la enzima está compuesto por subsitios (S1–S4 y S1’-S3’) localizados a ambos lados del sitio catalítico. Las posiciones P del sustrato se cuentan desde el punto de corte, teniendo así la misma numeración que los subsitios que ocupan. C: sitio catalítico.

En la posición S1, en cambio, para este tipo de peptidasas la exigencia sería baja (Rawlings y col., 2010), por esa razón se probaron sustratos que contenían los residuos α - y β -Ala (**Tabla 4**). En el Capítulo 3 se comprobó que en la reacción de hidrólisis de derivados *p*-nitrofenilados, los dos biocatalizadores hidrolizaron bien los derivados de Ala, Gly, Leu y Arg. Entre ellos, los biocatalizadores demostraron tener preferencia por el derivado de Ala. Por esa razón, se eligió el sustrato Z-Ala para las reacciones de síntesis.

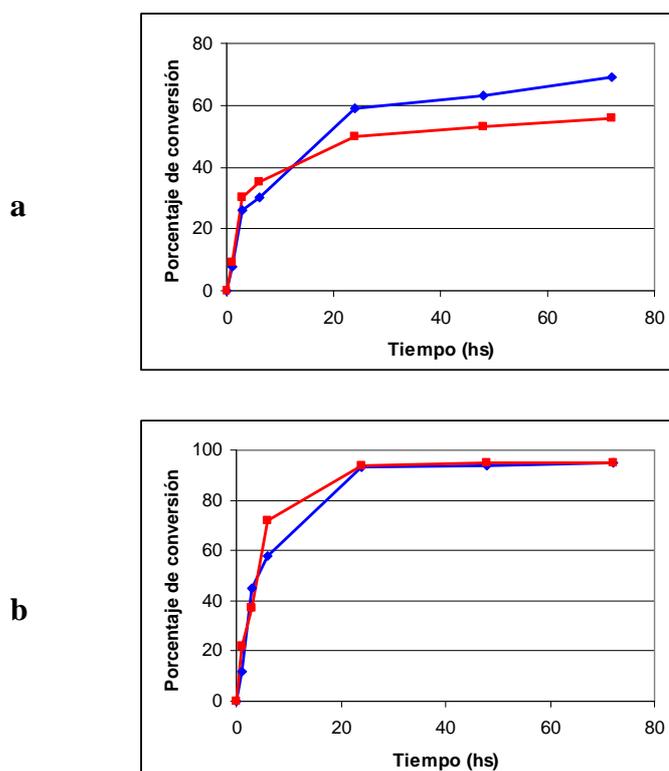
Por último, para ensayar la especificidad del subsitio S1’ se seleccionaron tres aminas diferentes: glicinol, β -alaninol y 3,3-dietoxipropan-1-amina (**Tablas 3 y 4**).

4.2.1.2.1. Especificidad del subsitio S1'

La cinética de reacción de síntesis, catalizada por Pap/pol y Ara/pol, de los productos **a** (Z-Ala-glicinol) y **b** (Z-Ala-β-alaninol) se muestra en la **Figura 3** y los valores de rendimiento máximo y los tiempos para las tres reacciones ensayadas, con ambos biocatalizadores en la **Tabla 6**.

Dador de acilo	Nucleófilo	Biocatalizador	Rendimiento máximo (tiempo)
Z-Ala	Glicinol	Pap/pol	69% (72 hs)
Z-Ala	Glicinol	Ara/pol	56% (72 hs)
Z-Ala	β-alaninol	Pap/pol	95% (48 hs)
Z-Ala	β-alaninol	Ara/pol	95% (48 hs)
Z-Ala	3,3-dietoxipropan-1-amina	Pap/pol	96% (48 hs)
Z-Ala	3,3-dietoxipropan-1-amina	Ara/pol	80% (48 hs)

Tabla 6. Resultados de las reacciones biocatalizadas por Pap/pol con tres nucleófilos distintos



Figuras 3. Cinética de síntesis de **a**: producto (a) y **b**: producto (b) empleando Ara/pol (—) y Pap/pol (—). Las reacciones fueron seguidas por HPLC y los productos detectados por absorción a 215 nm y caracterizados por ES-MS en modo positivo. Producto (a), Z-Ala-glicinol, $(M+H^+)=266,8$; producto (b), Z-Ala-β-alaninol, $(M+H^+)=281,2$.

Los biocatalizadores presentaron buenos rendimientos usando cualquiera de los tres sustratos nucleófilos. Los mejores rendimientos alcanzados se obtuvieron con β-alaninol

usando cualquiera de los dos biocatalizadores y 3,3-dietoxipropan-1-amina con Pap/pol. Las conversiones observadas con el sustrato 3,3-dietoxipropan-1-amina fueron de alrededor del 80% en productos para Ara/pol luego de 48 h de reacción, mientras que para Pap/pol se logró el mismo rendimiento luego de 24 h de reacción, siendo a las 48 hs de un 96%.

La cinética de las reacciones mostró que a las 24 hs la conversión para el producto **b** es muy cercana a la máxima y luego prácticamente se detiene la reacción, mientras que para el **a** se registra un leve aumento entre las 24 y las 72 hs (**Figuras 3**). El grueso de la reacción en todos los ensayos transcurrió en las primeras 24 hs.

Para el caso de la reacción de condensación entre Z-Ala con 3,3-dietoxipropan-1-amina, en ambos ensayos (**Tabla 6**), el análisis por HPLC-MS reveló que el principal producto detectado es el pico de $t_R=13,5$ min (**Figura 4a**, pico 1) con masas de $(M+H^+)=279,2$ y $(M+Na^+)=319,1$ (**Figura 5**). Dicha masas corresponderían al producto **d** (Z-Ala- β -alaninal) y su hidrato, respectivamente. Ambos compuestos se formarían a partir del producto de síntesis esperado (**c**) (**Figura 1**). El producto de síntesis **c** presenta un pico de $t_R=21,8$ min [**Figura 4a**, pico 3, $(M+Na^+)=375,2$].

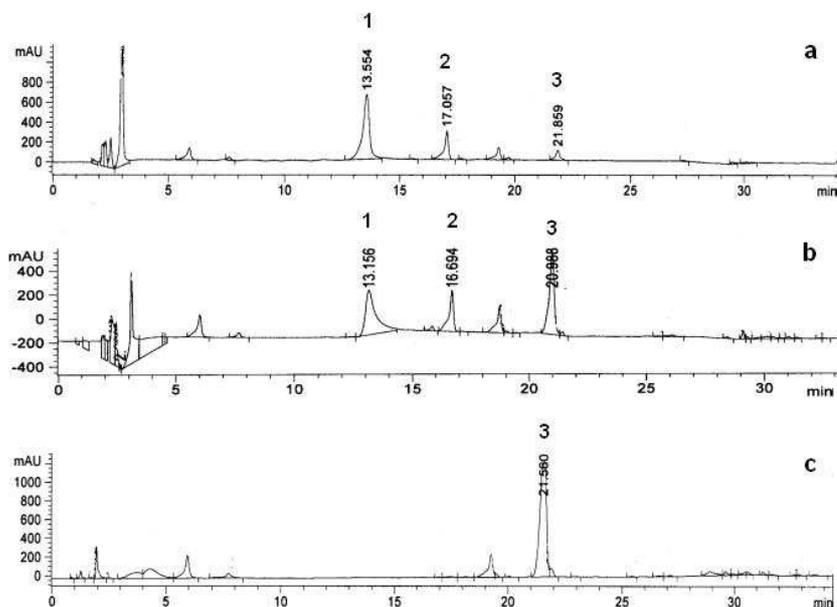


Figura 4. Cromatogramas de la reacción de condensación entre Z-Ala y 3,3-dietoxipropan-1-amina catalizada por Pap/pol (tiempo de reacción: 48 hs). Pico 1: producto **d** y su hidrato, masas de $(M+H^+)=279,2$ y $(M+Na^+)=319,1$ respectivamente; pico 2, Z-Ala $(M+H^+)=224,1$; pico 3, producto **c** $(M+Na^+)=375,2$. **a.** Cromatograma de la reacción detenida con HAc glacial y con TFA en la fase móvil de la cromatografía. **b.** Cromatograma de la reacción detenida con HAc glacial y sin TFA en la fase móvil de la cromatografía. **c.** Cromatograma de la reacción detenida en baño de agua-hielo (sin HAc glacial) y sin TFA en la fase móvil de la cromatografía.

Para saber si el producto **d** se formó mediante catálisis enzimática o sólo como resultado del ácido presente en el medio, se repitieron las síntesis, pero en lugar de emplear HAc para detener las reacciones, las mezclas de reacción se sumergiendo en mezclas de agua-hielo. Las muestras fueron analizadas con y sin TFA en las fases móviles A y B de HPLC (**Figuras 4b y 4c**, respectivamente).

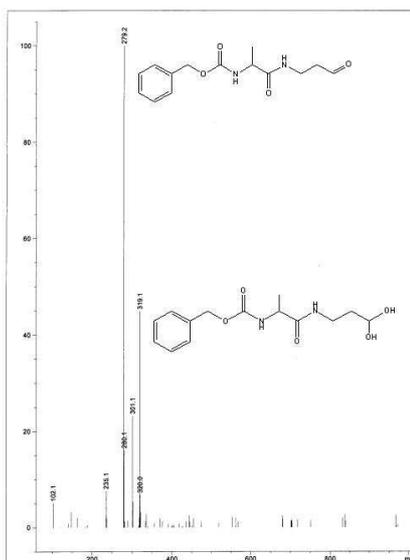


Figura 5. Espectro de masas del pico 1 correspondiente al cromatograma de la Figura 4a, donde se observan el producto **d** y su hidrato.

Los cromatogramas de las **Figuras 4b y 4c** demuestran que el área del pico de 13,5 min disminuye a medida que decrece la cantidad de ácido en el medio, hasta desaparecer, mientras que el área del pico de 21 min aumenta. El Z-Ala- β -alaninal y su hidrato se obtendrían mediante la catálisis ácida producida luego de detener la reacción con HAc. Incluso el TFA presente en la fase móvil de la cromatografía podría favorecer la aparición de los mismos antes de ingresar a la columna. El mecanismo del equilibrio entre los productos mencionados está ilustrado en la **Figura 6**.

Estos resultados demostraron la versatilidad de las enzimas en el subsitio S1', no solamente para acomodar derivados aminoacídicos, sino también aminoalcoholes y otros derivados como aminoacetales.

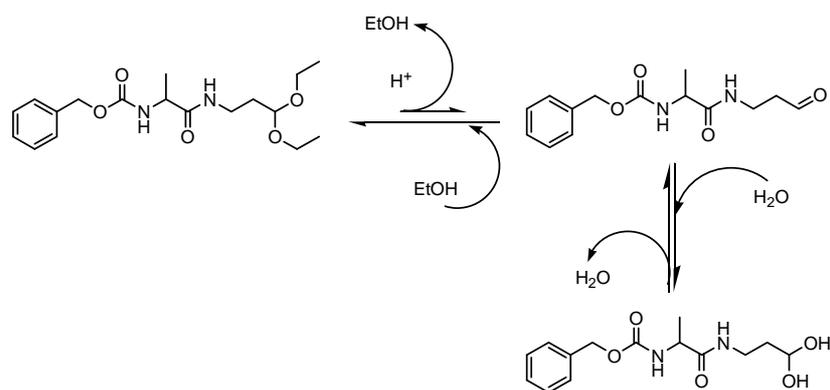


Figura 6. Reacción de equilibrio del producto **c** en medio ácido. La forma acetal del producto se convierte, mediante catálisis ácida, en el correspondiente aldehído (**d**), que inmediatamente dará lugar al hidrato del mismo.

4.2.1.2.2. Especificidad del subsitio S1

Al reemplazar Z-Ala por Z- β -Ala, no se observó la formación de ningún producto de reacción. A pesar de que se considera que el subsitio S1 donde se acomoda este aminoácido es bastante flexible, los resultados demuestran que ninguna de las dos enzimas reconoció este aminoácido no codificado. La razón de estos resultados no estaría en el hecho de que el derivado contenga un residuo aminoacídico no codificado, ya que se han realizado síntesis usando α -aminoácidos no codificados (Krix y col., 1997; Bordusa, 2002), sino debido a la diferencia estructural de las moléculas α y β aminoacídicas.

4.3. Conclusiones

Se llevó a cabo la síntesis de distintos peptidilaminoalcoholes catalizada por endopeptidasas de origen vegetal tanto inmovilizadas en poliamida como libres. Se utilizaron distintos medios y las reacciones se llevaron a cabo tanto bajo control termodinámico como cinético.

Las condiciones óptimas encontradas para la síntesis de los compuestos planteados fueron el desarrollo de la reacción bajo control termodinámico (Z-Ala en lugar de Z-Ala-OMe como dador de acilo), mezcla equimolar de sustratos (pH 7,0), ACN con 1% (v/v) de agua como medio de reacción y las enzimas inmovilizadas.

Las dos enzimas inmovilizadas fueron efectivos catalizadores en la síntesis de tres productos: Z-Ala-glicinol, Z-Ala- β -alaninol y el producto **c** que, en medio ácido genera Z-Ala- β -alaninal y su hidrato. De esta forma se demostró la flexibilidad en el subsitio S1' de ambas enzimas. Por el contrario, la flexibilidad del subsidio S1 no fue suficiente para aceptar

el β -aminoácido ensayado, por lo que se concluye que su especificidad estaría limitada a α -aminoácidos.

La gran flexibilidad de estos biocatalizadores para reaccionar frente a sustratos tales como aminoalcoholes y aminoacetales los convierte en herramientas muy útiles para la obtención de peptidil amino alcoholes y péptido aldehídos, compuestos que son intermediarios en la síntesis de isómeros peptídicos en la industria farmacéutica.

4.4 Bibliografía

- Bordusa, F. (2002). Proteases in organic synthesis. *Chem. Rev.* **102**: 4817-67.
- Ersmark, K., Nervall, M., Hamelink, E., Janka, L.K., Clemente, J.C., Dunn, B.M., Blackman, M.J., Samuelsson, B., Aqvist, J., Hallberg A. (2005). Synthesis of Malarial Plasmeprin Inhibitors and Prediction of Binding Modes by Molecular Dynamics Simulations. *J. Med. Chem.* **48**: 6090-6106.
- Khmelnitsky, Y.L.; Rich, J.O. (1999). Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Curr. Op. Chem. Biol.* **3**:47-53
- Krix, G.; Eichhorn, U., Jakubke, H.D., Kula, M.R. (1997). Protease-catalyzed synthesis of new hydrophobic dipeptides containing non-proteinogenic amino acids. *Enzyme Microb. Tech.* **21**:252-257, 1997
- Naqvi, T., Bhattacharya, M., Haq, W. (1999). An Efficient Method for the Reduction of N-Protected Amino Acids and Peptides to the Corresponding Alcohols. *J. Chem. Research (S)* **7**: 424-425
- Ocejo, M.; Vicario, J.; Badía, D.; Carrillo, L.; Reyes, E. (2005). A direct and effective stereoconservative procedure for the selective oxidation of *N*-protected β -amino alcohols. *Synlett* **2005**:1-3.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A. (2010). *MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res.* **38**: 227-233.
- Sarubbi, E., Seneci, P.F., Angelastro, M.R., Peet, N.P., Denaro, M., Islam K. (1993). Peptide aldehydes as inhibitors of HIV protease. *FEBS* **319**: 253-256.
- Schechter, I., Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **27**:157-62.
- Voyushina, T.L., Potetinova, J.V., Milgotina, E.I., Stepanov, V.M (1999). Synthesis of peptide aldehydes via enzymatic acylation of amino aldehyde derivatives. *Bioorg. Medicin. Chem.* **7**: 2953-9.
- Yin, Z., Patel, S.J., Wang, W.-L., Chan, W.-L., Ranga Rao, K.R., Wang, G., Ngew, X., Patel, V., Beer, D., Knox, J.E., Ma, N.L., Ehrhardt, C., Lim, S.P., Vasudevan, S.G., Keller, T.H. (2006). Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 40-43.

Conclusiones generales del trabajo:

- A partir del desarrollo de este trabajo de tesis adquirí, a través de una extensa práctica concreta, los conceptos básicos para el planteamiento, la organización, la realización y la conclusión de un trabajo de investigación. Además incorporé también la capacidad de replantear métodos y estrategias de acuerdo a los distintos resultados.
- Conocí y me entrené en un gran número de técnicas de laboratorio como las de medidas de actividad, electroforesis, isoelectroenfoque, purificación e inmovilización de proteínas, entre otras. También en el uso de diversos equipos de laboratorio como el espectrofotómetro, el espectrofluorómetro, equipos de cromatografía líquida, HPLC-MS, liofilizador, rotavapor entre otros. Y, en la interpretación de los resultados de los ensayos usando estos equipos así como de ensayos provenientes de EM MALDI-TOF y FTIR-ATR.
- Aprendí a realizar búsquedas de material bibliográfico y a seleccionar los más útiles para el desarrollo del plan proyectado y para la incorporación de nuevas ideas al mismo.
- Trabajé como parte de un grupo de investigación y también en colaboración con distintos miembros del LIPROVE como investigadores, becarios y estudiantes y, por otro lado con grupos de otras unidades de investigación como el CINDECA.
- Por último, también pude ser capaz de presentar los resultados del trabajo de investigación en distintos formatos como informes periódicos, posters y presentaciones orales en congresos y publicaciones en revistas.

Conclusiones específicas del trabajo:

En el **Capítulo 1**, en primer término, se describió la obtención de extractos enzimáticos de papaína y araujaína en buenas cantidades y a muy bajos costos.

Posteriormente se detallaron las medidas de estabilidad realizadas en distintos solventes. El empleo de isooctano no afectó la estabilidad de papaína y araujaína. En cambio, el dioxano en proporciones del 30, 50 y 70% (v/v) provocó la pérdida total de actividad luego de 6 hs de incubación en los dos extractos enzimáticos ensayados. El MeOH en bajas proporciones (30, 50 y 70%) y el ACN en altas (90 y 99%) no afectaron la actividad del extracto de papaína, mientras que redujeron en un 50% la actividad de araujaína. En ACN 30, 50 y 70% ocurrió una reducción del 50% de actividad en ambos extractos, mientras que en DMF la reducción de actividad fue proporcional a la cantidad de solvente, entre un 10 a 30% de caída en el caso de DMF 30% y entre un 70 y 100% en DMF 70%. En MeOH y DMF en altas proporciones la papaína conserva un 40 y un 20% de su actividad, respectivamente, mientras que araujaína la pierde completamente. En general, los efectos de los solventes sobre araujaína fueron más drásticos que los observados sobre papaína.

El ACN en todas las proporciones y el MeOH en proporciones bajas mostraron ser solventes que no afectaron notablemente la actividad de las enzimas, lo que no fue observado para DMF. ACN y MeOH podrían ser así solventes de elección a la hora de realizar ensayos biocatalíticos.

Asimismo se determinó que el extracto crudo de papaína y la papaína purificada presentaron un comportamiento catalítico similar al exponerse a ACN, MeOH y DMF en altas proporciones.

En el **Capítulo 2** se describieron los análisis espectroscópicos de fluorescencia y FTIR-ATR realizados para profundizar el estudio de estabilidad de papaína en mezclas acuoso-orgánicas. En ellos se observó que papaína presentó una estructura ligeramente más compacta y estructurada en todos los medios investigados [ACN, MeOH y DMF 90 y 99% (v/v)] que la que presenta en un ambiente acuoso. Sin embargo, excluyendo lo ocurrido en DMF 99%, no se detectaron grandes cambios en las estructuras secundarias.

En ACN se vio que la actividad de papaína variaba muy poco a pesar de la mayor estructuración que mostraron los estudios por fluorescencia. El MeOH provocó que la actividad enzimática descendiera hasta un 20% de la observada en buffer. Este descenso se

vio acompañado por aumentos leves de hélices α y láminas β en MeOH 90% y de láminas y giros β en MeOH 99%, observados mediante espectroscopía FTIR-ATR. Por otra parte mediante los estudios de fluorescencia no se vieron cambios importantes. DMF demostró ser el solvente más agresivo de los tres ensayados en este estudio, ya que provocó la inactivación de la papaína. Esto fue acompañado por cambios irreversibles en la estructura terciaria evidenciados por desplazamientos en los λ_{\max} de los espectros de FI y por los espectros ANS y FRET. En DMF 99%, además se observó un gran aumento de láminas b y descenso en las demás estructuras.

En el Capítulo 2 también se describió la purificación de papaína mediante un método simple. La purificación constó de dos pasos de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y un paso de precipitación con NaCl, mediante los cuales se separó papaína de las otras proteasas en presencia de TT 30 mM en todos los pasos, obteniéndose rendimientos de alrededor del 3%. Para determinar la pureza del producto se usaron variadas técnicas: SDS-PAGE, IEF y zimogramas, cromatografías de intercambio iónico, espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de la huella peptídica. Se confirmó que el producto purificado contenía papaína pura y que las escasas impurezas observadas fueron péptidos provenientes de los cuatro proteasas presentes en el látex de *Carica papaya*.

En el **Capítulo 3** se detalló el procedimiento utilizado para inmovilizar araujaína sobre dióxido de titanio mediante adsorción simple. Se observó, en el mismo, que la adsorción de proteasas es altamente selectiva y muy rápida. La actividad recuperada en el biocatalizador con respecto a la del extracto crudo es de un 8% al medir actividad amidásica. Además, se comprobó que los fenómenos de desorción enzimática en medios acuosos son un grave problema para el uso y la reutilización de estos biocatalizadores en este tipo de medios y que este fenómeno es más importante a medida que aumenta la fuerza iónica del medio.

Por otra parte, se profundizó el estudio de biocatalizadores preparados con papaína y araujaína en poliamida. Se observó que se recupera el 17% de la actividad luego de la inmovilización en el caso de araujaína y el 9% para papaína.

En medios acuosos se observó que existe una desorción de enzimas muy importante, siendo ésta más pronunciada en el caso de Ara/pol. Por último, se vio que tanto Ara/pol, como Pap/pol fueron activos frente a los sustratos sintéticos ensayados, siendo el derivado de Ala el preferido de ambos.

En el **Capítulo 4** se describió la optimización de las reacciones de síntesis propuestas. Las condiciones óptimas encontradas para la síntesis de los peptidilaminoalcoholes fueron el desarrollo de la reacción bajo control termodinámico, mezcla equimolar de sustratos (pH 7,0), ACN con 1% (v/v) de agua como medio de reacción y las enzimas inmovilizadas. Por otra parte se encontró que las dos enzimas inmovilizadas fueron efectivos catalizadores en la síntesis de tres productos: Z-Ala-glicinol, Z-Ala- β -alaninol y Z-Ala-alaninal, con rendimientos entre 60 y 95%. En cambio, ninguno de los dos biocatalizadores fue capaz de aceptar como sustrato el Z- β -Ala, demostrando una alta selectividad por α -aminoácidos.

1. **C. R. F. Llerena Suster**, M. L. Foresti, L. E. Briand, S. R. Morcelle. “Selective adsorption of plant cysteine peptidases onto TiO₂”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 72 (2009) 16-24.
2. **C. R. Llerena-Suster**, N. S. Priolo, S. R. Morcelle. “Sodium tetrathionate effect on papain purification from different *Carica papaya* latex crude extracts”. *Preparative Biochemistry And Biotechnology* 41:2 (2011), 107-121.
3. **C. R. Llerena-Suster**, W. D. Obregon, S. Trejo, S. R. Morcelle. “Papain Purification Insights: Monitoring by Electrophoretic Approaches and MALDI-TOF Peptide Mass Fingerprint Analyses”. *Analytical Letters*. 44 (2011), 2124-2137.
4. **C. R. Llerena-Suster**, C. José, S. E. Collins, L. E. Briand, S. R. Morcelle. “Investigation of the structure and proteolytic activity of papain in aqueous miscible organic media”. *Process biochemistry* 47 (2012), 47-56.