

CAPACIDAD DE LOS EC PARA SÍNTESIS PEPTÍDICA

Para poder llevar a cabo la síntesis enzimática de compuestos bioactivos en medios no convencionales es necesario conocer el comportamiento de las enzimas en dichos medios. Para ello se realizaron determinaciones de estabilidad de las enzimas utilizando sustratos naturales y sintéticos en medios monofásicos y bifásicos, verificando la actividad enzimática residual a lo largo del tiempo (Priolo *et al.*, 2000; Priolo *et al.*, 2001; Quiroga *et al.*, 2005 a,b; Barberis *et al.*, 2005).

Además se evaluaron diferentes sistemas de inmovilización en distintos soportes a fin de seleccionar el que brinde mayor rendimiento, para luego utilizarlo en la síntesis de péptidos. Posteriormente se ensayó la síntesis peptídica planteada en los objetivos empleando el mejor medio no convencional y el mejor sistema de inmovilización encontrados para el EC de *Araujia hortorum*.

1. INMOVILIZACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Teniendo en cuenta que para los ensayos de biocatálisis en medio orgánico las enzimas deben encontrarse ya sea en estado sólido (liofilizadas o bien como polvos o precipitados acetónicos) o en forma inmovilizada, se procedió a probar el modo de inmovilizar las enzimas en la forma más conveniente, aunque para estos fines la sola adsorción o deposición sobre superficies no porosas (por ej. perlas de vidrio) es satisfactoria, ya que las enzimas son incapaces de desorberse desde la superficie en medios no acuosos de baja polaridad.

Una de las estrategias para evaluar y seleccionar el sistema de reacción contempla la posibilidad de utilizar al catalizador (en este caso, las proteasas del látex de *Araujia hortorum*) en fase sólida, lo que permitiría mayor estabilidad del mismo en los distintos medios a ensayar (acuoso y no acuoso) y su posible reutilización, siendo esta última una de las aplicaciones más interesantes y prometedoras.

Con los datos de estabilidad en medios no convencionales obtenidos en trabajos previos con la misma muestra se procedió al ensayo de inmovilización de las enzimas, buscando el mejor soporte que proporcione la mejor relación actividad de enzima inmovilizada versus actividad de enzima libre. Para ello se probaron distintos soportes que inmovilizan con diferentes mecanismos de acción, a los efectos de evaluar el que mejor conserve a la enzima y el que la haga más reutilizable.

Los soportes ensayados fueron la poliacrilamida (que une a la enzima por entrapamiento), la poliamida (que une a la enzima por adsorción) y la agarosa activada (que une a la enzima mediante uniones covalentes múltiples).

1.1. Entrampamiento en geles de poliacrilamida

Se trabajó con extracto crudo de *Araujia hortorum*, conteniendo 294,5 µg de proteína/ml. Se probaron geles de poliacrilamida al 8%, 10% y 14% para obtener diferentes tamaños de poro.

Para cada ensayo se tomó 1 ml de enzima, se añadió por separado sobre una solución de acrilamida-N,N'-metilen-bisacrilamida (30:0,8) y se llevó con buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8 al volumen final necesario para obtener el tamaño de poro deseado. Posteriormente se agregaron los iniciadores y los catalizadores de la polimerización (TEMED y persulfato de amonio). Inmediatamente se procedió a fraccionar la mezcla obtenida en varios tubos eppendorf utilizados como moldes para obtener los geles colocando 0,5 ml de la mezcla en cada uno. Luego de gelificar se extrajeron los geles obtenidos en cada tubo. Cada gel con la enzima entrapada adquirió una forma final de cono. Finalmente se determinó la actividad caseinolítica de cada uno de los geles obtenidos.

1.1.1. Actividad caseinolítica de las proteasas entrapadas

Los conos de poliacrilamida conteniendo las enzimas entrapadas se dejaron en contacto con caseína al 1% en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 9 a 50°C, con agitación constante (Caffini, 1990). A distintos tiempos se fueron

extrayendo muestras desde la mezcla de reacción y luego de precipitar con ácido tricloroacético al 5% se detectaron los productos de hidrólisis por medición de la absorbancia a 280 nm. En cada caso la actividad caseinolítica se expresó como absorbancia a 280 nm por mg de proteína atrapada.

1.2. Adsorción sobre poliamida.

Este método de inmovilización (adsorción de las enzimas sobre un soporte de material poroso, tal como Celite) es considerado como el más popular, aunque se trata más bien de un co-secado o deposición que de una inmovilización propiamente dicha (Gupta y Roy, 2004). Este tipo de preparación (enzima adsorbida sobre soportes sólidos) es fácilmente removido del medio de reacción, facilitando el aislamiento del producto y la reutilización de las enzimas (Adlercreutz, 1991).

El procedimiento consistió en liofilizar 15 ml de EC de *Araujia hortorum*, los cuales rindieron 96,4 mg de EC en polvo. El mismo se mezcló e inmovilizó por deposición sobre un soporte sólido (poliamida-6, EP-700, tamaño de partícula < 800 μm , diámetro de poro promedio 50 - 300 nm, área superficial según el método BET 8,4 m^2/g ; Azko, Alemania) según el siguiente procedimiento: 96,4 mg de enzima en polvo fueron disueltos en 1 ml de buffer bórico - borato 0,1 M de pH 8,5 con EDTA 1 mM y luego mezclado con 1 g de soporte en presencia de 50 mg de DTT. La mezcla resultante fue luego liofilizada (Clapés *et al.*, 1999; Morcelle *et al.*, 2006).

1.2.1. Evaluación de la actividad de las enzimas inmovilizadas sobre diferentes sustratos. Actividad enzimática remanente

La actividad de las enzimas inmovilizadas se determinó a 37 °C frente a distintos sustratos durante 5 min, con agitación orbital (150 rpm) en un agitador BioSan modelo OS-10 (amplitud del movimiento rotacional, 10 mm) deteniéndose la reacción mediante el agregado de AcH al 30%. Los sustratos empleados fueron N- α -carbобензохи-L-arginina-*p*-nitroanilida (Z-Arg-*p*NA, solución stock 1 mM en dimetilformamida, concentración final en el ensayo 0,1

mM) (Gebhard *et al.*, 2004), N α -benzoil-D,L-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA, solución stock 40 mM en DMSO, concentración en el ensayo 4 mM) (Murachi, 1970), N- α -carbобензохи-L-фениланил-L-аргинина-*p*-nitroanilida (Z-Phe-Arg-pNA, solución stock 1 mM en DMSO, concentración final en el ensayo 0,1 mM) en buffer fosfatos 0,1 M (pH 7,4) (Rowan y Buttle, 1994) y L-piroglutamил-L-фениланил-L-леуцина-*p*-nitroanilida [PFLNA, solución stock 1 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), concentración final en el ensayo 0,1 mM] en buffer fosfatos 0,1 M (pH 6,5), conteniendo KCl 0,3 M y EDTA 0,1 mM (Filippova *et al.*, 1984). Se calcularon las unidades enzimáticas internacionales de los geles inmovilizados con cada sustrato mediante curvas de calibración de soluciones de *p*-nitroanilina en las condiciones de cada ensayo. La *p*-nitroanilina liberada se determinó espectrofotométricamente por absorción a 410 nm (Morcelle *et al.*, 2006).

1.3. Inmovilización sobre gel de agarosa

El soporte utilizado para la inmovilización del EC de *A. hortorum* fue agarosa 10 BLC (Hispanagar). Dicho soporte debió ser previamente activado con grupos aldehído para que éstos reaccionen con los residuos aminoácidos de la enzima, utilizando el protocolo de activación de Guisán *et al.*, (1997). Se preparó una solución de agarosa de 180 ml (conteniendo 105 ml de agarosa) a la cual se le adicionó bajo agitación una solución conteniendo 3,4 g de NaOH y 1,425 g de NaBH₄ y luego se agregaron gota a gota 36 ml de glicidol. Esta mezcla se dejó en agitación de paletas durante 18 h aproximadamente (en baño frío porque se trata de una reacción exotérmica). Luego se lavó el gel varias veces con agua destilada, operación que se realizó filtrando bajo vacío (en un filtro con fritilla para no dañar la agarosa). De esta forma se obtuvo el gel gliceril-agarosa. Los pasos siguientes del proceso total de activación correspondieron a la oxidación del gel: a 105 g de gel activado se le adicionaron 1.410 ml de agua destilada y una mezcla conteniendo 5,136 g de NaIO₄ en 240 ml de agua destilada (100 mM). Luego se dejó oxidar suavemente con agitación de paletas durante 2,5-3 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el gel glioxil-

agarosa con abundante agua destilada, de igual forma a la descrita previamente.

La inmovilización se realizó a 25° C, pH 10, con bicarbonato de sodio 100 mM, glicerina al 25% (v/v), en una relación de 25 y 45 mg de proteína/g de agarosa en un volumen total de 25 ml y en presencia de un inhibidor reversible. En el proceso de inmovilización el uso de un inhibidor reversible se justifica debido a que tiene un efecto de protección durante estos procesos de multi-interacción. Por el contrario, en ausencia de inhibidor las enzimas insolubilizadas pierden un importante, pero no dramático, porcentaje de actividad catalítica (Obregón *et al.* 2001). Se tomaron 2 ml de muestra 2 min antes de que finalice el tiempo de inmovilización, es decir, a las 2h y 58 min de tiempo de contacto. Finalmente, se determinó la actividad enzimática inmovilizada (EI), la actividad de la enzima soluble en el sobrenadante de inmovilización (EL) y se calculó el rendimiento de inmovilización (R).

2. REACCIÓN DE SÍNTESIS CON EXTRACTOS CRUDOS LIBRES E INMOVILIZADOS COMO CATALIZADORES

2.1. Selección de los medios de reacción para las síntesis

La selección de los medios de reacción se llevó a cabo en base a la mayor estabilidad enzimática, medida como actividad caseinolítica residual (Ucas/mg de proteína). Para ello se tuvieron en cuenta los resultados de estudios previos de estabilidad del EC de *Araujia hortorum* en diferentes medios acuosos y no convencionales (Priolo *et al.*, 2000; Priolo *et al.*, 2001; Quiroga *et al.*, 2005 a,b; Barberis *et al.*, 2005).

2.2. Selección de los sustratos para las síntesis.

Para la selección de los donantes de acilo se tuvieron en cuenta las preferencias de EC de *Araujia hortorum* por los derivados N- α -carboboxy *p*-nitrofenil ésteres. En cambio, la selección del nucleófilo (Phe.OMe) se realizó en base a su elevada hidrofiliidad, lo cual asegura una concentración saturante de

dicho sustrato en el entorno de la enzima, y a la baja afinidad de la enzima por dicho aminoácido, en relación a las presentadas por los donantes de acilo, en el medio acuoso.

2.3. Selección del pH y temperatura para las síntesis.

En función de estudios previos, buffer Tris-HCl (0,1 M) fue seleccionado para mantener el pH de trabajo en un valor igual a 8.5. La temperatura utilizada en todos los ensayos fue de 37° C (Priolo *et al.*, 2000).

2.4. Reacciones de síntesis.

En todos los ensayos la enzima (1mg/ml), el activador (2-mercaptoetanol) y el nucleófilo fueron disueltos en buffer, en tanto que cada donante de acilo fue disuelto en la fase orgánica. La reacción de condensación comenzó cuando ambas fases fueron puestas en contacto y transcurrió durante varias horas (0-72 h), a temperatura y agitación controladas (160 rpm). A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras de ambas fases por separado, para su posterior análisis. Se realizaron los siguientes blancos de reacción: un blanco sin enzima (para descartar la síntesis química) y un blanco de enzima sin sustratos (a fin de descartar la liberación de péptidos que pudieran confundirse con el producto deseado). Como tiempo cero se consideró el momento en que se agregó la enzima. En forma comparativa, las reacciones de síntesis se llevaron a cabo utilizando EC de *Araujia hortorum* libre e inmovilizada como catalizador (Quiroga *et al.*, 2008).

2.5. Control analítico de los componentes de las reacciones de síntesis

Los productos sintetizados y los sustratos fueron analizados por HPLC con detector UV. Dichos análisis fueron llevados a cabo utilizando un cromatógrafo Gilson (Modelo 712) equipado con una columna Luna C-18 (5 μ) 250 mm x 4,60 mm (Phenomenex). El proceso cromatográfico fue realizado a temperatura ambiente (25° C) y el volumen de inyección fue de 200 μ l para todas las experiencias. La velocidad de flujo fue de 0,8 ml/min. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo-agua (50:50) acidificada con TFA al 0,1% (pH 3). El

material de elución fue monitoreado espectrofotométricamente a 254 nm. Para realizar la cuantificación de los productos y de los sustratos se construyeron curvas de calibración utilizando patrones comerciales.

Por otra parte los productos de las reacciones de síntesis más interesantes en cuanto a sus resultados fueron caracterizados por HPLC-MS (Agilent 1100 LC/MSD series). Las muestras disueltas en acetonitrilo (20 μ l) fueron inyectadas en una columna Lichrospher 100 RP-18, 5 μ m, 250 mm \times 4mm (Merck). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: solvente A, 0,5% ácido acético en agua (v/v); solvente B, ácido acético 0,5% (v/v) en H₂O:CH₃CN 20:80; gradiente de elución 40-100% en 40 min; flujo, 0,8 ml/min; detección, 254 nm. La identidad de cada pico fue determinada mediante el detector de masas electrospray acoplado al HPLC (ESI MS, *electrospray ionization mass spectrometry*), modo positivo (Morcelle *et al.*, 2006).

2.6. Proceso de inmovilización

2.6.1. Determinación de la actividad enzimática

Los ensayos de actividad enzimática fueron realizados usando PFLNA como sustrato. La actividad enzimática fue medida siguiendo el aumento de la absorbancia a 410 nm, que acompaña la liberación de p-nitroanilina. La actividad fue expresada en U_{PFLNA}/mg de proteína.

2.6.1. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Bradford.

2.6.1. Carga enzimática y rendimiento de inmovilización

Se midieron dos parámetros considerados esenciales en un proceso de inmovilización: rendimiento de inmovilización y capacidad de carga de un soporte (Illanes & Barberis, 1994).

$$R = \frac{EI}{EI + EL + EP} \times 100 = \frac{EI}{ET} \times 100$$

Donde EI = actividad de la enzima inmovilizada, EL = actividad de la enzima soluble en el sobrenadante de inmovilización, EP = actividad enzimática perdida y ET = actividad enzimática total contactada en el proceso de inmovilización.

2.6.1. Rendimiento de proteína

El rendimiento de proteínas (RP) queda expresado por la siguiente ecuación:

$$RP = \frac{PI}{PI + PL} = \frac{PI}{PT} = \frac{PT - PL}{PT}$$

Donde PI = proteína inmovilizada, PL = proteína libre y PT = proteína total.

Por su parte, la proteína inmovilizada se determinó por diferencia entre la proteína total y la libre.

2.6.1. Inmovilización de EC de *Araujia hortorum* en gel de agarosa

Debido a su elevado rendimiento en la inmovilización, conservación de actividad a lo largo de varios procesos y a su disponibilidad en el laboratorio se eligió finalmente agarosa 10 BLC (Hispanagar) previamente activada como soporte para la síntesis peptídica a ensayar. La inmovilización se realizó según lo explicado en este capítulo (*cfr.* 1.3) con el protocolo de activación de Guisán *et al.*, 1993.

2.7. Síntesis en medios orgánicos utilizando EC de *Araujia hortorum* libre como catalizador

El dipéptido de interés comercial seleccionado para la síntesis enzimática fue Z-Ala-Phe.OMe. Para la síntesis de este dipéptido en medios bifásicos se consideraron los siguientes aspectos : *a)* las preferencias de EC de *Araujia hortorum* en buffer. (Priolo *et al* 2000, 2001), *b)* el buen comportamiento de Phe.OMe como nucleófilo en reacciones de síntesis previamente estudiadas, *c)* la simplicidad estructural de dicho dipéptido, *d)* la existencia de un patrón comercial (que permite

simplificar las determinaciones analíticas por técnicas de HPLC) y *e*) el interés comercial de este producto por ser el precursor de un dipéptido amargo, de sabor a cafeína y, por ende, de utilidad en la industria alimenticia.

Las condiciones experimentales ensayadas fueron las siguientes:

Medios de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5)-hexano (50:50) buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5)-acetato de etilo (50:50)
Temperatura	37° C
Velocidad de reacción	160 rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20 mM)
Donantes de acilo	N- α -carbobenzoxy-Ala- <i>p</i> -nitrofenil éster (4 mM) N- α -carbobenzoxy-Ala.OH (4 mM)
Nucleófilo	Phe.OMe (4 mM)
Biocatalizador	EC de <i>Araujia hortorum</i> (1 mg/ml) (0,265 UI/mg de proteína) en dos formas: a) libre, en los siguientes medios: mezclas de buffer Tris-HCl (0,1 M, de pH 8,5) y hexano o acetato de etilo en relación 50:50 b) inmovilizado, en agarosa activada en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) y acetato de etilo 50:50

La selección de los sistemas bifásicos se llevó a cabo en función de las siguientes condiciones: *a*) la buena estabilidad de EC de *Araujia hortorum* en dichos medios bifásicos. (Quiroga *et al.*, 2005 a,b; Barberis *et al.*, 2006); *b*) a la mejor respuesta obtenida por parte de EC de *Araujia hortorum* en síntesis previas llevadas a cabo en medios bifásicos (dicha enzima fue incapaz de formar uniones peptídicas en medios miscibles y continuos con bajo contenido acuoso); *c*) a la elevada hidrofobicidad del producto de síntesis, lo cual permite desviar el equilibrio de la reacción hacia la síntesis por partición del producto en la fase orgánica.

La concentración del donante de acilo se calculó en base a los siguientes parámetros: *a*) la afinidad (K_m^{-1}) de la enzima por el donante de acilo; *b*) a su coeficiente de partición (*P*) el cual se define como la concentración de un componente en la fase orgánica dividida por su concentración en la fase acuosa.

De acuerdo a ello, una concentración de 4 mM fue 270 veces el valor de K_m (0,0148 mM) de EC de *Araujia hortorum* para el donante de acilo (N- α -carbobenzoxy-Ala-*p*-nitrofenil éster).

En todos los casos se ensayó la síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe OMe utilizando como sustratos Z-Ala-OH (N- α -carbobenzoxy-Ala.OH) y PheOMe.HCl bajo control cinético y N- α -carbobenzoxy-Ala-*p*-nitrofenil éster (Z-Ala-*p*No) y PheOMe.HCl bajo control termodinámico.