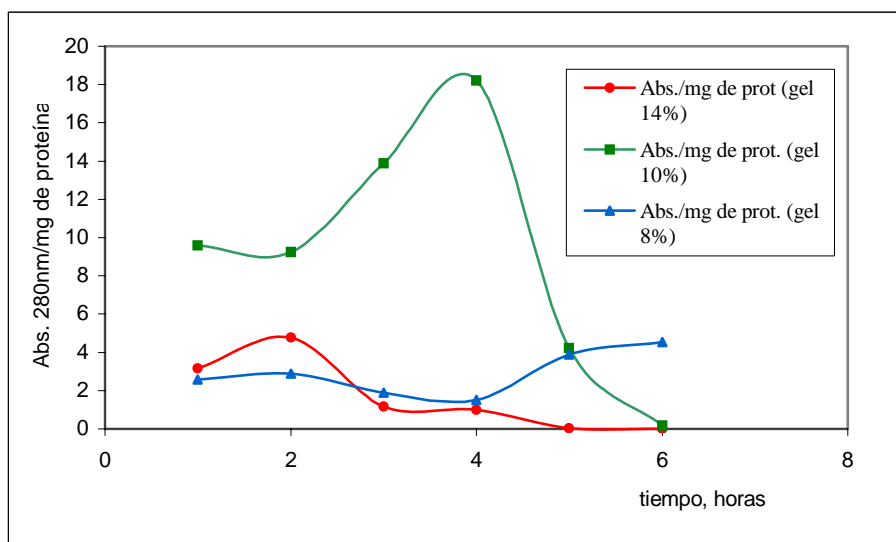


## INMOVILIZACIÓN EN DISTINTOS SOPORTES

### Entrampamiento en geles de poliacrilamida

Los resultados obtenidos en la inmovilización de enzimas por entrampamiento son mostrados en la Fig. 1. En base a los mismo se puede concluir que las proteasas presentes en el extracto crudo de *Araujia hortorum* pueden ser entrampadas en geles de poliacrilamida de distinto tamaño de poro y mantienen la actividad caseinolítica, siendo mayor la actividad cuando la concentración de poliacrilamida es del 10%.



**Figura 1.** Actividad caseinolítica de *Araujia hortorum* entrampada en geles de poliacrilamida de distinto porcentaje de monómero.

Para realizar los cálculos se tuvo en cuenta la actividad caseinolítica resultante calculando la absorbancia a 280 nm por mg de proteína entrampada.

### Inmovilización por adsorción en poliamida

Se determinó la cantidad de proteínas y la actividad caseinolítica del EC de *Araujia hortorum* luego de la liofilización. Para 0,65 mg de proteínas sobre 1 mg de sólido se obtuvo una actividad total de 0,06 UCAS, resultando una actividad específica de 0,1 UCAS/mg de proteína.

A fin de saber en qué medida quedaría afectada la actividad proteolítica por el proceso de inmovilización, se determinó la actividad específica del EC libre y adsorbido en

poliamida empleando PFLNA como sustrato. Luego del proceso de adsorción se recuperó 20-25 % de la actividad original, donde la actividad específica inicial de la enzima libre fue de 0,83 U<sub>PFLNA</sub>/mg de proteína y la actividad específica luego de la inmovilización fue de 0,20 U<sub>PFLNA</sub>/mg de proteína. Esta pérdida de actividad enzimática podría deberse a que las condiciones de adsorción sobre el soporte desnaturalizarían irreversiblemente a las proteasas presentes en los extractos.

La actividad de las preparaciones inmovilizadas (unidades internacionales, UI) fue ensayada también frente a distintos sustratos sintéticos cromogénicos tales como Z-Arg-pNA, Z-Phe-Arg-p-NA y BAPNA. Los resultados se muestran en la Tabla 1, en la que se puede apreciar que araujiaina mostró muy buena actividad con Z-Arg-pNA y BAPNA, pero la actividad fue prácticamente no detectable con Z-Phe-Arg-p-NA.

Sustrato	Actividad enzimática	<i>A. hortorum</i> (EC)
PFLNA	Actividad (UI/mg preparación inmovilizada)	0,013
	Actividad específica * (UI/mg proteína inmovilizada)	0,2
Z-Arg-p-NA	Actividad (UI/mg preparación inmovilizada)	3,3
	Actividad específica * (UI/mg proteína inmovilizada)	51
BAPNA	Actividad (UI/mg preparación inmovilizada)	2,8
	Actividad específica * (UI/mg proteína inmovilizada)	43
Z-Phe-Arg-p-NA	Actividad (UI/mg preparación inmovilizada)	n. d.
	Actividad específica * (UI/mg proteína inmovilizada)	n. d.

**Tabla 1. Unidades internacionales (UI) determinadas para el EC de *Araujia hortorum* frente a diferentes sustratos.** n. d.: no determinada. \* La actividad específica fue calculada asumiendo que toda la proteína presente en cada extracto pudo adsorberse sin perderse nada, debido a las drásticas condiciones del proceso completo.

Los resultados obtenidos de la determinación de actividad frente a los sustratos estudiados son alentadores en cuanto al uso de de las fitoproteasas adsorbidas en poliamida en diversos procesos biotecnológicos.

***Inmovilización por unión covalente a geles de agarosa activada***

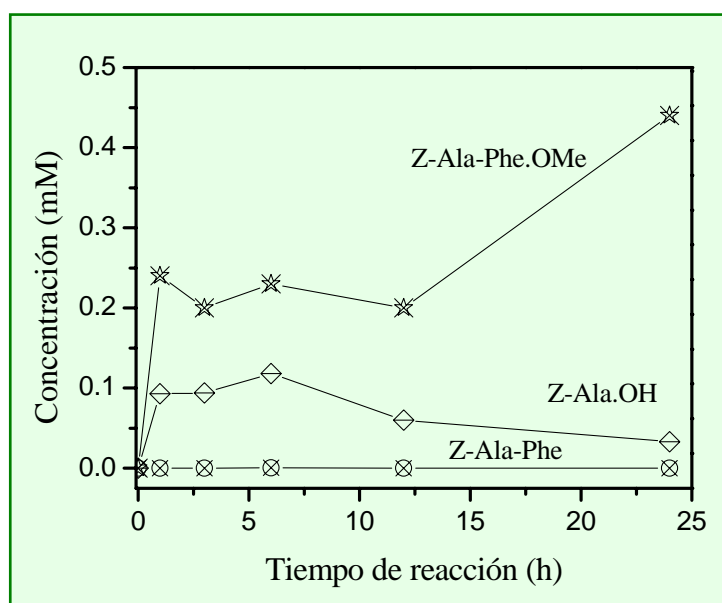
La actividad específica de la enzima inmovilizada fue de 0,032 U<sub>PFLNA</sub>, la actividad de la enzima soluble fue de 0,065 U<sub>PFLNA</sub> y el rendimiento de inmovilización fue del orden del 50%. Los resultados obtenidos fueron semejantes a los de poliamida, decidiéndose utilizar estos geles en las reacciones de síntesis, dada la estabilidad de este tipo de inmovilización.

## SÍNTESIS PEPTÍDICA

### 1) Utilizando enzima libre

#### Síntesis bajo control cinético

Cuando la síntesis bajo **control cinético** fue llevada a cabo en hexano al 50%, la mayor concentración del dipéptido se obtuvo luego de 24h, correspondiendo a un valor de 0,44 mM, lo cual equivale a un porcentaje de conversión en producto del 11% (Fig. 1).

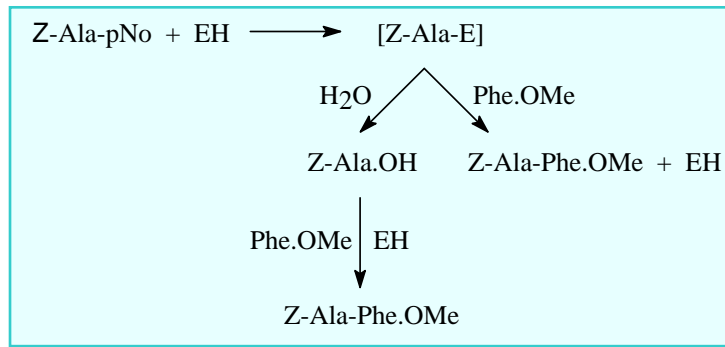


**Figura 1.** Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizado por EC de *Araujia hortorum*, utilizando Z-Ala-p-nitrofenil éster como donante de acilo en hexano 50%, en función del tiempo.

Cabe aclarar que el porcentaje de conversión ( $X_p$ ) representa la cantidad de producto obtenido en función del reactivo limitante y se calcula dividiendo la concentración Z-Ala-Phe.OMe (mM) por la concentración inicial del reactivo limitante.

En hexano al 50% (v/v), la concentración de Z-Ala.OH aumentó hasta las 6 h de reacción, pero luego disminuyó originando un aumento significativo en la concentración del dipéptido a las 24 h de reacción. Esto se debería a que en un comienzo el dipéptido es formado rápidamente a través del ataque nucleofílico de la Phe.OMe sobre el intermediario acil-enzima, pero luego el producto de hidrólisis del donante de acilo reaccionaría con el nucleófilo en una reacción bajo control termodinámico con el consiguiente aumento en la concentración del dipéptido.

A continuación se describe el esquema general de la reacción:



donde EH = enzima, Phe.OMe = nucleófilo. [Z-Ala-E] = intermediario acil enzima, Z = grupo protector amino terminal, N- $\alpha$ -CBZ, pNo = grupo protector carboxilo terminal, *p*-nitrofenil éster, Z-Ala-pNo = donante de acilo, N- $\alpha$ -CBZ-Ala-*p*-nitrofenol, Z-Ala.OH = producto de hidrólisis del donante de acilo, N- $\alpha$ -CBZ-Ala.OH y Z-Ala-Phe.OMe = producto de síntesis, N- $\alpha$ -CBZ-Ala-Phe.OMe.

Por su parte, en acetato de etilo (50% v/v), la máxima concentración del producto se alcanzó a las 30 min correspondiendo a un valor de 2,37 mM, lo cual equivale a un porcentaje de conversión en producto del 59,25% (Fig. 2).

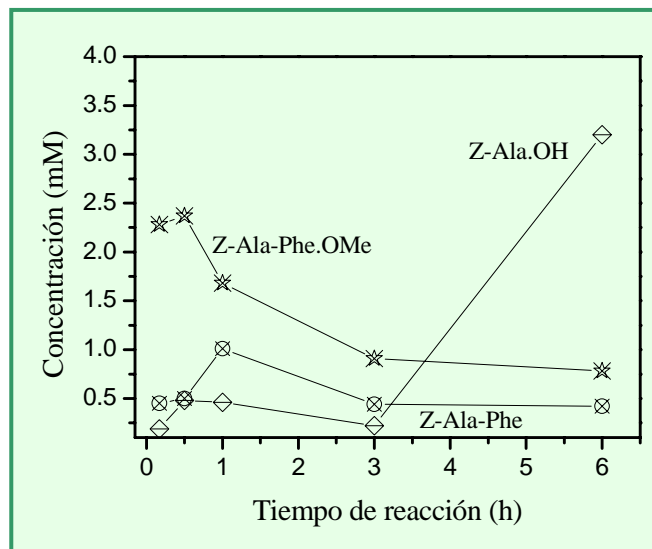


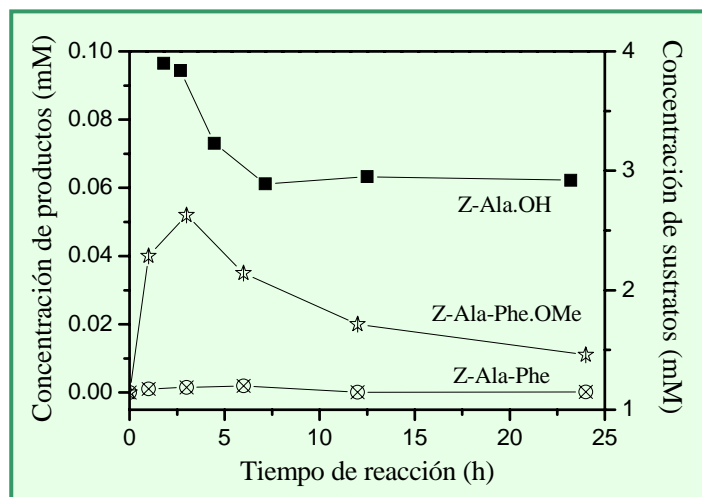
Figura 2. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizado por el EC de *Araujia hortorum*, utilizando Z-Ala-*p*-nitrofenil éster como donante de acilo en acetato de etilo 50%, en función del tiempo.

Como se puede observar, si bien se obtuvo mayor rendimiento en este medio, la hidrólisis del dipéptido fue también elevada (Quiroga *et al.*, 2008).

*Síntesis bajo control termodinámico*

Cuando el donante de acilo utilizado fue Z-Ala.OH, la síntesis peptídica transcurrió bajo **control termodinámico**.

La variación en el tiempo de la concentración de los diferentes componentes de la síntesis bajo control termodinámico en hexano 50%, se muestra en la Fig. 3.



**Figura 3. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizado por el EC de *Araujia hortorum*, utilizando Z-Ala.OH como donantes de acilo y Phe.OMe (4mM) en hexano 50%, en función del tiempo.**

Como puede observarse, la mayor concentración del dipéptido se obtuvo luego de 3 h, correspondiendo a un valor de 0,052 mM, lo cual equivale a un porcentaje de conversión en producto de 1,3%. Los porcentajes de conversión en producto fueron notablemente menores que aquellos obtenidos en las síntesis bajo control cinético. Además, a partir de la 3 h de reacción el producto peptídico comenzó a ser hidrolizado, con el consiguiente aumento observado en el perfil de concentración de Z-Ala.OH.

Cuando la síntesis bajo control termodinámico fue llevada a cabo en acetato de etilo (50%, v/v) se observaron rendimientos notablemente mayores que aquellos observados en hexano. La mayor concentración del dipéptido se obtuvo luego de 1 h de reacción correspondiendo a un valor de 2,5 mM, lo cual equivale a un porcentaje de conversión en producto de 62,25%. Los porcentajes de conversión en producto fueron mayores que aquellos obtenidos en las síntesis bajo control cinético. Además, a partir de la 3 h de reacción el producto peptídico comenzó a ser hidrolizado, con el consiguiente aumento observado en el perfil de concentración de Z-Ala.OH (Fig. 4).

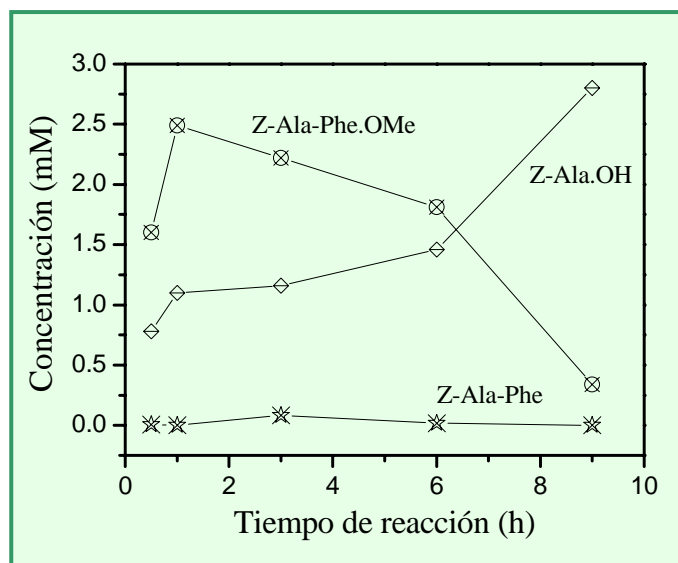


Figura 4. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizado por el EC de *Araujia hortorum*, utilizando Z-Ala.OH como donantes de acilo y Phe.OMe (4mM) en acetato de etilo 50%, en función del tiempo.

Las concentraciones y los porcentajes de conversión en producto fueron mucho mayores en acetato de etilo (50%) que en hexano (50%). Esto podría deberse a que en hexano el coeficiente de partición del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe es notablemente menor que en acetato de etilo ( $P_{\text{Hex}}$ : 1,3 y  $P_{\text{AcEt}}$ : 270). Por ello, la desviación del equilibrio hacia la síntesis se vió desfavorecida en hexano (50%), quedando el dipéptido expuesto a la hidrólisis secundaria no deseada.

Si comparamos entonces los resultados obtenidos en ambos medios bifásicos (Fig. 5),

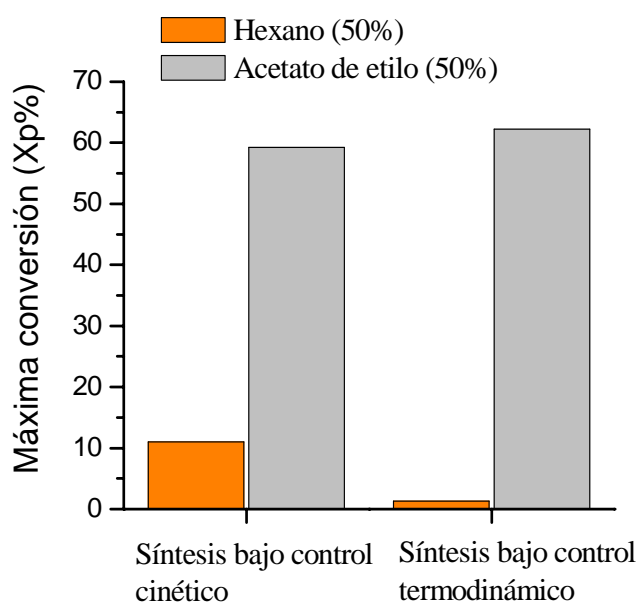


Figura 5. Esquema comparativo de la síntesis bajo control cinético y bajo control termodinámico en medio Hexano (50%) y Acetato de Etilo (50%) utilizando el EC de *Araujia hortorum*.

se observa claramente que el medio de reacción más favorable para la síntesis del dipéptido amargo es aquel formado por acetato de etilo y buffer (50:50).

## **2) Síntesis en medios orgánicos utilizando el EC de *Araujia hortorum* inmovilizado como catalizador**

Una de las mayores desventajas del uso de enzimas libre en la síntesis de péptidos es la imposibilidad de su reutilización. Al ser las enzimas solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por lo tanto, no se pueden reutilizar. Debido a ello, la inmovilización de enzimas han permitido superar estos últimos inconvenientes, haciendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

Teniendo en cuenta que la *unión covalente multipunto* es quizás el método más interesante desde el punto de vista industrial, es el más efectivo en términos de estabilización operacional y ofrece gran flexibilidad en cuanto al diseño del biocatalizador, y en base a los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento y a la estabilidad del sistema inmovilizado, que permite la reutilización de la enzima en diversos procesos sin pérdida apreciable de actividad, se decidió utilizar el EC de *A. hortorum* inmovilizado en forma covalente sobre gel de glioxil-agarosa como catalizador de la síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe en el medio bifásico acetato de etilo (50%).

Para llevar a cabo la síntesis del precursor del dipéptido amargo se respetaron las mismas condiciones de reacción utilizadas para la síntesis con la enzima libre. El medio de reacción seleccionado fue el medio formado por acetato de etilo y buffer (50:50) debido a que fue el medio en el cual se obtuvieron los mejores rendimientos cuando la reacción estuvo catalizada por la enzima libre.

### ***Síntesis bajo control cinético***

En la síntesis bajo control cinético (Fig. 6), la mayor concentración del dipéptido (2,23 mM) equivalente a un porcentaje de conversión en producto del 57,5%, se obtuvo luego de 1h de reacción. Hacia las 9h de reacción, la cantidad del péptido descendió debido a la formación del producto de hidrólisis de dicho péptido con una conversión en producto hidrolizado del 45%.

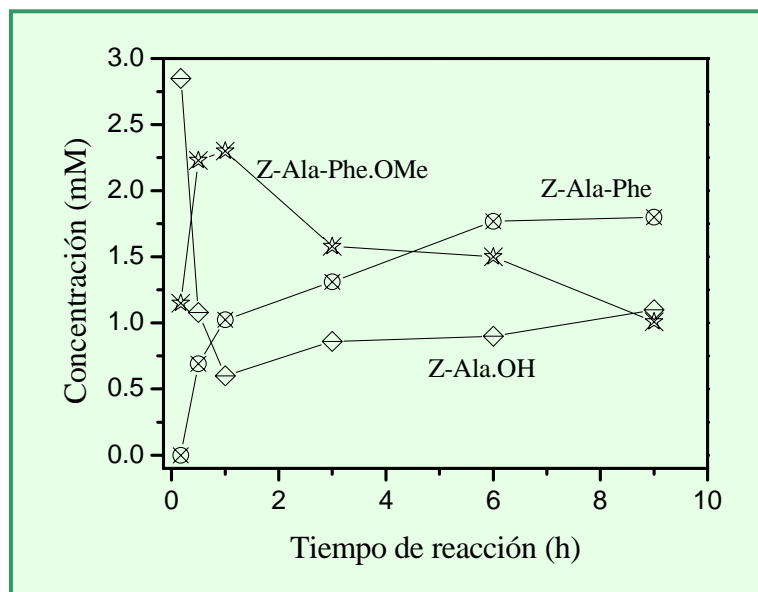


Figura 6. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizado por araujaína inmovilizada, utilizando Z-Ala-pNo como donantes de acilo y Phe.OMe (4mM) en acetato de etilo 50%, en función del tiempo.

### Síntesis bajo control termodinámico

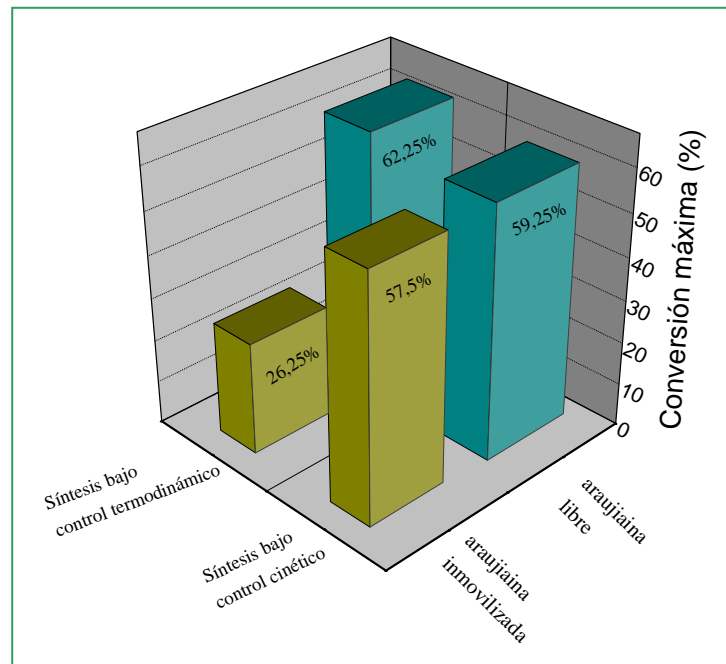
Cuando la síntesis se llevó a cabo bajo **control termodinámico**, el porcentaje de conversión en producto fue aproximadamente la mitad del valor obtenido anteriormente siendo 25,25% luego de 24h de reacción, sin observar una hidrólisis significativa del mismo.

Del análisis comparativo de los resultados obtenidos en la síntesis de Z-Ala-Phe.OMe en acetato de etilo (50% v/v), se puede concluir que tanto araujaína libre como inmovilizada fueron buenos biocatalizadores bajo las condiciones de reacción establecidas.

El mayor porcentaje de conversión en producto (62,25 %) se observó en la síntesis bajo control termodinámico, usando el EC de *Araujia hortorum* libre como catalizador, en acetato de etilo al 50% (v/v). Esto se debió a la favorable partición del dipéptido en la fase orgánica, la cual desvió el equilibrio de la reacción hacia la formación del producto de interés.

Cuando la síntesis fue llevada a cabo bajo control cinético se obtuvieron resultados similares, ya sea utilizando enzima libre o inmovilizada. Los porcentajes de conversión fueron 59,25 % y 57,5 %, respectivamente (Fig. 7).





**Figura 7.** Gráfico comparativo de los máximos porcentajes de conversión obtenidos en la síntesis bajo control cinético y termodinámico de Z-Ala-Phe.OMe, usando el EC de Araujia hortorum libre e inmovilizado en acetato de etilo 50%.

### Detección por HPLC-masas

Se procesaron las siguientes muestras a fin de confirmar los productos mediante HPLC masas:

- producto de la síntesis mediante enzima libre durante una hora de reacción por control termodinámico.
- Producto de la síntesis mediante enzima inmovilizada en agarosa durante 30 min por control cinético.
- Producto de la síntesis mediante enzima inmovilizada en agarosa durante 1 hora por control cinético
- Producto de la síntesis mediante enzima inmovilizada en agarosa durante 6 horas por control cinético

Se observó la aparición de un pico del producto esperado (Z-Ala-Phe-OMe) con un  $t_R$  de 23 min (muestras b, c y d). La identidad de dicho pico se corroboró por espectroscopía de masas (ES MS),  $[M+H^+ : 385,1]$ . También se detectó el reactivo Z-Ala-OH con un  $t_R$  de 12,7 min (muestra a) y se confirmó su identidad por ES MS  $[M+H^+ : 246]$ .