



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Centro de Investigación de Proteínas
Vegetales



**Caracterización del sistema
proteolítico de *Maclura pomifera* y su
aplicación en la obtención de
hidrolizados de soja con actividad
antioxidante**

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

Autora: Andrea Milagros Reyes Jara

Directora: Dra. Mariela Anahí Bruno

2015

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	3
1- Generalidades de las enzimas.....	4
<i>Tabla 1: Clasificación por Sistem EC</i>	5
2- Enzimas proteolíticas.....	5
2.1- Clasificación.....	6
2.2- Rol fisiológico en vegetales superiores.....	7
2.3- Proteasas del látex.....	8
2.4- Aplicaciones industriales.....	9
<i>Tabla 2: Enzimas de relevancia comercial</i>	10
3- <i>Maclura pomifera</i>	11
<i>Figura 1: Imagen de Maclura pomifera</i>	12
3.1- Sistema proteolítico presente en el látex.....	12
4- Soja.....	13
4.1- Proteínas de la soja: valor nutricional y funcional.....	14
5- Hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos	15
<i>Tabla 3: Efectos de los péptidos bioactivos en el organismo</i>	16
5.1- Actividad antioxidante.....	16
<i>Figura 2: Especies Reactivas de Oxígeno</i>	17
5.2- Antioxidantes en la industria alimenticia.....	18
5.3- Aminoácidos y péptidos antioxidantes.....	18
<i>Figura 3: Aminoácidos con actividad antioxidante y los grupos responsables</i>	19
OBJETIVOS	21
Objetivos generales.....	22

Objetivos específicos.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
<u>PARTE A:</u> Purificación y caracterización de enzimas presentes en el látex de frutos de <i>Maclura pomifera</i>	25
1- Material vegetal.....	25
2- Obtención de extracto crudo.....	25
3- Purificación parcial por precipitación con acetona.....	25
4- Purificación cromatográfica.....	26
4.1- Cromatografía de intercambio iónico.....	26
4.1.1- Preparación de las muestras.....	27
4.1.2- Intercambio catiónico.....	27
4.1.3- Intercambio aniónico.....	27
5- Isoelectroenfoque.....	28
5.1- Preparación de las muestras.....	28
5.2- Armado del gel.....	28
<i>Tabla 4: Composición del gel</i>	29
5.3- Siembra de muestras y patrones.....	29
<i>Tabla 5: Patrones de pI</i>	30
5.4- Condiciones de corrida.....	30
5.5- Fijación, tinción y decoloración de los geles.....	30
<i>Tabla 6: Solución Fijadora</i>	31
<i>Tabla 7: Solución Colorante</i>	31
<i>Tabla 8: Solución Decolorante I</i>	31
<i>Tabla 9: Solución Decolorante II</i>	31
5.6- Confección y análisis de densitograma.....	31
6- Determinación de concentración de proteínas.....	32
<i>Tabla 10: Composición de la solución colorante para el Método Bradford</i>	32

<i>Tabla 11: Mezcla de reacción empleada en el Método Bradford.....</i>	<i>32</i>
7- Determinación de actividad caseinolítica.....	33
8- Ensayo de actividad esterolítica con sustratos sintéticos.....	33
<i>Tabla 12: Mezcla de reacción para la determinación de actividad esterolítica.....</i>	<i>34</i>
8.1- Análisis de la cinética enzimática y cálculo de constantes.....	34
9- Espectrometría de Masas.....	35
9.1- Preparación de las muestras.....	35
9.2- Liofilización.....	35
9.3- Determinación del espectro de masas.....	36

PARTE B- Aplicación de un extracto parcialmente purificado del látex de *Maclura pomifera* en la obtención de péptidos de proteínas de soja con actividad antioxidante..... 36

1- Preparación de extractos parcialmente purificados por precipitación etanólica.....	36
2- Preparación del aislado de soja a partir de harina desgrasada.....	37
3- Obtención de hidrolizados de aislado proteico de soja.....	37
4- Análisis de los productos de hidrólisis.....	38
4.1- SDS-PAGE con tricina.....	38
4.1.1- Preparación de las muestras.....	38
<i>Tabla 13: Buffer de muestra para SDS-PAGE.....</i>	<i>38</i>
4.1.2- Armado del gel.....	39
<i>Tabla 14: Composición del gel 1.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 15: Composición del gel 2.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 16: Buffer de resolución.....</i>	<i>40</i>
4.1.3- Siembra de muestras y patrones.....	40
<i>Tabla 17: Patrones de peso molecular.....</i>	<i>41</i>
4.1.4- Condiciones de corrida.....	41
<i>Tabla 18: Composición del Buffer catódico.....</i>	<i>41</i>

<i>Tabla 19: Composición del Buffer anódico</i>	41
4.1.5- Fijación, tinción y decoloración de los geles.....	42
<i>Tabla 20: Solución Fijadora</i>	42
<i>Tabla 21: Solución Colorante</i>	42
<i>Tabla 22: Solución Decolorante</i>	42
4.2- Determinación de la concentración de péptidos.....	42
<i>Figura 4: Reacción de Folin-Ciocalteu</i>	43
4.3- Determinación del grado de hidrólisis.....	44
4.4- Fraccionamiento por filtración.....	45
4.5-Análisis cromatográfico de los hidrolizados.....	45
4.5.1- Cromatografía de exclusión molecular.....	45
4.5.2- Cromatografía en fase reversa.....	45
5- Búsqueda de actividad antioxidante.....	46
5.1- Ensayo de β -Caroteno.....	46
5.2- Ensayo del radical ABTS ⁺	47
5.3- Poder reductor.....	48
<i>Figura 5: Complejo Azul de Prusia</i>	49
<i>Tabla 23: Mezcla de reacción para determinación del poder reductor</i>	49
5.4- Método ORAC.....	50
5.5- Calculo de la IC ₅₀	50
5.6- Análisis estadístico.....	51
6- Determinación del espectro de masas y análisis bioinformático.....	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
<u>PARTE A</u> - Aislamiento de fitoproteasas a partir de látex y su caracterización bioquímica y cinética.....	53
1- Obtención y caracterización de los extractos crudos y parcialmente purificados.....	53
<i>Tabla 24: Esquema de purificación de los extractos</i>	53

2- Purificación cromatográfica de proteasas presentes en los extractos	55
2.1- Empleo de una columna de intercambio catiónico.....	55
<i>Figura 5: Cromatografía de intercambio catiónico de una muestra de PAR</i>	
<i>concentrada.....</i>	56
2.2- Empleo de una columna de intercambio aniónico.....	57
<i>Figura 6: Cromatografía de intercambio aniónico de una muestra de PAR</i>	
<i>concentrada.....</i>	57
3- Identificación y caracterización de las fracciones purificadas.....	58
3.1- Isoelectroenfoque y análisis de densitograma.....	58
<i>Figura 7: Isoelectroenfoque de las muestras colectadas por la CIC.....</i>	58
3.2- Medida de actividad caseinolítica y concentración de proteínas.....	59
<i>Tabla 25: Marcha de purificación de las proteasa.....</i>	60
3.3- Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF.....	61
<i>Figura 8: Ensayo de MALDI-TOF MS de la proteasa de pI alcalino.....</i>	61
4- Caracterización cinética de las proteasas purificadas.....	62
4.1- Cinética con N- α -CBZ-p-nitrofenil éster de alanina y cálculo de	
constantes cinéticas.....	62
<i>Figura 9: Cinética hiperbólica por ajuste con la Ec. de Michaelis-Menten.....</i>	63
<i>Figura 10: Cinética sigmoidea por ajuste con la Ec. de Hill.....</i>	65
4.2.- Ensayo de cinética con otros sustratos sintéticos probados.....	66
<u>PARTE B-</u> Obtención de un hidrolizado de proteína de soja con	
actividad antioxidante.....	66
1- Preparación y caracterización del extracto enzimático.....	66
<i>Tabla 26: Extracto parcialmente purificado con etanol: comparación de valores.....</i>	66
2- Reacción de hidrólisis del aislado de soja y caracterización de los	
productos.....	67
2.1- Condiciones de la reacción de hidrólisis.....	67
2.2- SDS-PAGE de los hidrolizados.....	67

<i>Figura 11: SDS-PAGE con tricina 13,5%T de los hidrolizados de soja.....</i>	68
2.3- Determinación del grado de hidrólisis.....	69
<i>Figura 12: Ensayo de TNBS.....</i>	69
2.4- Análisis cromatográfico de los hidrolizados.....	70
2.4.1- Cromatografía de fase reversa.....	70
<i>Figura 13: Cromatografía de fase reversa de los hidrolizados.....</i>	70
2.4.2- Cromatografía de exclusión molecular.....	71
<i>Figura 14: Cromatografía de exclusión molecular de los hidrolizados.....</i>	71
3- Búsqueda de actividad antioxidante.....	72
3.1- Método de β -caroteno.....	72
<i>Figura 15: Ensayo de β-caroteno de los hidrolizados.....</i>	72
3.2- Método del radical ABTS ⁺	73
<i>Figura 16: Ensayo del radical ABTS⁺ de los hidrolizados.....</i>	73
<i>Figura 17: Curva de calibración de Trolox.....</i>	74
3.2.1- Cálculo de la IC ₅₀	75
<i>Figura 18: Cálculo de la IC₅₀ por el método ABTS⁺ del hidrolizado de 90 min...</i>	75
3.2.2- Empleo de filtros con distinto tamaño de poro.....	75
<i>Figura 19: Ensayo del radical ABTS⁺ de las muestras filtradas.....</i>	76
3.2.3- Análisis del filtrado de 30 kDa por exclusión molecular.....	76
<i>Figura 20: Perfil cromatográfico del hidrolizado de 90 min filtrado con 30 kDa..</i>	76
<i>Figura 21: Ensayo del radical ABTS⁺ de las fracciones.....</i>	77
3.3- Ensayo de poder reductor.....	77
<i>Figura 22: Curva de calibración de cisteína.....</i>	78
<i>Figura 23: Medida de absorbancia a 700 nm y análisis estadístico con ANOVA.....</i>	78
3.4- Método ORAC.....	79
<i>Figura 24: Ensayo de ORAC del hidrolizado de 90 min filtrado y s/filtrar con 30 kDa.....</i>	79
4- Análisis por espectrometría de masas.....	80
<i>Figura 25A: MALDI-TOF MS de la muestra 90 min 30 kDa de 0-4 kDa.....</i>	80
<i>Figura 25B: MALDI-TOF MS de la muestra 90 min 30 kDa de 4-8 kDa.....</i>	81

<i>Tabla 27: Análisis de las masas obtenidas por MALDI.....</i>	82
CONCLUSIONES.....	84
PARTE A: Purificación y caracterización de una proteasa a partir del látex de <i>Maclura pomifera</i>	85
PARTE B: Obtención de péptidos con actividad antioxidante a partir de proteínas de soja empleando proteasas del látex de <i>Maclura pomifera</i>	85
BIBLIOGRAFÍA.....	87

AGRADECIMIENTOS

Gracias...

A mis papás por darme la educación y convicción para forjarme un mejor futuro.

A mi mamá por acompañarme y apoyarme durante todo este trayecto, por el aliento, por sus festejos y por las velitas prendidas.

A mi hermana mayor por todas las risas, cargadas y por bancarme en todo momento.

A mi hermana menor: “Querido diario mi hermana es muy molesta pero si no fuera por ella no tendría el último empujón para terminar esta etapa”.

A mi Directora por todo el cariño y paciencia con que me guió en este último tramo de mi carrera, por sus consejos de madre, por su dedicación y por ayudarme a abrirme camino en la investigación.

A Andrés y su familia, por todo el amor brindado y compañía en todo este tiempo.

A mi familia de Perú, que a la distancia siempre me brindaron su cariño y apoyo incondicional.

A mi tío, padrinos, Gloria y Ale, que estuvieron ahí en buenas y malas brindando su ayuda y alentando en todo momento.

A mis amigos bibliotences, por las tardes de estudio, los mates, las charlas del pasillo y nerdeadas.

A los integrantes del Ciprove y su director Néstor O. Caffini, por hacerme sentir dentro de una gran familia y por estar siempre dispuestos a darme una mano.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por brindarme la oportunidad de tener una formación profesional.

ABREVIATURAS

AAPH: 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro
ABTS: Ácido 2,2'-azinobis-(3-ethylBenzeThiazoline-6-Sulfonic)
AD: Agua Destilada
CIA: Cromatografía de Intercambio Aniónico
CIC: Cromatografía de Intercambio Catiónico
EC: Extracto Crudo
EDTA: Ácido etilen diamino tetraacético
EPP: Extractos Parcialmente Purificados
IEF: Isoelectroenfoque
MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionitation
CEM: Cromatografía de Exclusión Molecular
MS: Espectrometría de masas
NR: No Retenido
ORAC: capacidad de absorción de radicales de oxígeno (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”)
PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PAR: Precipitado Acetónico Redisuelto
PER: Precipitado Etanólico Redisuelto
pI: Punto Isoelectrico
PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro (“PhenylMethylSulfonyl Fluoride”)
PSA: Persulfato de amonio
CFR: Cromatografía de Fase Reversa
SDS: dodecilsulfato sódico (“Sodium Dodecyl Sulfate”)
TCA: Ácido triclorocético
TNBS: 2,4,6- TriNitroBenceno Sulfonato
TRIS: tris(hidroximetil)aminometano
TROLOX: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxilico
UCAS: unidad de actividad caseinolítica (“Caseinolytic Units”)

INTRODUCCIÓN

1)-Generalidades de las enzimas

La gran variedad de reacciones químicas que ocurren en los seres vivos está mediada casi en su totalidad por un conjunto de catalizadores biológicos denominados **enzimas**. Las enzimas intervienen en todas las rutas metabólicas que mantienen a las células vivas, desde la degradación de nutrientes y la transformación de energía química hasta la síntesis de nuevas biomoléculas a partir de precursores sencillos. Sin estos catalizadores las reacciones serían demasiado lentas para permitir el desarrollo de la vida. (Voet & Voet, 2006a).

Fue a mediados del siglo XIX que Luis Pasteur descubrió que el proceso de fermentación alcohólica del azúcar por las levaduras era realizado por una “fuerza vital” contenida en dichas células. Recién en 1897, Eduard Buchner, un químico alemán, logró extraer de las células de levadura las enzimas responsables y realizó el primer proceso fermentativo libre de células, motivo por el cual en 1907 recibió el Premio Nobel de la Química (Yúfera, 2007). Desde ese entonces hasta la actualidad se han aislado enzimas de distintas fuentes naturales como animal, vegetal y microbiana, y utilizado en el procesamiento de alimentos y en el desarrollo de nuevos fármacos.

A medida que las enzimas fueron aisladas y caracterizadas, surgió la necesidad de organizar toda la información respecto de su actividad. Se creó así, el sistema de nomenclatura y clasificación de enzimas establecido en 1961 por la Comisión de Enzimas (EC, “Enzyme Commission”) de la Unión de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, “Union of Biochemistry and Molecular Biology”) en el cual a cada enzima se le asigna un número, distinguiendo de este modo, seis clases cuya actividad específica se detalla en la Tabla 1.

Esta primer clasificación fue posteriormente amplificada por el Comité de Nomenclatura de la IUBMB (NC-IUBMB, 1984), otorgándole a cada enzima un número compuesto por 4 dígitos que describe de modo específico la reacción química catalizada, distinguiendo clase (1er dígito), subclase (2do dígito), sub-subclase (3er dígito) y sustrato (4to dígito), por ejemplo EC 4.2.1.1 para la anhidrasa carbónica (Caffini *et al.*, 2009). Se encuentra disponible la información sobre el NC-IUBMB accediendo a través del sitio: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

Tabla 1: Clasificación por el Sistema EC

CLASE	TIPO DE REACCIÓN CATALIZADA	EJEMPLOS
1- Oxidorreductasas	Reacciones de oxidorreducción	Deshidrogenasas
2- Transferasas	Transferencia de grupos funcionales	Aminotransferasas
3- Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis	Amilasas
4- Liasas	Eliminación/adición de grupos para formar/deshacer dobles enlaces	Piruvato descarboxilasa
5- Isomerasas	Isomerización	Cis-aconitasa
6- Ligasas	Formación de enlaces acoplada a la hidrólisis de ATP	ATP sintasa

(Fuente: “Bioquímica”. Voet & Voet, 2006b)

Actualmente la enzimas constituyen un importante tema de investigación en campos como la medicina debido a que están involucradas en muchas enfermedades, como el cáncer (Coussens *et al.*, 2002) y el mal de Alzheimer (Maccioni *et al.*, 2001), como consecuencia de un exceso o defecto en la actividad catalítica. Así también representan una poderosa herramienta por su gran especificidad de corte, velocidad de acción y versatilidad.

Es debido a las variadas aplicaciones de las enzimas en distintas áreas lo que ha mantenido el interés de los investigadores por ellas a lo largo de los años, y moviliza la búsqueda de nuevas fuentes de obtención, el desarrollo y la optimización de métodos de aislamiento y caracterización (Rábade *et al.*, 2011).

2)- Enzimas proteolíticas

Dentro de la clase 3, correspondiente a las hidrolasas, en la subclase 4 se encuentran las enzimas proteolíticas también denominadas **proteasas**, proteinasas o peptidasas. Estas enzimas se caracterizan por catalizar de modo específico la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas, generando la liberación de pequeños péptidos y aminoácidos (Barrett *et al.*, 2004). Estas enzimas se han empleado desde tiempos muy antiguos en un gran número de procesos biotecnológicos, como la elaboración de cerveza y quesos, la tiernización de carnes y la panificación, aun

cuando los mecanismos de acción de éstas no eran conocidos (Whitehurst & Law, 2002).

Actualmente las proteasas, que permanecen en el primer puesto en el mercado mundial de enzimas, juegan un rol importante para la industria biotecnológica, brindando mediante una reacción de proteólisis cambios en las propiedades químicas, físicas, biológicas e inmunológicas de las proteínas. (Torres *et al.*, 2010). La gran mayoría de ellas son obtenidas principalmente de fuentes microbianas, sin embargo en los últimos años las enzimas de origen vegetal han cobrado gran interés debido a su inocuidad y por ser activas en amplios rangos de temperaturas y pH, abriéndose paso en las industrias farmacológica y alimenticia (Rábade *et al.*, 2011).

2.1. Clasificación

El Sistema EC de clasificación de enzimas, si bien brinda mucha información sobre la reacción estudiada, no tiene en cuenta la existencia de grupos estructurales semejantes que reflejen las relaciones evolutivas de sus integrantes. Las proteasas difieren de casi todas las enzimas en que su especificidad por el sustrato resulta difícil de definir, razón por la cual en 1993 Rawlings y Barrett dieron las pautas para armar un nuevo sistema que reflejara las características estructurales esenciales y las relaciones evolutivas entre las mismas. Surgió así el Sistema MEROPS para la clasificación de proteasas, que agrupa las proteasas en familias según el porcentaje de homología de la secuencia aminoacídica del sitio activo, y las familias en clanes cuando provienen de un ancestro en común. La página donde se encuentra disponible esta información es <http://merops.sanger.ac.uk>, donde se describe la clasificación y nomenclatura de más de dos mil peptidasas registradas e información referida a sus inhibidores.

Las peptidasas pueden clasificarse, según su preferencia de corte, en endopeptidasas o exopeptidasas, teniendo en cuenta si rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína o remueven secuencialmente uno o más aminoácidos desde los extremos, respectivamente. Para ambos grupos existen subclasificaciones; las exopeptidasas se pueden dividir en aminopeptidasas, si clivan desde el extremo N-terminal, y carboxipeptidasas, si degradan desde el extremo C-

terminal; mientras que las endopeptidasas son subclasificadas de acuerdo a su mecanismo catalítico, que implica el rol de un aminoácido presente en el sitio activo de la enzima (Rábade *et al.*, 2011). La base de datos MEROPS considera siete familias de endopeptidasas: aspárticas, cisteínicas, glutámicas, metalopeptidasas, asparagínicas, serínicas y treonínicas. En plantas, han sido descritas solo cinco clases de endoproteasas: serínicas, cisteínicas, aspárticas, treonínicas y metalopeptidasas.

Cada una de las familias de proteasas mencionadas posee un mecanismo catalítico distintivo, pero aun así pueden agruparse en dos grandes categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (serínicas, cisteínicas y treonínicas), y las que no lo hacen (aspárticas y metalopeptidasas). Estos dos grandes grupos son catalíticamente muy diferentes ya que en las peptidasas serínicas, cisteínicas y treonínicas el nucleófilo del sitio catalítico es parte de un aminoácido (serina, cisteína y treonina, respectivamente), mientras que para las aspárticas y metalopeptidasas es una molécula de agua activada (Rawlings *et al.*, 2013).

2.2. Rol fisiológico en vegetales superiores

Las proteasas están involucradas en todos los procesos del desarrollo de las plantas: a) durante la germinación de las semillas, movilizandando las proteínas de reserva, b) durante el crecimiento y diferenciación, actuando en el recambio de proteínas (en el sistema ubiquitina/proteosoma), degradando las proteínas dañadas, mal plegadas y potencialmente dañinas; de este modo las células cuentan con una fuente de aminoácidos libres, requeridos para la síntesis de nuevas proteínas, y c) en los procesos de senescencia, reciclando los componentes celulares (Buchanan *et al.*, 2000).

Por otro lado, las proteasas también están involucradas en actividades regulatorias a partir de modificaciones postraduccionales, mediante la proteólisis limitada en sitios altamente específicos, generando por ejemplo la activación de proenzimas, el control de la actividad enzimática, el ensamblaje apropiado de proteínas y su direccionamiento hacia distintos compartimientos celulares, y la generación de proteínas y péptidos reguladores (Schaller, 2004). Las proteasas también desempeñan un papel clave en la regulación de otros procesos biológicos como el reconocimiento de agentes patógenos y plagas, y en la eficaz inducción de una

respuesta de defensa (Domsalla & Melzig, 2008).

De este modo es que las proteasas están involucradas en todos los aspectos del ciclo de vida de las plantas, desde la germinación hasta la senescencia, y solo después de comprender su rol fisiológico en los distintos órganos de las plantas se puede pensar en una correcta manipulación y utilización de estas enzimas en los distintos procesos de interés.

2.3. Proteasas del látex

Considerando el número de funciones que desempeñan las proteasas en las plantas, es lógico pensar que son ubicuas, o sea, que están presentes en todo el órgano vegetativo. En general, se encuentran en cantidades relativamente bajas y son frecuentemente difíciles de detectar si no se emplean sustratos muy sensibles. Sin embargo, algunas especies vegetales poseen gran concentración de proteasas en ciertos tejidos. Un ejemplo de ello, es el **látex** obtenido a partir de plantas de diversas familias en el que las enzimas proteolíticas superan el 50% de las proteínas totales. En estos casos, la actividad enzimática es al menos dos órdenes de magnitud superior a la encontrada en otros tejidos (Liggieri *et al.*, 2009).

El látex es una suspensión o emulsión acuosa compuesta por diversos tipos de partículas (como alcaloides, almidones, azúcares, proteínas, aceites, taninos, resinas y gomas), que es transportado dentro de células vivas. Las estructuras que contienen el látex se denominan laticíferos y pueden estar formados por una única gran célula polinucleada o varias células dispuestas en serie. De acuerdo a su origen, los laticíferos pueden variar en anatomía y distribución, pudiendo estar o no ramificados, dispersos por todo el tejido o acompañando al floema (Peña Alonso, 2011).

Cuando las plantas son injuriadas, exudan látex de modo transitorio hasta que se forma un coágulo entorno al área afectada. Este proceso de coagulación resulta vital para crear una barrera física de defensa contra el ataque de patógenos. Muchos de estos cambios en el látex tienen lugar de forma concomitante con variaciones drásticas en la actividad proteolítica, lo que sugiere la participación de éstas enzimas durante la formación del coágulo (Torres *et al.*, 2012).

En la actualidad, se han identificado y estudiado proteasas del látex de importantes familias vegetales, como Asteraceae, Caricaceae, Moraceae, Asclepiadaceae, Apocynaceae y Euphorbiaceae, siendo las de mayor aplicación industrial: la papaína y la ficina, proteasas extraídas del látex de los frutos de *Carica papaya*, de la familia Caricaceae y *Ficus carica* o *F. glabrata*, de la familia Moraceae (Rábade *et al.*, 2011).

Aunque inicialmente las proteasas vegetales se emplearon en preparaciones crudas o parcialmente purificadas, hoy en día, hay disponibles con un mayor grado de purificación y con propiedades nuevas u optimizadas, gracias a la utilización de técnicas de ingeniería genética. Probablemente, en el futuro se podrán ver nuevas proteasas con propiedades sólo insinuadas actualmente; para ello es importante continuar con la búsqueda de nuevas fuentes, entre las cuales el látex es un medio muy prometedor debido a la alta actividad proteolítica que presenta y la facilidad de extracción (Feijoo-Siota & Villa, 2011).

2.4. Aplicaciones industriales

Las aplicaciones industriales representan más del 80% del mercado global de enzimas, siendo éstas usadas tanto en procesos en los cuales la conversión enzimática de la materia prima en el producto es la operación central, como en aquellos casos en que la enzima es empleada como aditivo para mejorar la funcionalidad del producto al que es agregada (Barrett *et al.*, 2004). Dentro de las hidrolasas de mayor interés se encuentran las enzimas proteolíticas, que representan casi las dos terceras partes de las enzimas que son comercializadas en el mercado mundial estimado en 3 billones de dólares (Leary *et al.*, 2009).

Las proteasas son utilizadas en un gran número de procesos industriales, pudiendo participar en distintas etapas. Entre las aplicaciones más recientes se pueden mencionar su incorporación a detergentes biodegradables, la obtención de proteínas modificadas (hidrolizados proteicos) con destino a la industria alimentaria, la manufactura de cueros y el tratamiento de desechos industriales con alta concentración proteica, como por ejemplo los desechos de las industrias avícola y pesquera (Aehle,

2006). Algunos ejemplos de distintas áreas de aplicación de enzimas comerciales, de las cuales muchas de ellas son proteasas, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Enzimas de relevancia comercial		
Industria	Enzimas	Usos
Láctea	Tripsina – Lactasa	Enmascara el gusto a óxido. Fabricación de leche deslactosada, evita la cristalización de leche concentrada.
Quesería	Quimosina (renina) – Lactasa – Lipasa	Coagulación de las proteínas de la leche (caseína). Influencia en el sabor y aceleración de la maduración.
Helados	Lactasa – Glucosa-isomerasa	Evita la textura “arenosa” provocada por la cristalización. Permite la utilización de jarabes de alta fructosa.
Cárnicas	Papaína – Fiscina – Bromelina	Ablandamiento de carnes. Producción de hidrolizados.
Panificación	Amilasa – Proteasa – Lipoxidasa – Lactasa	Mejora la calidad del pan. Disminuye la viscosidad de la pasta. Produce una miga muy blanca. Mejora la coloración de la superficie.
Cervecería	Amilasas – Papaína – Pepsina	Usadas para licuar la pasta de malta. Evitan la turbidez durante la conservación de ciertos productos.
Vinificación	Pectinasas - Glucosa-oxidasa	Mejoran la clarificación y extracción de jugos. Evitan el oscurecimiento y los sabores desagradables.
Bebidas no alcohólicas	Pectinasas – Glucosa-isomerasa – Tannasa – Glucosa-oxidasa	Mejoran la clarificación de jugos. Conversión de la glucosa en fructosa (jarabes de alta fructuosa). Aumenta la solubilidad y disminuye la turbidez del té. Evita el oscurecimiento y los sabores desagradables.
Fuente: “Industrial enzyme applications”. Kirk <i>et al.</i>, 2002		

La utilización de enzimas en los modernos procedimientos de fabricación de alimentos presenta una serie de ventajas, tanto de índole económica como tecnológica. La especificidad de la acción enzimática hace que no se produzcan reacciones laterales adversas. Se puede trabajar en condiciones moderadas evitándose la alteración de los componentes lábiles del alimento. Sus características permiten un control de calidad más estricto, por ejemplo, en la industria alimenticia americana, las enzimas requieren obtener el estatus de GRAS (Generally Recognized as Safe) de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), lo cual no es muy difícil, si la fuente de la que provienen es de un producto natural y comestible como frutas y otros vegetales (Valles *et al.*, 2009).

Esto abre inmensas posibilidades en la exploración y explotación de nuevos recursos naturales que permitan enriquecer el amplio espectro de enzimas proteolíticas aptas para aplicar en las industrias alimentarias. En nuestro país, la totalidad de las proteasas empleadas en la industria se importa, por lo que obtenerlas a partir de especies de nuestra flora implicaría un importante ahorro de divisas y contribuiría a la generación de nuevas fuentes de trabajo. La biodiversidad vegetal ha sido muy poco analizada en este sentido; el número de proteasas vegetales que han sido aisladas y caracterizadas es aún muy bajo.

3)- *Maclura pomifera*

Maclura pomifera (Raf.) Schneid., es una especie arbórea de la familia Moraceae nativa de América del Norte, donde se la conoce como “Naranja de los Osages” (Osage Orange), y ampliamente cultivada en toda la región templado-cálida de nuestro país, donde se la emplea para formar cercos vivos y con fines ornamentales. *M. pomifera* es un árbol espinoso, que florece en primavera y madura en verano-otoño, multiplicándose por semillas. El fruto es un sincarpio esférico, rugoso, verde-amarillento, de 10 a 15 cm de diámetro. Se encuentra formado por la concrecencia de múltiples y pequeñas drupas, que contienen en su superficie conductos laticíferos.



Figura 1: Imagen de *Maclura pomifera*. (1) Imagen del árbol. (2) Detalle del fruto. (3) Corte longitudinal que evidencia la presencia látex en los frutos.

Estos frutos no son comestibles, pero algunos animales, como las ardillas, disfrutan las pequeñas semillas enterradas dentro de su pulpa. Cuando éstos caen, pueden generar mucha suciedad y, por esta razón, se suelen seleccionar árboles masculinos estériles, incluso, si se desea, existen disponibles cultivares sin espinas. Actualmente, tanto los frutos, como el tronco, corteza y raíces de *M. pomifera* son objeto de estudio por contener muchos compuestos con alto valor potencial en la elaboración de alimentos, tintes, fabricación de pesticidas, entre otras aplicaciones (Saloua *et al.*, 2009).

3.1- Sistema proteolítico presente en el látex

Como se mencionó anteriormente, los frutos de *M. pomifera* producen látex, al igual que otras especies de la misma familia (como las del género *Ficus*). Este látex presenta elevada actividad proteolítica, descrita por primera vez por Tauber (1949), quien denominó “pomiferina” a todo el conjunto enzimático. Los resultados obtenidos al ensayar pomiferina frente a diferentes activadores e inhibidores han permitido establecer que esta preparación contiene **endoproteasas serínicas** que no son calcio dependientes (López & Lazza, 2009).

Muchas proteasas de tipo serínico muestran preferencia por la hidrólisis de enlaces peptídicos adyacentes a una clase particular de aminoácido. Así, la tripsina

rompe preferentemente los enlaces peptídicos situados a continuación de aminoácidos básicos, como la arginina y la lisina, mientras que la quimiotripsina hidroliza enlaces peptídicos que se encuentran a continuación de aminoácidos con anillos hidrofóbicos, como el triptófano y la fenilalanina (Devlin, 2004).

De igual modo que la quimiotripsina, se determinó que pomiferina también muestra preferencias al momento del corte, clivando con mayor frecuencia las uniones peptídicas en las que el aminoácido que aporta el grupo carboxilo es de naturaleza no polar y/o de pequeño tamaño, como Ala, Gly y Leu y en menor grado Phe y Val (Corrons *et al.*, 2012). La variación de la actividad proteolítica en función del pH es similar a la que muestran la mayoría de las proteasas serínicas, que poseen máxima actividad a pH alcalino (entre 9 y 10 para la caseína) y una buena estabilidad térmica, que permite conservar hasta el 88% de la actividad luego de 2 hs de preincubación a 55 °C (López *et al.*, 1989).

Hasta la fecha, han sido caracterizados por varios autores muchos metabolitos secundarios de esta especie, como compuestos fenólicos y flavonoides con propiedades antioxidantes (Tsao *et al.*, 2003). Sin embargo, no son tantos los trabajos que discuten acerca de su capacidad de proteólisis. Las características que demostró pomiferina sugieren la posibilidad de utilizarla en la industria alimenticia, pero para ello es necesario ampliar el estudio de su actividad frente a distintas fuentes proteicas como la leche, donde hay trabajos reportados en coagulación y generación de hidrolizados (Corrons *et al.*, 2012; Corrons, 2012; Bertucci, 2012), y la soja, muy utilizadas en la industria (López *et al.*, 1998).

4- Soja

La soja (*Glycine max*) es una planta leguminosa originaria de Asia del este que se usa en la alimentación humana como fuente de proteínas desde hace más de 2000 años. Se cultiva ampliamente en nuestro país desde la década del 70', cuando surgió como una opción productiva para la alimentación animal, hasta la actualidad donde tiene múltiples aplicaciones en la industria alimenticia y representa el principal producto exportado del país. Con 49 millones de toneladas anuales, la Argentina se posiciona en el tercer puesto en la producción mundial (después de Estados Unidos

con 80 millones y Brasil con 60 millones), convirtiéndose en una especie de gran importancia económica (datos suministrados por la Dirección de Información Agrícola y Forestal, dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación - campaña 2012/13; sitio web visitado en marzo de 2015

<http://www.sgp.gob.ar/dno/sitio/ministerios/agricultura/agricultura.html>).

4.1- Proteínas de la soja: valor nutricional y funcional

Al igual que toda semilla de leguminosa, los porotos de soja constituyen una rica fuente de proteínas, contienen aproximadamente un 40-50% de proteínas, un 20-30% de aceites y un 26-30% de carbohidratos, respecto de su peso seco (Gibbs *et al.*, 2004). Estas proteínas pueden ser clasificadas en cuatro grupos principales sobre la base de sus velocidades de sedimentación, obteniéndose las fracciones: 2S, 7S, 11S y 15S. De éstas, las más abundantes (70 %) son las globulinas: glicinina (11S) de 350 kDa y β -conglucina (7S) de 150 - 200 kDa, son proteínas multiméricas compuestas por subunidades formadas por polipeptidos de 20 a 42 kDa unidos por puentes disulfuro (Medrano *et al.*, 2011).

El uso de **proteína de soja** como ingrediente funcional en los alimentos ha generado gran aceptación debido a sus múltiples beneficios para la salud y a su bajo costo. Fue en 1999 que la FDA declaró que el consumo de 25 g diarios de proteína de soja reduce el riesgo de padecer enfermedades cardíacas. El mercado es muy sensible a este tipo de declaraciones, por lo tanto, muchas empresas aprovecharon la oportunidad para incorporar derivados de soja en sus productos. De este modo, la soja y sus derivados penetraron rápidamente en la cultura y en la dieta occidental (Fukushima, 2011).

Entre los beneficios del consumo de proteínas de soja se pueden mencionar que aportan un buen balance en la composición de aminoácidos (comprendiendo a todos los esenciales) y que contienen componentes fisiológicamente beneficiosos que han demostrado bajar el colesterol y reducir el riesgo de hiperlipidemia además de enfermedades cardiovasculares (Nishinari *et al.*, 2014). Otro tipo de aplicaciones hacen uso de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de soja (solubilidad, viscosidad, etc.) para su uso como gelificante, emulsionante y espumante, las cuales no sólo son

importantes en la determinación de la calidad del producto final, sino también en facilitar su procesamiento (Fukushima, 2011).

Entre los tratamientos que se le realizan a las proteínas de soja para su uso, la obtención de hidrolizados es uno de los más utilizados, cuyo empleo se extiende desde su uso como suplementos, mejorar la textura de un producto, remover olores y sabores, y componentes no nutritivos o tóxicos (Marinova *et al.*, 2008), hasta otras aplicaciones más recientes, como la obtención de péptidos bioactivos.

5- Hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos

En la actualidad los **hidrolizados de proteínas** se utilizan, ampliamente en tecnología alimentaria no solo por sus propiedades nutricionales sino también por sus propiedades funcionales, como ya se mencionó. Normalmente la elección de la fuente proteica a utilizar en el proceso de hidrólisis se realiza en función del uso final que vaya a tener el hidrolizado y del valor añadido conseguido con respecto al sustrato de partida. Así, para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes se suele emplear colágeno, mientras que para su uso como fuente de nitrógeno, se emplean proteínas de pescado y microbianas en alimentación animal, y proteínas de soja y lácteas en alimentación humana (Guadix *et al.*, 2000).

En los últimos años se ha reconocido que las proteínas de la dieta también proporcionan una rica fuente de péptidos biológicamente activos o **péptidos bioactivos**. Se trata de fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones o condición del cuerpo y pueden influenciar en la salud (Kitts & Weiler, 2003). Estos péptidos, que se encuentran inactivos dentro de la secuencia de la proteína de origen, pueden ser liberados por tres vías: por hidrólisis enzimática por parte de proteasas digestivas (pepsina y enzimas pancreáticas), por el procesamiento del alimento (químico o físico) y por proteólisis por enzimas derivadas de otras fuentes (Korhonen *et al.*, 2006).

Existen numerosos trabajos que reportan distintos efectos generados en el organismo debido a la ingesta de estos péptidos (Tabla 3). Esta actividad, que depende directamente de la secuencia aminoácídica del péptido, se debe, por ejemplo, a una estimulación de la fagocitosis en macrófagos y proliferación de linfocitos (Alvarado &

Guerra, 2010), a una inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), involucrada con el aumento de la presión sanguínea (Basso *et al.*, 2005), y a la generación de poros en la membrana plasmática de microorganismos, provocando la filtración de los componentes celulares (Tiwari *et al.*, 2009) entre otros.

Tabla 3: Efectos de los péptidos bioactivos en el organismo	
Sistema Cardiovascular	Antihipertensivo
	Antioxidativo
	Antitrombótico
	Hipocolesterolémico
Sistema Digestivo	Antimicrobiano
	Antioxidativo
	Anorexígeno
	Transportador de iones
Sistema Inmune	Citomodulatorio
	Inmunomodulatorio
Sistema Nervioso	Agonista de receptores de opiodes
	Antagonista de receptores de opiodes
(Fuente: Korhonen & Pihlanto, 2006)	

Es por esto que en los últimos años se ha despertado un gran interés por la incorporación de estos péptidos en formulaciones de alimentos, para promover la salud humana mediante la reducción del riesgo de contraer enfermedades crónicas o estimulando el sistema inmunológico natural (Korhonen & Pihlanto, 2006).

5.1- Actividad antioxidante

Un **antioxidante** se define como: cualquier sustancia que, estando presente en baja concentración en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Medrano *et al.*, 2011). La actividad antioxidante es importante para el organismo, ya que la oxidación se trata de un proceso degradativo, inevitable en todos los seres vivos, provocado principalmente por radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS).

Las ROS pueden generarse endógenamente como producto del metabolismo: en condiciones normales las células transforman la mayor parte del oxígeno (95%) en agua pasando por una serie de especies reducidas del oxígeno con alta reactividad; sin embargo, un pequeño porcentaje ($\approx 5\%$) del oxígeno captado por las mitocondrias se escapa en forma de estos intermediarios tóxicos (Figura 2A). Este porcentaje puede ser influenciado por un incremento de la actividad metabólica, generándose una mayor cantidad de sustancias oxidantes. Por otro lado, las ROS también pueden generarse exógenamente: debido a agentes externos como la contaminación ambiental, la luz solar, las radiaciones ionizantes, y compuestos como el alcohol, tabaco, alimentos grasos, pesticidas y metales pesados, entre otros (Christen *et al.*, 2000).

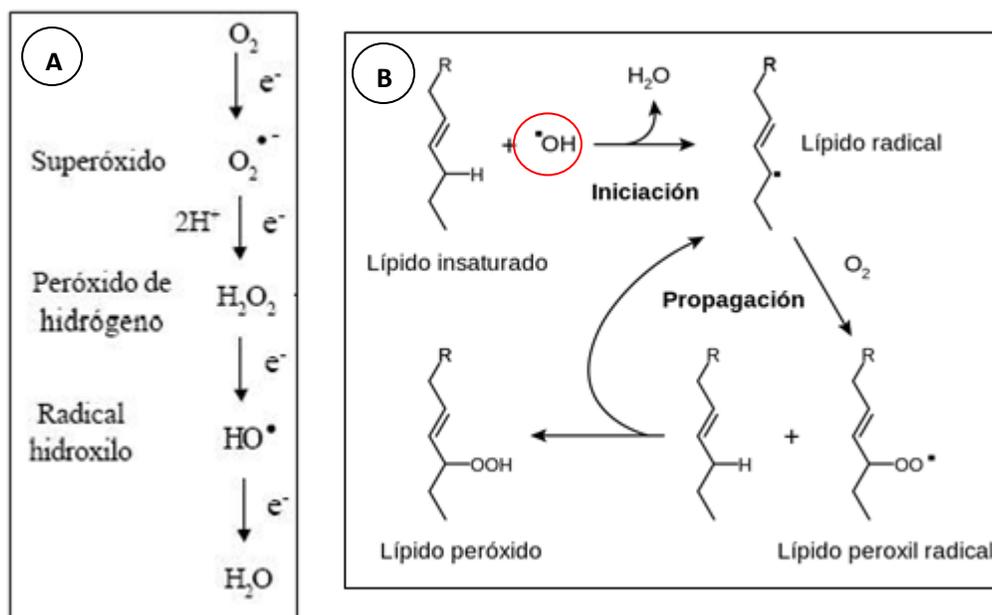


Figura 2: Especies reactivas de oxígeno (ROS). A- Generación de ROS por reducción de O_2 a H_2O . B- Proceso de peroxidación lipídica.

Dentro del organismo, las ROS son capaces de oxidar biomoléculas como proteínas y lípidos de membranas, dando lugar al desarrollo de enfermedades y acrecentando los efectos del envejecimiento. Aunque el organismo cuenta con barreras propias de defensa contra el estrés oxidativo, como son la presencia de enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, si éstas son superadas puede dar lugar a la generación de desórdenes (Reyes *et al.*, 2011). Entre las más de

cien enfermedades degenerativas existentes se pueden mencionar aterosclerosis, artritis, isquemia, daño en el sistema nervioso central y enfermedades respiratorias (Bhalodi *et al.*, 2008). Toda esta evidencia constituye el motivo por el cual se promueve el consumo de alimentos con actividad antioxidante.

5.2- Antioxidantes en la industria alimenticia

Además de estar involucrados en la salud humana, las ROS representan uno de los principales problemas de la industria alimenticia. Durante las etapas de procesamiento, preparación y almacenamiento de alimentos se producen procesos como la peroxidación lipídica (Figura 2B) donde las ROS atacan los ácidos grasos poliinsaturados y generan compuestos que alteran el aspecto, el gusto y el olor del producto (Arcila *et al.*, 2004). Para prevenir este deterioro y extender su vida útil, las empresas utilizan antioxidantes sintéticos, como el butil hidroxitolueno (E-321) y butil hidroxianisol (E-320) (Martinez *et al.*, 2001). Sin embargo, la demanda de **antioxidantes naturales** ha aumentado recientemente debido a cuestionamientos por parte del consumidor, sobre posibles efectos negativos a largo plazo de los aditivos sintéticos (Yu *et al.*, 2002).

La actividad antioxidante de proteínas, péptidos y aminoácidos ha sido ampliamente estudiada, desde su primer reporte por Marcuse (1960). Existen numerosos artículos recientes sobre la actividad protectora que ofrecen las fracciones proteicas y péptidos de la leche, huevos, cerdo, pescado, legumbres y semillas oleaginosas, como la soja. Por lo cual, está bajo investigación la utilización de proteínas de distintas fuentes o sus hidrolizados, con el objeto de producir nuevas preparaciones con actividad antioxidante, que puedan utilizarse tanto como conservantes naturales como para la formulación de un alimento funcional (Moure *et al.*, 2006).

5.3- Aminoácidos y péptidos antioxidantes

Entre los aminoácidos responsables de la actividad antioxidante que exhiben muchos péptidos descriptos, se pueden mencionar tirosina, triptófano, fenilalanina,

histidina, metionina y cisteína (Figura 3). En negro se muestran los grupos involucrados en tal actividad (Wang *et al*, 2007).

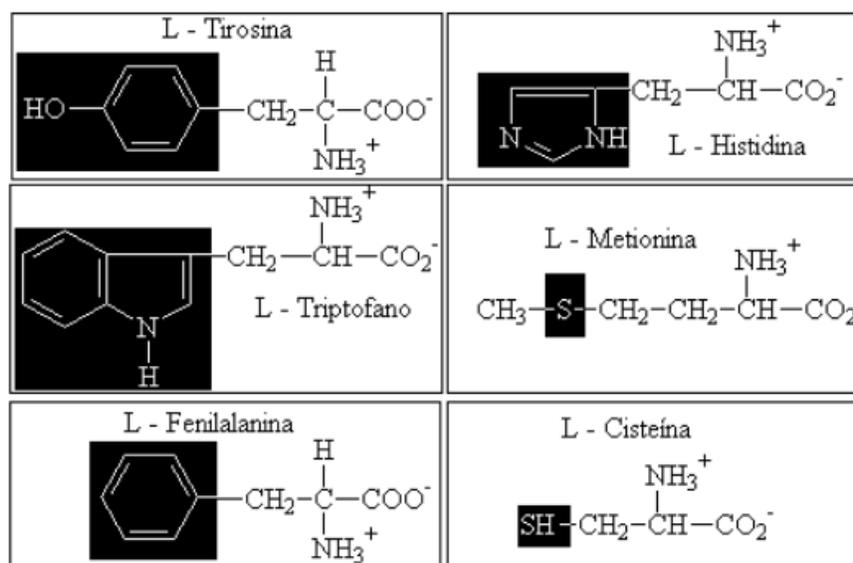


Figura 3: Aminoácidos con actividad antioxidante y los grupos responsables (en negro).

La actividad antioxidante de los tres primeros se debe a la capacidad de los grupos fenólicos e indólicos, para actuar como donadores de hidrógeno. Los nuevos radicales generados (aminoácido radical) son mucho más estables y poseen un tiempo de vida media más largo comparado con los simples radicales peróxidos. De esta manera cualquier reacción directa o de propagación en cadena es inhibida. La histidina exhibe una fuerte actividad antioxidante debido a que puede actuar tanto como agente quelante de metales (Fe^{+3} , Cu^{+2} , etc.), los cuales actúan como catalizadores en la peroxidación lipídica, como descomponer su anillo imidazólico para inhibir la oxidación (Wang *et al*, 2007). Por otro lado, la metionina es un aminoácido sulfurado muy propenso a la oxidación, generándose metionin-sulfóxido y reduciendo al radical (Korhonen & Pihlanto, 2006).

Se han estudiado hidrolizados de proteínas alimentarias de diversas fuentes con el propósito de hallar péptidos con actividad antioxidante. Los resultados fueron positivos en hidrolizados de proteínas lácteas (Kitts & Weiler, 2003), proteínas de huevo (Sakanaka, 2006), y proteínas de garbanzo y soja (De Mejía & De Lumen, 2006), entre otras, empleando proteasas como la PSG de origen bacteriano

(*Streptomyces griseus*), la Flavourzyme de *Aspergillus oryzae*, un hongo muy utilizado en cocina japonesa (Medrano *et al.*, 2011), y otras de origen vegetal como papaína (Abu-Salem *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

La asignatura Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la carrera de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular constituye una instancia formativa para el estudiante donde las actividades propuestas deben involucrar el abordaje de un sistema/problema de estudio, un análisis crítico de la situación/estado, el recorrido por diferentes métodos aplicados a la resolución del mismo, un análisis de los resultados obtenidos y la extracción e interpretación de las conclusiones. El trabajo debe desarrollarse en el área de interés académico/profesional del estudiante, en un tiempo estipulado por el plan de estudios bajo la guía de un director.

Objetivos generales

En el presente Trabajo Final se busca obtener extractos proteolíticamente activos a partir del látex extraído de los frutos de la especie *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid (Moraceae), realizar su caracterización y emplearlos en la preparación de hidrolizados de aislado proteico de soja con la finalidad de obtener péptidos con actividad antioxidante. También se intentará llevar a cabo la purificación de una de las proteasas presentes en el látex y realizar su caracterización bioquímica y cinética.

Objetivos específicos

- Obtener Extractos Crudos (EC) y Parcialmente Purificados (EPP) a partir de látex de frutos de *Maclura pomifera*.
- Determinar las características de los EPP para su aplicación en procesos de hidrólisis de proteínas alimentarias.
- Purificar cromatográficamente peptidasas de los EPP y determinar sus características bioquímicas y cinéticas.
- Preparar un aislado proteico a partir de harina de soja y obtener hidrolizados empleando el EPP.

- Establecer una puesta a punto de las condiciones de hidrólisis monitoreando el perfil peptídico mediante electroforesis y grado de hidrólisis
- Realizar una búsqueda de actividad antioxidante en los hidrolizados proteicos empleando distintos métodos disponibles.
- Caracterización de los hidrolizados de interés por técnicas cromatográficas y espectrometría de masas.

MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE A- Purificación y caracterización de enzimas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera*

1- MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid (Moraceae) procedentes de la ciudad de La Plata, recolectados en el período Marzo-Abril de 2013 y 2014. Los frutos se extrajeron del mismo árbol, se eligieron de tamaño medio (15 cm de diámetro, aproximadamente) y sin lesiones aparentes. Para evitar la pérdida de látex se cortaron las ramas enteras con los frutos unidos a ellas, y éstos sólo fueron desprendidos de las mismas en el momento de llevar a cabo la extracción del látex.

2- OBTENCIÓN DE EXTRACTO CRUDO

A partir del material recolectado, se extrajo el látex realizando incisiones longitudinales en la superficie de los frutos (limpios y secos) y colectando las gotas que brotan de ellos con pipeta Pasteur sobre 100 ml de buffer fosfato 0,1 M y EDTA 5 mM de pH 6,6 en baño de hielo. Con una probeta se calculó el volumen de látex recolectado por diferencia y se diluyó el extracto con agua destilada (AD) hasta un volumen final de 160 ml. A continuación se realizó una clarificación por centrifugación a 4 °C durante 30 min a 16000 g. Se descartó el pellet y un sobrenadante (suspensión blanquecina en la parte superior del sobrenadante) y se colectó el líquido transparente. A esta preparación se la denominó Extracto Crudo (EC) y fue posteriormente fraccionada y almacenada a -20 °C.

3- PURIFICACIÓN PARCIAL POR PRECIPITACIÓN CON ACETONA

La técnica consiste en disminuir la solubilidad de las proteínas presentes, por un cambio en la polaridad del medio utilizando un solvente orgánico, el cual accede al interior de las proteínas y altera las interacciones hidrofóbicas provocando su desnaturalización (Lehninger *et al.*, 2005). De este modo, luego de una centrifugación, al descartar el sobrenadante se eliminan las sustancias indeseadas, pudiendo repetir el procedimiento tantas veces como se considere necesario, alternando con cambios en el

pH o fuerza iónica.

Se realizó un primer paso de purificación proteica del EC, utilizando acetona fría en una proporción 1:1. Se colocaron en tubos eppendorf 500 µl de acetona y 500 µl de EC, se agitaron para que entren en contacto y se incubaron en el freezer a -20 °C durante 30 min. Luego se centrifugaron a 16000 g y 4 °C otros 30 min, se descartó el sobrenadante y se colocaron boca abajo sobre papel absorbente para escurrir el solvente residual. Los restos de acetona fueron evaporados empleando una bomba de vacío durante 30 min a temperatura ambiente. Se conservaron estos tubos en el freezer, para ser resuspendidos al momento de utilizarlos con el mismo volumen que el inicial (500 µl) del buffer de partida, pudiendo concentrarlos si fuera necesario empleando un volumen menor de solvente. Esta preparación se denominó Precipitado Acetónico Redisuelto (PAR).

4- PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

Las técnicas cromatográficas son métodos de separación cuyo objetivo es fraccionar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificarlos y determinar sus cantidades relativas. Para ello se hace uso de las diferencias fisicoquímicas de las moléculas presentes en la muestra a tratar, como por ejemplo la afinidad por distintos grupos orgánicos, carga neta y tamaño, entre otras (Lenhinger, 2004).

El objetivo de esta etapa es purificar alguna de las proteasas presentes en las muestras de PAR, y posteriormente realizar una caracterización cinética y bioquímica de las mismas; el equipo empleado fue un ÄKTA Purifier (Amersham Biosciences).

4.1- Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico (catiónico o aniónico) se basa en un intercambio de cationes o aniones respectivamente entre la fase estacionaria y la fase móvil. Se utiliza una columna cuyo relleno (fase estacionaria) presenta expuestos sobre su superficie grupos con carga neta a los cuales se van a adherir de modo reversible aquellas moléculas de la muestra con carga opuesta. Así las proteínas cargadas negativamente serán retenidas por una matriz cargada positivamente y viceversa,

siendo eluidas las restantes (sin carga o de igual carga que la columna). Para esto es muy importante la elección del buffer de elución (fase móvil) que va a generar la carga de la matriz y de las proteínas de la muestra.

Al contar con información referente a los valores de pI (puntos isoeléctricos, Corrons *et al.*, 2012) de las proteínas del látex, se elige el pH adecuado para el buffer de elución buscando purificar aquellas fracciones con actividad y que se encuentren en mayor proporción. Se trabajó con dos tipos de columnas, una de intercambio catiónico y otra de intercambio aniónico.

4.1.1- Preparación de las muestras

Las muestras a utilizar se prepararon resuspendiendo 4 tubos de PAR en 1 ml del buffer de elución. Posteriormente la muestra fue centrifugada 1 min a 16000 g (para remover los agregados proteicos) y conservada en hielo hasta el momento de inyectarla en la columna (sobrenadante).

4.1.2- Intercambio catiónico

Se utilizó la columna Hi-Trap SP-HP (Sulpho Propyl Sepharose High Performance) de 5 ml. La corrida se realizó en 3 etapas consecutivas: primero, se equilibró con 2 volúmenes de columna (VC) con el buffer de elución TRIS-HCl 0,05 M de pH 8,2; luego, una vez alcanzado este pH en la columna se inyectaron 500 µl del PAR concentrado; por último, se eluyeron las fracciones proteicas con un gradiente lineal de NaCl (0 - 1,0 M) en 8 VC con una velocidad de flujo de 1 ml/min y detectando la señal a 215 nm (absorbancia de los enlaces peptídicos), 280 nm (absorbancia de los aminoácidos con anillos aromáticos) y 330 nm (absorbancia de los compuestos fenólicos). Por último, las diferentes fracciones fueron colectadas por separado, rotuladas y conservadas en freezer a -20 °C.

4.1.3- Intercambio aniónico

Se utilizó la columna Hi-Trap Q-HP (Quarternary Ammonium Salt High Performance) de 5 ml. El protocolo fue semejante al utilizado para la columna catiónica: se equilibró la columna con buffer cítrico- citrato 0,02 M de pH 5,8; al llegar

a ese pH en la columna se sembraron 500 µl de PAR concentrado, y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 - 1,0 M) en 10 VC a velocidad de flujo de 1ml/min. Las diferentes fracciones fueron detectadas a 215, 280 y 330 nm, colectadas por separado, rotuladas y almacenadas en freezer a -20 °C.

5- ISOELECTROENFOQUE

La técnica de isoelectroenfoque (IEF) permite obtener un perfil proteico de las muestras analizadas en base a su carga neta. Las proteínas se desplazan en el gel, donde se crea una diferencia de potencial y un gradiente de pH, migrando hacia el ánodo o hacia el cátodo de acuerdo a su carga inicial y deteniéndose en el punto en el cual neutralizan su carga neta. De este modo, utilizando patrones puede determinarse el valor de pI de la muestra. Para el IEF se utilizó una Mini IEF Cell, Mod. 111 (Bio-Rad).

5.1- Preparación de las muestras

Para el ensayo las muestras deben tener una concentración de proteínas cercana a 1 mg/ml y estar disueltas en agua bidestilada. Debido a que las muestras que se van a analizar provienen de las columnas de intercambio iónico, éstas deben ser desionizadas y concentradas. Se precipitaron las muestras (1 ml) con 4 volúmenes de acetona (proporción 1:4) y se llevaron al freezer de -20 °C por 30 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 16000 g por otros 30 min; luego se colocaron boca abajo para escurrir el excedente de líquido y se eliminaron los restos de acetona con bomba de vacío. Finalmente fueron resuspendidos en un volumen final de 20 µl con agua bidestilada.

5.2- Armado del gel

Los geles fueron confeccionados empleando la bandeja formadora de geles del equipo. Primero se adhirió la cara hidrofóbica de la película plástica (Gel Bond para poliacrilamida, Bio-Rad) al vidrio, empleando una gota de agua destilada para hacer el contacto y el conjunto se invirtió sobre la bandeja. Segundo, se preparó el gel: se mezclaron los cuatro primeros componentes que figuran en la Tabla 4, se desgasificó la

mezcla en kitasato y luego se agregaron el TEMED y el PSA para iniciar la polimerización. Tercero, se tomaron 5 ml con pipeta y se introdujeron entre el Gel Bond y la bandeja formadora de geles, en una sola aplicación procurando no dejar burbujas. Las placas se cubrieron con papel aluminio y se dejaron gelificar toda la noche sobre la mesada. Pasado este tiempo, se retiró la placa de vidrio y se levantó el Gel Bond con el gel ya formado sobre una de sus caras.

Tabla 4: Composición del gel

Acril-Bis (49,5% T , 3% C)	0,5 ml
Glicerol 25% v/v	1 ml
Agua bidestilada	3,25 ml
Anfolitos 3-10	0,25 ml
--- Desgasificar 1 min ---	
TEMED	3 μ l
PSA 10% p/v	30 μ l
Volumen final	5,03 ml

5.3- Siembra de muestras y patrones

Se depositaron (con pipeta Eppendorf de 20 μ l) 5 μ l de cada una de muestras en los puntos de siembra, separados entre sí por al menos 1 cm de distancia. Se utilizó el kit Amershan de GE Healthcare como patrones de pI (Tabla 5). Una vez hecho esto, se colocó el Gel Bond sobre los electrodos de grafito (dentro del equipo de IEF), previamente humedecidos con agua bidestilada, de modo que estén en contacto con el gel para generar la diferencia de voltaje necesaria.

Tabla 5: Patrones de pI

Patrones	pI
Aminoglucosidasa	3,5
Rojo de Metilo	3,75
Inhibidor de Tripsina de soja	4,55
β -lactoglobulina A	5,20
Anhidrasa carbónica bovina B	5,85
Anhidrasa carbónica humana B	6,55
Mioglobina de caballo- banda acética	6,85
Mioglobina de caballo- banda básica	7,35
Lectina ácida	8,15
Lectina media	8,45
Lectina básica	8,65
Tripsinógeno	9,3

5.4- Condiciones de corrida

Una vez ubicado el gel, la celda se cerró herméticamente y se conectaron los electrodos a la fuente de poder. El enfoque se realizó en 3 etapas a voltaje constante: 1°) 100 V durante 15 min. 2°) 200 V durante 15 min. 3°) 450 V durante 60 min.

5.5- Fijación, tinción y decoloración de los geles

Una vez finalizada la corrida se desconectaron los electrodos, se separó el gel de poliacrilamida unido al Gel Bond de los electrodos y se sumergió 30 min en una solución fijadora (Tabla 6). Finalizada esta etapa, el gel se trató 2 h con una solución colorante (Tabla 7) y luego se decoloró por tres lavados sucesivos con la solución decolorante I (Tabla 8), seguidos de un último lavado con la solución decolorante II (Tabla 9) hasta obtención de un fondo incoloro.

Tabla 6: Solución Fijadora

Ácido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 ml
Ácido tricloroacético	12,5 g
AD	hasta 100 ml

Tabla 7: Solución Colorante

Sulfato de cobre	0,5 g
Ácido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	40 mg
AD	hasta 100 ml

Tabla 8: Solución Decolorante I

Sulfato de cobre	0,5 g
Ácido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
AD	hasta 100 ml

Tabla 9: Solución Decolorante II

Ácido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
AD	hasta 100 ml

5.6- Confección y análisis de densitograma

A partir de la imagen escaneada de los geles revelados se obtiene su densitograma utilizando el programa Image J 1.48v que permite confeccionar el gráfico: intensidad de coloración en función de la distancia recorrida en el gel por las

proteínas de la muestra. De este modo, usando las bandas correspondientes a los patrones, se determinan los valores de pI de las proteínas detectadas.

6- DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se empleó el método de Bradford (1976) que se basa en la formación de un complejo colorante-proteína de absorbancia máxima a 595 nm. Se utilizó como reactivo una solución del colorante Coomassie Blue G-250, que en estado libre presenta una coloración rojiza y una absorbancia a 465 nm, mientras que en el complejo la absorbancia se corre a 595 nm y la coloración se torna azul. Los componentes de la solución se agregaron en el orden que figura en la Tabla 10. De acuerdo al rango de detección de concentración de proteínas a analizar, se empleó el método macrométrico o micrométrico de Bradford. La mezcla de reacción para cada caso se detalla en la Tabla 11.

Tabla 10: Composición de la solución colorante

1°) Etanol Soria	25 ml
2°) Ácido fosfórico al 85%	50 ml
3°) Coomassie Brilliant Blue G-250	50 mg
4°) AD	hasta 500 ml

Tabla 11: Mezcla de reacción empleada en el Método Bradford

Método Macrométrico (0,1 – 1 mg/ml)		Método Micrométrico (10 – 100 µg/ml)	
Muestra	50 µl	Muestra	250 µl
Rvo. Bradford	2,5 ml	Rvo. Bradford	2,5 ml

Se colocaron los reactivos en tubos Khan de vidrio, se taparon y mezclaron con vórtex, se esperó 10 min y se llevó a cabo la lectura a 595 nm en cubeta de vidrio de 1 cm de paso utilizando un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453. Se realizó triplicado de todas las muestras y se utilizó como curva de calibración diluciones de

albúmina bovina (10, 25, 40, 80, 100, 250, 400, 800, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y agua destilada para el blanco de reacción.

7- DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CASEINOLÍTICA

La técnica permite detectar actividad proteolítica sobre caseína bovina y cuantificarla. Para esto se preparó primero una solución de caseína al 1% p/v en buffer TRIS-HCl 0,05 M de pH 9, pesando 1 g de caseína y disolviendo en 100 ml del buffer; esta preparación se llevó a ebullición por 20 min, luego de lo cual se agregó 0,2423 g de cisteína (20 mM) y se filtró con papel en caliente. Para la reacción se colocaron 100 μl de la muestra y 1,1 ml de la solución de caseína, se dejó actuar 2 min en baño termostático a 37 °C y se detuvo la reacción por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% p/v. A continuación los tubos fueron centrifugados a 2500 g durante 30 min, determinándose la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm en cubeta de cuarzo de 1 cm de paso. Los blancos se realizaron invirtiendo el orden de los reactivos: se agregó la muestra de extracto enzimático seguida del TCA de manera de inactivar a las enzimas antes de contactarse con el sustrato y por último se adicionó la caseína. En todos los casos las determinaciones se hicieron por triplicado (Bruno *et al.*, 2010). La actividad se expresó como unidades caseinolíticas/ml (Ucas/ml), que considera la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm al cabo de un minuto.

8- ENSAYO DE ACTIVIDAD ESTEROLÍTICA CON SUSTRATOS SINTÉTICOS

La utilización de sustratos sintéticos del tipo N- α -carbобензохи-p-nitro-fenil ésteres de L-aminoácidos, en los cuales están bloqueados tanto el grupo α -NH₂ como el α -COOH del resto aminoacídico (en el último caso con un grupo cromóforo), permite la determinación de la actividad endoesterásica relativa respecto al aminoácido que aporta el grupo carboxilo. Para este trabajo se utilizó el sustrato N-carbобензохи-p-nitrofeniléster de alanina (Sigma Chem. Co), ya que en trabajos previos los extractos parcialmente purificados demostraron tener una preferencia de corte por él (Corrons *et al.*, 2012).

Se preparó el sustrato 10 mM en acetonitrilo en un frasco caramelo y se realizaron una serie de diluciones de modo de abarcar un amplio rango de concentraciones (0,05 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2,5 – 5 – 8 – 10 mM). Para cada una de ellas se hizo un control negativo con agua destilada. Se utilizó el buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8 con el agregado de EDTA 2 mM. El ensayo se llevó a cabo a 37 °C y el progreso de la reacción fue seguido midiendo la absorbancia del producto liberado a 405 nm a intervalos de 5 s durante 3 min (Silverstein, 1974). Se agregaron los reactivos en la cubeta de vidrio según el orden que figura en la Tabla 12, se mezcló rápidamente pipeteando el volumen y se procedió a la lectura. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

Tubo de reacción	Muestra	Blanco
1°) Buffer	1,85 ml	1,85 ml
2°) Muestra enzimática	0,1 ml	-
3°) AD	-	0,1 ml
4°) Sustrato	50 µl	50 µl

El resultado de la actividad endoesterásica se expresó en una unidad enzimática arbitraria, Ucbz, definida como la cantidad de peptidasa que libera 1 µM de p-nitrofenol por min, en las condiciones de ensayo (Obregón *et al.*, 2006).

8.1- Análisis de la cinética enzimática y cálculo de constantes

Se graficó la velocidad de reacción a cada concentración, representando las pendientes (proporcionales a la velocidad de la reacción) en función de la concentración de sustrato y se analizaron los datos con el programa SigmaPlot (Scientific Data Analysis and Graphing Software) versión 10.0 para encontrar su correlación con los modelos de cinética conocidos: cinética hiperbólica (modelo tipo Michaelis-Menten) o cinética tipo sigmoidea. A partir de esta determinación se

buscaron las constantes cinéticas: velocidad máxima (V_{max}) y constante de afinidad (K_M).

9- ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que permite determinar con exactitud la relación masa/carga (m/z) de los iones en la fase gaseosa (donde m es la masa del ión y z la carga). Sin embargo hasta alrededor de 1985 las macromoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos no podían analizarse por MS. Esto se debía a que el método por el cual el espectrómetro de masas producía los iones en fase gaseosa (vaporización por calentamiento seguida por ionización por bombardeo de electrones) destruía las macromoléculas. Sin embargo el desarrollo de nuevas técnicas eliminó éste obstáculo. Una de ellas es la Desorción/Ionización de la Matriz Asistida por Láser (MALDI). En esta técnica la macromolécula se incrusta en la matriz cristalina de un compuesto orgánico de escaso tamaño molecular e es irradiada por pulsos cortos e intensos de luz láser de longitud de onda absorbida por el material de la matriz pero no por la macromolécula. La energía absorbida por la matriz eyecta las macromoléculas intactas de su superficie a la fase gaseosa, en general con una carga +1, que en las moléculas más grandes puede ser de +2, +3, etc. Se acopla a este sistema un detector de iones (TOF, de sus siglas en inglés *Time-Of-Flight*) (Voet & Voet, 2006c).

9.1- Preparación de las muestras

Se colectaron los picos, de las cromatografías de intercambio iónico correspondientes a cada enzima, en eppendorf que contenían 10 μ l del inhibidor irreversible de proteasas serínicas: fluoruro de fenil metil sulfonilo (Phenyl methyl Sulfonyl Fluoride, PMSF) a 50 mM. Se colectó 1ml de cada pico de modo de tener el inhibidor en una concentración final de 0,5 mM. Posteriormente las muestras fueron liofilizadas.

9.2- Liofilización

Se envolvió cada tubo (sin tapa) de las muestras recolectadas en papel aluminio y se llevó a freezer de -80 °C por 15 min. Luego, se hicieron pequeñas aberturas con la

punta de un tip en la parte superior y se introdujeron en un recipiente adecuado para hacer vacío, se conectó al equipo liofilizador (Mod. L-T4, Rificor) ya estabilizado previamente y se dejó por 24 h, a una temperatura de -50 °C y presión de 0,022 mmHg.

9.3- Determinación del espectro de masas

Las muestras de los picos purificados fueron remitidas al Centro de Estudios Químicos y Biológicos (CEQUIBIEM) perteneciente a la Cátedra de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) para ser analizadas por un equipo de MALDI-TOF MS.

PARTE B- Aplicación de un extracto parcialmente purificado del látex de *Maclura pomifera* en la obtención de péptidos de proteínas de soja con actividad antioxidante

1- PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PARCIALMENTE PURIFICADOS POR PRECIPITACIÓN ETANÓLICA

Se colocó en tubos Falcon 15 ml de EC y 15 ml etanol a -20 °C, es decir, una relación 1:1 en volumen que se ha comprobado anteriormente que conserva tanto la mayor actividad como la máxima recuperación de proteínas (Bertucci, 2012). Estos tubos se incubaron en el freezer a -20 °C durante 30 min. Luego se centrifugaron a 16000 g y 4 °C otros 30 min, se descartó el sobrenadante y se colocaron boca abajo sobre papel para escurrir el líquido. Los restos de etanol fueron evaporados empleando una bomba de vacío (el solvente remanente disminuye la actividad enzimática). Se añadió, en baño de hielo, 15 ml de buffer fosfato 0,1 M (pH 6,6, EDTA 5 mM) de manera de obtener el mismo volumen de partida. A esta preparación se la denominó Precipitado Etanólico Redisuelto (PER).

2- PREPARACIÓN DEL AISLADO DE SOJA A PARTIR DE HARINA DESGRASADA

Se partió de una harina desgrasada de soja (empresa Bunge Argentina), cuya desolventización, evaporación de hexano (de grado alimenticio) con el que fue extraído el aceite, se realizó a temperatura ambiente. Este sustrato, que se conoce como harina desgrasada activa, no está en condiciones para el consumo directo (se requiere un tratamiento a 130 °C por 30 s), sin embargo al tratarse de un material de alta solubilidad proteica, es muy utilizado para la obtención de aislados y concentrados de soja.

Se adaptó el protocolo utilizado por Peña-Ramos & Xiong (2002); para ello se colocaron 5 g de harina de soja desgrasada activa en 50 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 8,0 con NaOH 2 N y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12800 g durante 15 min a 20 °C y se descartó el precipitado. El sobrenadante obtenido se llevó a pH 4,5 con HCl 2 N. Luego de un segundo paso de centrifugación, se obtuvo un precipitado que fue redisolto en 10 ml de agua destilada y llevado a pH 8,0.

3- OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE AISLADO PROTEICO DE SOJA

Para el proceso de hidrólisis se utilizaron 4 ml de PER y 36 ml de aislado de soja (diluido 1/10) de modo de mantener la proporción 1:9 (enzima: sustrato). La reacción se realizó a 45 °C en agitación constante. Se tomaron alícuotas a 10, 30, 60, 90, 120 y 180 min para analizar los péptidos generados, la reacción se detuvo por shock térmico (7 min a 100 °C). Se prepararon en paralelo tres tubos para los blancos: el blanco de sustrato, con 9 ml del aislado diluido y 1 ml de agua destilada; el blanco de la enzima, con 1 ml de PER y 9 ml de agua destilada, y el blanco de la mezcla de reacción, con 1 ml de enzima seguido de 9 ml de sustrato (t= 0 min) inactivando previamente ambos componentes 7 min a ebullición.

4- ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS

4.1- SDS-PAGE con tricina

La técnica de electroforesis permite separar los distintos componentes presentes en una muestra compleja según sus distintas velocidades de migración en un soporte poroso al aplicarles un voltaje, lo que es proporcional a la relación carga/masa de cada molécula. Se usa frecuentemente la poliacrilamida para la confección del gel, ya que se trata de un material inerte que permite regular el tamaño de poro variando su concentración. El SDS (Dodecil Sulfato de Sodio), un detergente aniónico, genera el despliegue de las proteínas y al unirse a ellas les otorga carga; las proteínas de mayor tamaño retienen más detergente en su estructura. El SDS junto al β -mercaptoetanol, un agente reductor que rompe los puentes disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, permiten separar los péptidos presentes por tamaños (García-Pérez, 2000). La tricina es un compuesto orgánico con carga altamente negativa, que provoca un aumento de la fuerza iónica en el gel disminuyendo el desplazamiento de las proteínas más grandes y aumentando el de las proteínas pequeñas y iones, así obtener una mejor resolución de proteínas ≤ 30 kDa (Shägger & Von Jagow, 2006).

4.1.1- Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon mezclando 100 μ l de cada hidrolizado y de cada blanco de reacción con 100 μ l de buffer de muestra (Tabla 13). Se llevaron a ebullición durante 5 min y se centrifugaron a 16000 g durante 15 min.

Tabla 13: Buffer de muestra

TRIS	1,57 g
SDS	2 g
β -mercaptoetanol	5 ml
Azul de bromofenol	2 mg
Glicerol 10%	8 ml
HCl 1 M	hasta pH 6,8
AD	hasta 100 ml

4.1.2- Armado del gel

En este caso se empleó un sistema formado por dos tipos de geles (apilamiento y separador), que varían entre sí en la proporción de acrilamida y bisacrilamida, modificando su tamaño de poro con el fin de lograr una mejor separación de los péptidos presentes en la muestra. La composición de cada uno de los dos tipos de geles queda definida por dos parámetros:

$$\%T = (\text{g Acilamida} + \text{g Bisacrialmida}) \times 100 / \text{Volumen final}$$

$$\%C = \text{g Bisacrilamida} \times 100 / (\text{g Acilamida} + \text{g Bisacrialmida})$$

donde %T representa el porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador en gramos por 100 mL) y determina la longitud promedio de la cadena del polímero; mientras que %C (concentración de bis-acrilamida) representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento.

Para moldear los geles se utilizó el soporte provisto por el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). Se prepararon dos sistemas diferentes con distinto %T denominados geles 1 y 2 y las mezclas se prepararon de acuerdo a la composición detallada en las Tablas 14 y 15, respectivamente. La Tabla 16 detalla la composición del buffer que se utilizó para preparar todos los geles.

Gel de apilamiento (4%T, 3%C)		Gel separador (16%T, 3%C)	
Acril-Bis (49,5%T , 3%C)	0,6 ml	Acril-Bis (49,5%T, 3%C)	1,65 ml
Buffer de resolución	1 ml	Buffer de resolución	1,65 ml
AD	3,4 ml	AD	1,7 ml
PSA 10%	120 µl	PSA 10%	60 µl
TEMED	12 µl	TEMED	6 µl
Volumen final	5,13 ml	Volumen final	6,21 ml

Tabla 15: Composición del gel 2			
Gel de apilamiento (4% T, 3% C)		Gel separador (13,5% T, 3% C)	
Acril-Bis (49,5% T , 3% C)	0,6 ml	Acril-Bis (49,5% T, 3% C)	1,65 ml
Buffer de resolución	1 ml	Buffer de resolución	1,65 ml
AD	3,4 ml	AD	2,85 ml
PSA 10%	120 μ l	PSA 10%	60 μ l
TEMED	12 μ l	TEMED	6 μ l
Volumen final	5,13 ml	Volumen final	5,06 ml

Tabla 16: Buffer de resolución	
TRIS	36,3 g
HCl 1M	hasta pH 8,45
SDS 0,3%	0,3 g
AD	hasta 100 ml

Se armaron primero los geles separadores agregando al final el persulfato de amonio (PSA) y el TEMED en último lugar para evitar que se produzcan focos de polimerización prematuro; se tomó 5 ml con pipeta de la mezcla correspondiente al gel separador y se volcó entre los vidrios de la gelera y luego se utilizó n-butanol para nivelar la superficie. Una vez gelificado, se eliminó el butanol y el agua excedente por inversión y secado con papel de filtro. El gel de apilamiento se preparó de modo similar y se volcó arriba del primero, agregando inmediatamente los peines formadores de calles. Al gelificar, se retiran los peines y rápidamente se inundan los pocillos con agua destilada para lavar el excedente y se vuelca por inversión.

4.1.3- Siembra de muestras y patrones

Se sembraron 10 μ l de cada muestra, que consistieron en los hidrolizados de distintos tiempos, los blancos de reacción y los patrones de peso molecular, utilizando

jeringa Hamilton de 25 μ l. Se utilizaron los patrones de PM (low range, Bio-Rad) que figuran en la Tabla 17.

Tabla 17: Patrones de peso molecular

Patrones	PM (kDa)
Fosforilasa b	97,4
Seroalbúmina	66,2
Ovoalbúmina	45,0
Anhidrasa carbónica	31,0
Inhibidor de tripsina	21,5
Lisozima	14,4

4.1.4- Condiciones de corrida

Luego de sembrar las muestras se colocaron las placas en la cuba electroforética y se llenaron con las soluciones catódica y anódica, la composición de las mismas figura en las Tablas 18 y 19. Se conectaron los electrodos a la fuente, y se fijó el voltaje en 30 V hasta que el frente de corrida atravesó el gel de apilamiento, entonces se subió el voltaje lentamente (15 V/min) hasta 90 V hasta el fin de la corrida.

Tabla 18: Buffer Catódico 0,1 M

TRIS	1,211g (0,1M)
Tricina	1,792g (0,1M)
SDS	0,1g (0,1%)
AD	hasta 100ml

Tabla 19: Buffer Anódico 0,2 M

TRIS	2,423g (0,2 M)
HCl 1 M	hasta pH 8,9
AD	hasta 100 ml

4.1.5- Fijación, tinción y decoloración de los geles

Cuando el frente de corrida (banda azul) llegó a la base de la placa se dió por finalizada la electroforesis, entonces se desconectaron los electrodos y se desarmó el equipo para retirar cuidadosamente los geles. Se depositaron los mismos en un recipiente conteniendo solución fijadora durante 30 min (Tabla 20), la misma contribuye a una mejor adhesión de los péptidos al gel; luego se pasaron a una solución colorante durante 1,5 h (Tabla 21). Una vez reveladas las bandas se realizaron 3 lavados de 15 min con solución decolorante (Tabla 22).

Tabla 20: Solución Fijadora

Ácido acético glacial	10 ml
Metanol	40 ml
AD	hasta 100 ml

Tabla 21: Solución Colorante

Ácido acético glacial	10 ml
Coomasie azul brillante R-250	25 mg
AD	hasta 100 ml

Tabla 22: Solución Decolorante

Ácido acético glacial	10 ml
AD	hasta 100 ml

4.2- Determinación de la concentración de péptidos

Se utilizó el método de Lowry para determinar la concentración de péptidos de los hidrolizados a distintos tiempos y de los blancos. El método se basa en dos reacciones para producir coloración por la presencia de polipéptidos. En primer lugar, el Cu^{+2} en medio alcalino del reactivo forma complejos de coordinación con dos enlaces peptídicos, dando lugar a un compuesto coloreado azul (método de Biuret). En

segundo lugar, este complejo facilita la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico) por oxidación de restos de tirosina y triptófano de la cadena polipeptídica, produciendo una coloración azul más intensa. El espectro de absorción resultante presenta un máximo a 750 nm (Peterson, 1979). Esta técnica es 100 veces más sensible que la de Biuret, por eso se la utiliza para medir muestras con bajas concentraciones. La reacción se encuentra esquematizada en la Figura 4.

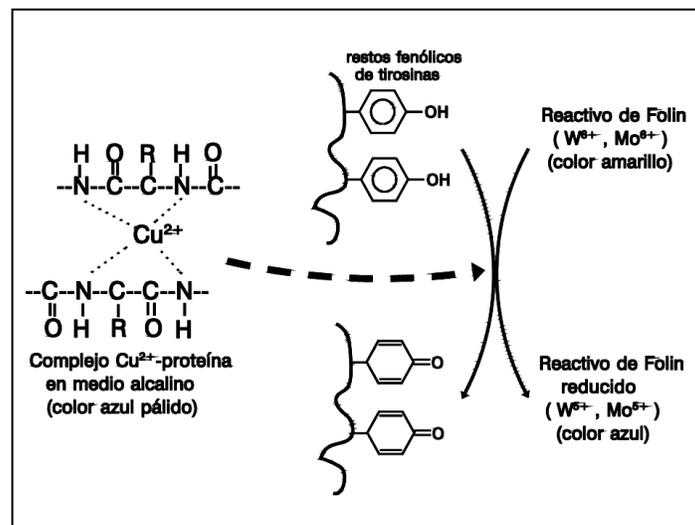


Figura 4: Reacción de Folin-Ciocalteu

Se prepararon los reactivos denominados **Solución A** (Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 N) y **Solución B** (que se prepara al momento de la reacción colocando en un tubo 0,5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% p/v con 0,5 ml de tartrato de sodio y potasio al 2% p/v). Ambos reactivos se mezclaron para dar la **Solución AB** (50 ml de Solución A + 1 ml de Solución B). La mezcla de reacción se preparó colocando 200 μl de muestra y 1 ml de la solución AB en tubos Khan de vidrio; se mezclaron con agitador y se dejaron reposar 10 min. A continuación se agregó a cada tubo 100 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido a la mitad con agua destilada), se volvieron a mezclar y se dejaron reposar durante 30 min, para finalmente leer los tubos a 750 nm. Se armó en paralelo una curva patrón con diluciones de albúmina (0, 50, 100, 250, 400 y 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Todas las medidas se realizaron por triplicado.

4.3- Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) es un parámetro clave para el seguimiento y control de una reacción de proteólisis; representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces. El método que se utilizó para medir el GH se basa en la determinación de los grupos amino libres y se calcula como porcentaje a partir de la ecuación:

$$\% \text{ GH} = (N_t - N_0) \cdot 100 / (N_{\text{inf}} - N_0)$$

Siendo N_t , N_0 y N_{inf} los equivalentes de leucina al tiempo considerado (t), a tiempo cero y a tiempo final, respectivamente (Adler-Nissen, 1979). El valor de N_{inf} fue estimado como:

$$N_{\text{inf}} = (1/PM_{\text{prom}}) \cdot (1 + f\text{Lys}) \cdot C_{\text{prot}}$$

donde PM_{prom} es el promedio de los PM de los aminoácidos de las proteínas de soja (120 g/mol), $f\text{Lys}$ es la proporción de lisina en estas proteínas (1/16) (Abu-Salem *et al.*, 2013) y C_{prot} (g/l) es la concentración de proteínas en la muestra.

Se llevó a cabo el método del TNBS, que se basa en la reacción de los grupos amino con el ácido 2, 4, 6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS) para dar un producto que presenta absorbancia a 340 nm. La reacción se llevó a cabo en una serie de etapas: **1º**) Se colocaron 40 µl de cada muestra (hidrolizados y blancos) en tubos eppendorf y se llevaron a 75 °C durante 15 min en bloque seco para favorecer el despliegue de las proteínas. **2º**) Se cargaron 320 µl de buffer fosfato 0,2125 M de pH 8,2 con SDS al 1%, en cada tubo. **3º**) Se agregaron 320 µl del TNBS diluido 1/200 en cada tubo y se incubaron en baño termostático a 50 °C durante 1 h al resguardo de la luz (se cubrió el baño con papel aluminio). **4º**) Una vez pasado este tiempo de reacción, se añadieron 640 µl de HCl 0,1 N a cada tubo, pinchando con la punta de la pipeta el papel aluminio. **5º**) Se dejaron reposar los tubos 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad, para luego medirles la absorbancia a 340 nm. La curva patrón se armó con diluciones de leucina (0,225; 0,45; 0,9; 1,125; 1,5 y 2,25 mM).

4.4- Fraccionamiento por filtración

Se utilizaron tubos con filtros de membrana de distinto tamaño de poro (Millipore Amicon) para fraccionar grupos de péptidos. Se utilizaron tubos de filtro con corte en 3, 10 y 30 kDa; se colocaron 4 ml de muestra y se centrifugaron a 12000 *g* hasta recuperar un volumen de 2 ml por tubo. Estas fracciones se alicuotaron de a 1 ml en eppendorf y se reservaron para determinación de la actividad antioxidante.

4.5- Análisis cromatográfico de los hidrolizados

4.5.1- Cromatografía de exclusión molecular

En la Cromatografía de Exclusión Molecular (CEM) se utiliza como relleno de columna una matriz polimérica inerte de tamaño de poro determinado, que actúa como un tamiz y permite separar los componentes de la muestra inyectada por sus diferencias de tamaños. Las moléculas de igual o menor tamaño que los poros, quedarán retenidas en la matriz retrasando su elución, mientras que aquellas de mayor tamaño eluyen con el llamado volumen muerto (frente de corrida) (Malawer, 1995).

Se utilizó la columna Sephadex G-25 fine (Pharma Biotech) de 37 cm³ de relleno. La matriz, formada por una mezcla de agarosa y dextrano, permite separar péptidos cuyo peso se encuentra entre 1000 y 5000 Da. Se equilibró la columna con 1 VC con buffer fosfato 0,1 M de pH 6,6; luego se inyectaron 400 µl de la muestra (previamente centrifugada 1 min a 16000 *g*) y se eluyó en gradiente isocrático con el buffer fosfato a un flujo de 0,5 ml/min a una presión de 0,2 MPa. Por último, los picos detectados a 215, 280 y 330 nm, fueron colectados individualmente y guardados en frezeer a -20 °C. La columna, luego de ser lavada con agua destilada, se dejó en etanol al 20%.

4.5.2- Cromatografía de fase reversa

La Cromatografía de Fase Reversa (CFR) permite separar los péptidos en base a sus diferencias de polaridad, la fase estacionaria está formada por partículas de sílica unidas químicamente a hidrocarburos de cadena larga convirtiéndola en una matriz apolar. De este modo, las moléculas se retienen en la columna en virtud de las

interacciones que establecen con ella y eluirán en función de la intensidad de dicha interacción.

Se utilizó la columna Bondclone 10 C18 (Phenomenex) de 3,5 ml. La misma se equilibró con el buffer de elución A (agua bidestilada - TFA al 0,05 %v/v). Se inyectaron 100 μ l de cada muestra (previa centrifugación a 16000 g) en la columna, y se eluyeron con un gradiente de 0-100% del buffer de elución B (Acetonitrilo - TFA al 0,025% v/v) en 10 VC a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Las fracciones fueron detectadas a 280, 215 y 330 nm. Al finalizar la corrida se lavó la columna en acetonitrilo puro y se guardó en etanol al 20%.

5- BÚSQUEDA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se analizó la capacidad antioxidante/reductora de los hidrolizados de soja a distintos tiempos por los métodos de radical ABTS⁺, ensayo de β -caroteno, método ORAC y poder reductor empleando Fe⁺³. Dado que existen diversos mecanismos por los que los compuestos antioxidantes actúan, la actividad antioxidante debe medirse con diferentes ensayos. Para una prueba determinada, además, la respuesta antioxidante depende de factores tales como el disolvente y el reactivo empleado, la afinidad del antioxidante por el reactivo y su pureza. Debido a esto, un sistema puede ser mejor caracterizado por el uso de diferentes ensayos basados en diferentes mecanismos y llevado a cabo en diferentes medios (Moure *et al.*, 2006).

5.1- Ensayo de β -Caroteno

En este ensayo se utiliza ácido linoleico en un medio que le provoca la pérdida de un H de uno de sus grupos metileno dialílicos, formándose hidroperóxidos. Los radicales libres que resultan de estos hidroperóxidos, en ausencia de un antioxidante, atacan las insaturaciones del β -caroteno. Así, al perder sus dobles enlaces, el β -caroteno pierde su cromóforo y consecuentemente su color naranja característico. Si la muestra a ensayar actúa como antioxidante, previene la extracción de H al ácido linoleico, por lo que no se produce la oxidación del β -caroteno (Prieto *et al.*, 2012).

Para la determinación se disolvieron 1,5 mg de β -caroteno en 5 ml de cloroformo; luego se agregaron 80 mg de ácido linoleico y 800 mg de Tween 20. El

cloroformo fue eliminado bajo campana a 40 °C y finalmente se adicionaron 200 ml de AD saturada con oxígeno. La mezcla de reacción se preparó colocando en tubos 2,5 ml del reactivo y 0,1 ml de muestra a 50 °C. Junto con las muestras se prepararon tres blancos: blanco de reactivo (AD), blanco de enzima (del PER) y blanco de sustrato (del aislado de soja sin hidrolizar). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se determinó absorbancia a 470 nm a los 0, 30, 60, 90 y 120 min de reacción. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad antioxidante (%AA) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%AA = 100 - \{(A_{0M} - A_{120M}) / (A_{0B} - A_{120B})\} \cdot 100\}$$

donde A_{0M} y A_{0B} representan la Absorbancia a 470 nm a los 0 min de reacción de las muestras y del blanco respectivamente. A_{120M} y A_{120B} corresponden a la absorbancia a 470 nm a los 120 min de reacción de las muestras y del blanco.

5.2- Ensayo del radical ABTS⁺

El radical catiónico ABTS es un cromóforo que absorbe a una longitud de 734 nm y se genera por reacción de oxidación del ABTS (2,2' -azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) con persulfato de potasio. El ensayo se basa en la cuantificación de la decoloración, por la pérdida del radical ABTS⁺, que presenta una coloración azul verdosa debido a la interacción con especies donantes de electrones. La actividad se expresa como % de inhibición del radical ABTS⁺. Adicionalmente se realizó una curva patrón armada con TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametacromo-2-carboxílico) (Re *et al.*, 1999).

Para el ensayo, primero se preparó un stock del reactivo disolviendo ABTS en agua destilada a una concentración de 7 mM junto con persulfato de potasio 2,45 mM. La solución se preparó en un frasco caramelo y se dejó toda la noche a temperatura ambiente para que se genere el radical. Posteriormente, se realizó una dilución en buffer fosfato 5 mM de pH 7,4 hasta obtener una absorbancia a 734 nm de 0,70 aproximadamente. Para la reacción se mezclaron 10 µl de muestra con 1 ml del reactivo, se esperó 10 min y se realizaron las lecturas. Todas las medidas se hicieron

por triplicado. El porcentaje de inhibición del ABTS se calculó con la siguiente ecuación:

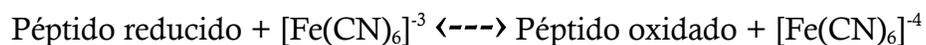
$$\% \text{Inh del ABTS}^+ = ((A_{B0\text{min}} - A_{M10\text{min}}) - (A_{B0\text{min}} - A_{B10\text{min}})) \cdot 100 / A_{B0\text{min}}$$

donde $A_{B0\text{min}}$ es la absorbancia a 734 nm del blanco a tiempo cero, $A_{B10\text{min}}$ es la absorbancia a 734 nm del blanco a los 10 minutos y $A_{M10\text{min}}$ es la absorbancia de la muestra a 734 nm a los 10 minutos.

Otro modo de informar este grado de inhibición es mediante el valor de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), donde mediante la curva patrón de Trolox se expresa la concentración de un antioxidante sintético que equivaldría a la actividad antioxidante de la muestra. Para el ensayo se preparó una curva patrón con diluciones de Trolox (2,5 -1,25 -0,5 -0,25 -0,125 -0,05 -0,025 -0,0125 mM).

5.3- Poder reductor

La capacidad reductora de una muestra, que se utiliza como reflejo de la actividad antioxidante, se determinó con el ensayo de poder reductor empleando Fe^{+3} . Se utiliza un protocolo modificado de Ralison *et al.* (2013). La reacción consiste en la reducción de Fe(III) de un complejo ferricianuro, a la especie ferrosa Fe(II) , como se muestra en el recuadro:



Una vez finalizada la reacción, se utiliza una solución de Fe^{+3} como indicador de la cantidad de Fe^{+2} generado, provocando un cambio en la coloración de la solución amarilla a tonos entre verde y el azul de acuerdo al grado reductor de la muestra. Esto sucede porque el Fe^{+3} agregado al final, contribuye a la formación del complejo Azul de Prusia (Figura 5), de coloración azul, que absorbe a 700 nm. Así, a mayores valores de absorbancia se tiene mayor poder reductor en la muestra.

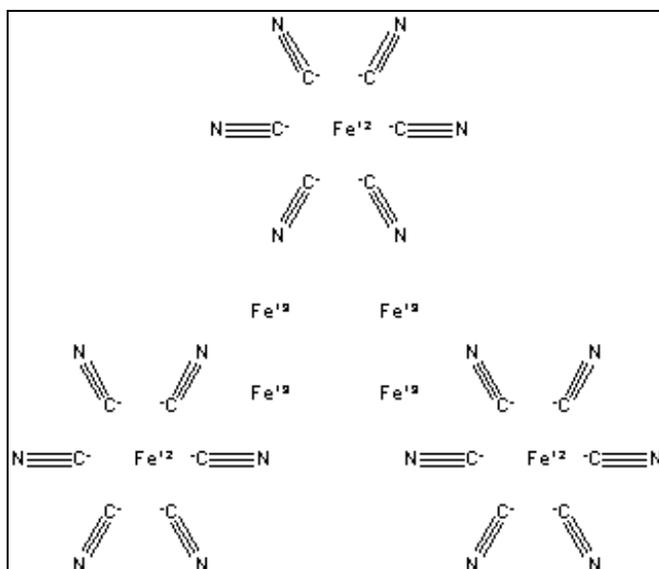


Figura 5: Complejo Azul de Prusia.

Para el ensayo se mezclan los componentes de la Tabla 23 y se incuban los tubos por 20 min en baño termostático a 50 °C. Luego de enfriar a temperatura ambiente se detiene la reacción con el agregado de TCA, luego de cual se agita y se centrifuga 10 min a 5000 g. Se toma 1,89 ml del sobrenadante y se diluye con 1,89 ml de agua destilada (dil ½), luego se agrega 0,226 µl de cloruro férrico 0,1% (preparado en el momento) y se mezcla usando vórtex. Luego de 10 min se mide la absorbancia a 700 nm. Se preparan blancos de reacción con AD y respectivos blancos de sustrato y enzima (BS y BE). Se armó una curva patrón con cisteína en el rango de 0.5 a 5 mM. El resultado obtenido se expresa en mg/ml de cisteína.

Tabla 23: Mezcla de reacción	
1°) AD	1,65 ml
2°) Muestra	60 µl
3) Buffer fosfato 0,2M pH 6,6	0,95 ml
4°) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1%	1 ml
---Mezclar bien y dejar 20min en baño a 50 °C---	
5°) TCA 10%	1 ml

5.4- Método ORAC

El método de la capacidad antioxidante del radical oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés, “Oxygen Radical Antioxidant Capacity”) se basa en medir una señal de fluorescencia, aportada por la fluoresceína, que decrece en ausencia de agente antioxidante (muestra), como consecuencia de la acción de las sustancias reactivas del oxígeno. Estas últimas son producidas mediante la descomposición de un compuesto azo, en este caso el AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro). El agregado de un antioxidante absorbe las sustancias reactivas del oxígeno generadas, y de este modo la señal de fluorescencia persiste (Zulueta *et al.*, 2009).

Se realizó esta determinación en base al método de Kim *et al.*, (2007), adaptado a determinación en una cubeta de 3,5 ml en un Espectrofluorómetro (Mod. RF-1501, Shimadzu). Se preparó una solución stock de fluoresceína 53,3 μM en buffer fosfato 35 mM, pH 7,8 (a 4 °C en ausencia de luz hasta su utilización) y otra de AAPH (generador de radicales peroxilos) en el mismo buffer. La mezcla de reacción a 37 °C contuvo 1,5 ml de fluoresceína (diluida 1/1000), 250 μl de muestra o controles y 250 μl de AAPH. Se realizarán lecturas con espectrofluorómetro (longitud de excitación 485 nm y de emisión 535 nm) a intervalos regulares durante 35 min.

La actividad antioxidante se informará como valor de TEAC (μmoles de trolox/mg de proteína) y se calculará como el cociente de la diferencia del área bajo la curva de decaimiento entre el blanco (sin AAPH) y la muestra, y el mismo valor para el trolox, ajustando las unidades multiplicando por el factor: molaridad del trolox/mg de proteína.

5.5- Cálculo de la IC_{50}

A partir de los resultados obtenidos de actividad antioxidante, se calculó la concentración del hidrolizado que provoca el 50% de la actividad respecto de la máxima actividad, IC_{50} (por sus siglas en inglés “half maximal inhibitory concentration”). Para esto se realizaron diluciones de la muestra (1/100, 1/20, 1/10, 1/2, 1) y se midió su actividad antioxidante por el método del radical ABTS^+ . En paralelo, se armó una curva patrón con TROLOX y se prepararon los blancos (buffer, sustrato, enzima y mezcla de reacción), todas las lecturas se hacen por triplicado.

5.6- Análisis estadístico

Los datos correspondientes a actividad antioxidante y poder reductor fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía; posteriormente se empleó el test Tukey ($p < 0.05$) para analizar los pares de grupos de datos cuando las diferencias fueron significativas. El programa informático empleado fue el GraphPad Prism.5. Por otra parte, este programa también fue empleado para calcular áreas bajo las curvas en los métodos de ORAC y las cromatografías de exclusión molecular (G25-fine). En los casos donde se requirió hacer regresión no lineal se empleó el programa SigmaPlot 10.0.

6- DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE MASAS Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Las muestras filtradas (descritas en la sección 4.4) de hidrolizado de soja que presentaron mayor actividad antioxidante, fueron liofilizadas y enviadas al CEQUIBIEM para su análisis por MALDI-TOF.

Se realizó una identificación preliminar bioinformática de algunas secuencias peptídicas mediante la coincidencia de los pesos obtenidos por espectrometría de masas con pequeños trozos de secuencias internas de las proteínas de soja glicinina (UniProt: P04347) y β -conglucininina (UniProt: Subunidad α : q94lx2; Subunidad α' : q7xxt2; Subunidad β : q93v19). Esta operación se llevó a cabo con la herramienta FindPept (www.expasy.org) que simula cortes inespecíficos en secuencias de proteínas registradas en bases de datos, e informa coincidencias con los valores de masas aportados por el MALDI. La diferencia de masa máxima permitida para esta operación de comparación fue de 0,01 Da y se consideraron las cisteínas tratadas con iodoacetamida.

[Escriba texto]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE A- Aislamiento de fitoproteasas a partir de látex y su caracterización bioquímica y cinética

1- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS Y PARCIALMENTE PURIFICADOS

Se colectaron frutos de *Manihot pomifera* en los periodos de marzo de 2013 y febrero, marzo y abril de 2014. Por la metodología descrita en Materiales y Métodos se extrajo el látex en buffer, obteniéndose una concentración de aproximadamente 6% v/v. Se realizó una clarificación de esta suspensión de látex por centrifugación. Se descartó un precipitado con restos celulares y un sobrenadante blanquecino y pegajoso (que contiene gomas, lípidos y compuestos insolubles), colectando la solución transparente y levemente amarilla (debido a la presencia de pigmentos) que queda ubicada en la parte central del tubo, la cual fue denominada extracto crudo (EC).

El EC obtenido, además de contener las proteínas de interés, arrastra consigo pigmentos, glúcidos, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios. Por este motivo, se realizó una precipitación acetónica como una primera etapa de purificación, para eliminar estos contaminantes. Para el ensayo se utilizó una relación de 1 volumen de acetona fría con 1 volumen de EC, que en el trabajo de López *et al.* (1989) se verificó la eliminación de los pigmentos y casi la totalidad de los glúcidos, reteniendo más de 80% de las proteínas presentes y actividad enzimática. Se determinó en todos los extractos: actividad caseinolítica, concentración total de proteínas y actividad específica; los valores obtenidos figuran en la Tabla 24.

Tabla 24: Esquema de purificación de los extractos

Extracto	Actividad (Ucas/ml)	Proteínas (mg/ml)	AE (Ucas/mg)
EC -Mar 2013	7,2 ± 0,4	1,75 ± 0,08	4,1 ± 0,2
EC -Feb 2014	8,0 ± 0,9	1,87 ± 0,03	4,4 ± 0,3
EC -Mar 2014	5,5 ± 0,2	1,26 ± 0,08	4,4 ± 0,2
EC -Abr 2014	7,2 ± 0,8	1,31 ± 0,02	5,4 ± 0,6
PAR	3,5 ± 0,3	0,22 ± 0,04	16,7 ± 0,8

En la Tabla 24 se observa que todos los EC presentaron actividad caseinolítica semejante y no mostraron grandes diferencias en el contenido de proteínas, a pesar de pertenecer a recolecciones diferentes. Los valores de actividad específica de los EC fueron cercanos a 4,5 Ucas/mg, comparables con la actividad de otros EC obtenidos de la especie *Vasconcellea quercifolia* (Caricaceae) con 5,0 Ucas/mg en el trabajo de Torres *et al.*, (2010), *Araujia angustifolia* (Asclepiadaceae) con 3,8 Ucas/mg de Obregón (2008) y *Asclepias curassavica* L. (Asclepiadaceae) de 1.05 Ucas/mg de Liggieri *et al.*, (2008). Para la misma especie vegetal que la utilizada en este trabajo, Bertucci (2012) obtuvo una AE de 7,9 Ucas/mg, un valor algo superior. Estas diferencias son propias de los extractos vegetales y responden al gran número de variables involucradas en el proceso de extracción: por un lado están las diferencias en la toma de muestra por parte del operador: número de frutos, tamaño de los frutos y volumen de látex extraído por fruto, lo que influye en la cantidad total de látex obtenido (%v/v). Y por otro lado, está la calidad del mismo en cuanto a contenido de proteasas: grado de madurez de los frutos, presencia de contaminantes, condiciones de manipulación y tiempo de duración del ensayo, lo que influye en la concentración y actividad enzimática (Schaller, 2004).

Si bien la etapa de extracción fue dificultosa por que el látex coagulaba con rapidez obstruyendo las pipetas, se procuró realizar toda la operación en poco tiempo y estandarizando aquellas variables difíciles de regular (como la profundidad de las incisiones y la forma de extraer el látex) de modo de garantizar la reproducibilidad de la etapa. Se tomaron muestras de igual número de frutos (8 en promedio) y de tamaño semejante dentro de cada lote. Para poder conservar la actividad enzimática y evitar la autodigestión, se trabajó todo el tiempo en baño de hielo, se usaron soluciones de almacenamiento de pH alejado al óptimo de estas enzimas y se utilizó EDTA, un quelante de iones divalentes que contribuye a evitar la degradación de las proteínas presentes en la muestra. Lo que hace el EDTA es capturar los iones Cu^{+2} necesarios para la actividad de las fenoloxidasas, enzimas que en presencia de oxígeno oxidan los compuestos fenólicos, presentes en las vacuolas, a quinonas (compuestos que se unen irreversiblemente a las proteínas alterando su estructura, y provocando el pardeamiento de la muestra) (Obregón *et al.*, 2009).

Por otro lado, se puede observar en la Tabla 24 que en las muestras de PAR se

recuperó una actividad del 49% y un 17% de proteínas totales, lo cual es debido a estos valores que la actividad específica aumento 4 veces respecto a la de los extractos crudos. Se concluye que a pesar de haber obtenido valores bajos en el contenido de proteínas, la actividad se conservó, lo que va a permitir realizar las posteriores etapas de purificación cromatográfica.

2- PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE PROTEASAS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS

2.1- EMPLEO DE UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO CATIONICO

Como segunda etapa de purificación, se realizó una cromatografía de intercambio iónico a partir de las muestras de PAR. Sabiendo que estas muestras contienen poca cantidad de proteínas, se decidió resuspender los precipitados acetónicos en menos volumen que el de partida, concentrando la muestra hasta 4 veces antes de inyectarla en la columna, tal como se describe en Materiales y Métodos (Parte A, sección 4.1.1). La información reportada en el trabajo de Corrons *et al.* (2012), sobre presencia en estos extractos de al menos 3 peptidasas con pI dentro del rango de pH de 3,7-9,2, ha permitido fijar las condiciones de corrida iniciales. Se buscó purificar una de estas peptidasas (de pI 4.5, 8.7 y 9.2), eligiendo aquella que presentó en el zimograma mayor actividad proteolítica ($pI \geq 6$) para lo cual se utilizó una columna de intercambio catiónico y se eluyó con buffer TRIS-HCl de pH 8.2 a un flujo de 1 ml/min. Se intentaron diferentes gradientes, comenzando con uno de 0 a 100% de NaCl en 8 volúmenes de columna donde se observó una serie de picos, uno de ellos en mayor concentración; posteriormente se probó el gradiente de 10 a 45 % de NaCl en 6 volúmenes de columna pero al tener aún picos solapados, se optó por realizar un gradiente quebrado. El esquema final utilizado es el que se muestra en el Figura 5, donde el gradiente va de 0-10% en 1 CV, de 10-30% en 12 CV y de 30-100% en 5 CV.

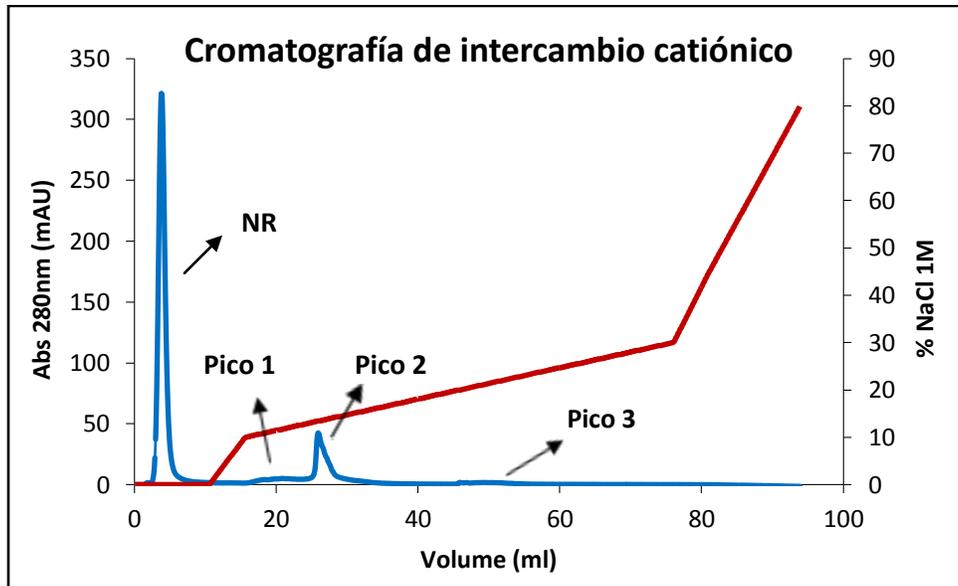


Figura 5: Cromatografía de intercambio catiónico de la muestra de PAR concentrada. Se midió la absorbancia a 280 nm, 215 nm y 330 nm.

En la Figura 5 se visualizan cuatro picos, el primero en aparecer corresponde al No Retenido (NR), que contiene a aquellas proteínas que al pH de elución no presentan carga positiva y por tanto no se unen a la columna. De los tres picos que aparecen a continuación, se optó aislar el Pico 2 que aparece a 25 ml y 13% de NaCl por encontrarse en mayor proporción y no estar solapado ni degradado. Este pico es colectado al igual que el pico del NR, para su posterior análisis por IEF y determinación de actividad proteolítica. En corridas cromatográficas posteriores los picos 1 y 3 se tornan un poco más importantes, por lo que también se colectan para ser analizados por IEF.

2.2- APLICACIÓN DE UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

Así como se utilizó la muestra de PAR con una columna de intercambio catiónico para aislar una peptidasa de pI alcalino, se utilizó una columna de intercambio aniónico para aislar la peptidasa de pI ácido. Se inyectó una muestra de PAR concentrada y se eluyó con un buffer ácido cítrico-citrato de sodio 0,02 M de pH 5,8 en un gradiente lineal de cloruro de sodio (0-1 M en 10 CV) a un flujo de 1 ml/min. El cromatograma obtenido leído a 280nm se observa en la Figura 6A, donde se visualiza la presencia de tres picos consecutivos luego del NR: el primero de ellos a

18%, el segundo a 37% y el tercer pico a 54% de NaCl 1M. Los picos fueron colectados por separado para su posterior análisis por IEF.

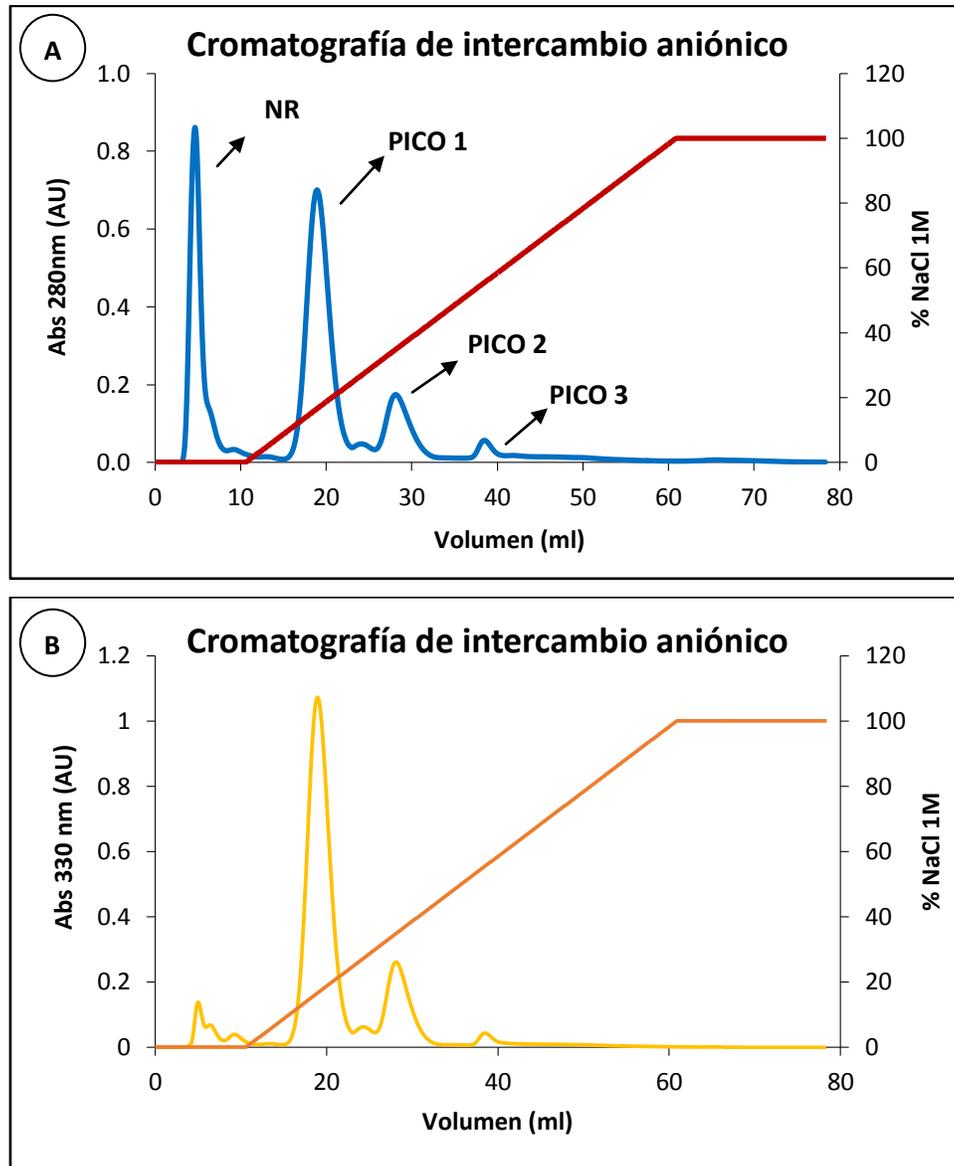


Figura 6: Cromatografía de intercambio aniónico de una muestra de PAR concentrada. Absorbancia a (A) 280 nm y (B) 330nm.

También se observó que, a diferencia del pico colectado por la columna de intercambio catiónico, la señal a 330 nm presentó una absorbancia elevada y muy ligada a los picos separados por la columna aniónica (Figura 6B). Se discutió anteriormente las consecuencias de la presencia de compuestos fenólicos en las muestras de proteínas, entre ellas, el cambio de su estructura por generación de puentes

de hidrógeno, lo que determina la formación de dímeros y polímeros de proteína entrecruzadas por polifenoles, afectando la calidad del patrón proteico observado en los geles.

3-. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS

3.1- ISOELECTROENFOQUE Y ANÁLISIS DE DENSITOGRAMA

Se realizaron ensayos de IEF para las muestras colectadas en las columnas de intercambio iónico, previamente concentradas y desionizadas como se describe en Materiales y Métodos (Parte A, sección 5.1). Se obtuvo para la **columna de intercambio catiónico** el gel revelado de la Figura 7, que contiene las muestras de los patrones de pI (calle 1), el pico1 mayoritario (calle 2), el NR (calle 3) y el EC (calle 4).

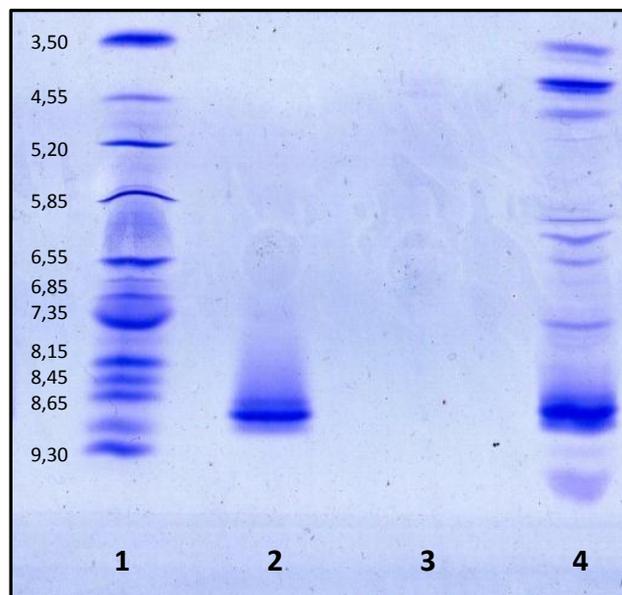


Figura 7: Isoelectroenfoque de las muestras colectadas por la CIC.
Calles: 1- Patrones de pI (BioRad), 2-Pico colectado, 3-NR, 4-EC.

Se puede ver en el gel, que la **calle 4** correspondiente al EC presenta dos bandas intensas, una proteína de pI alcalino igual a 8,7 y otra de pI ácido igual a 4,3 (determinados con el análisis de su densitograma). Se distinguen también otras bandas secundarias pero menos intensas, por lo que la atención va ser fijada en estas dos proteínas mayoritarias, las cuales, según lo mencionado en la sección 2.3 de

Introducción se espera que correspondan a proteasas del látex. A su vez, se cuenta con información de un zimograma realizado en el trabajo de Corrons *et al.* (2012) al IEF de un EC de *M. pomifera*, donde se detectan proteasas que presentan valores de pI semejantes a los obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, la actividad proteolítica es confirmada, posteriormente, por medida de actividad caseinolítica de las fracciones purificadas.

La **calle 2** correspondiente al pico colectado se resolvió en una única banda en el gel y corresponde a la proteína mayoritaria de pI 8,7 observada en el EC. La **calle 3**, correspondiente NR, no reveló ninguna banda; esto puede haber sido por pérdida de las proteínas presentes en la muestra durante la desalinización dejando una concentración de proteínas por debajo del rango de detección del método. A las fracciones correspondientes a los picos 1 y 3 del cromatograma (Figura 5) también se les realizó un IEF, y se determinó que estos picos corresponden a productos de la degradación de la proteína de pI 8,7. Debido a que presentaban una banda principal a ese pI seguido de bandas secundarias. Esto sucede con todas las proteasas luego de cierto tiempo de almacenamiento ya que se hidrolizan.

Por otro lado, el ensayo de IEF de los picos colectados por la **columna de intercambio aniónico** no reveló ninguna banda en el gel, por lo que en un principio no se pudo determinar si alguno de ellos correspondía a la proteína mayoritaria de pI ácido presente en el EC. La causa de esto, pudo deberse a que las muestras estaban muy diluidas al salir de la columna, por lo cual se intentaron dos alternativas para concentrar las proteínas de los picos: 1) concentrar la muestra de PAR a la entrada de la columna y 2) liofilizar la muestras de los picos a la salida y resuspenderlas en un volumen mínimo. Pero ninguno de estos métodos ayudó a revelar las muestras en el gel, por lo que se intentó la identificación de cada pico por medida de actividad enzimática con caseína como sustrato.

3.2- MEDIDA DE ACTIVIDAD CASEINOLÍTICA Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Para los ensayos de actividad caseinolítica, de los picos colectados a la salida de las columnas cromatográficas, se dejó actuar los tubos de reacción durante más de dos

minutos, ya que se trataba de muestras bastante diluídas. Se determinó el contenido de proteínas totales por el método de Bradford micrométrico como se describe en Materiales y Métodos (Parte A, sección 6). En la Tabla 25 se muestra un esquema de la marcha de purificación lograda para cada columna utilizada.

Tabla 25 : Marcha de purificación de las proteasas

Etapa	Proteína (mg/ml)	Actividad (Ucas/ml)	AE (Ucas/mg)	Nº veces purificado
EC	1,75 ± 0,08	7,2 ± 0,4	4,1 ± 0,2	0
PAR	0,22 ± 0,04	3,5 ± 0,3	16,7 ± 0,8	4,1
CIC	0,024 ± 0,002	0,8 ± 0,0	32,2 ± 0,4	7,8
CIA	0,006 ± 0,001	ND	ND	---

Se puede observar que la proteína de pI 8,7 comprobó tener actividad proteolítica, midiendo una actividad caseinolítica de 0,8 Ucas/ml, y una concentración baja de proteínas de 0,024 mg/ml determinada por el micrométodo de Bradford. El extracto final contuvo una AE de 32,2 Ucas/mg de proteína logrando 8 veces la purificación de la peptidasa respecto del EC; valor comparable con otras proteasas como Religiosina B, en el trabajo de Kumari *et al.* (2012), a partir del látex de *Ficus religiosa* donde se logró 2,5 veces de purificación y la proteasa serínica purificada a partir del fruto de *Cucumis trigonus*, en el trabajo de Asif-Ullah *et al.* (2006), con 6,5 veces de purificación respecto del EC, entre otras. Por lo tanto, se concluye que sí pudo realizarse la purificación de una de las proteasas mayoritarias de pI alcalino utilizando la columna Hi-TRAP SP. Para continuar con su caracterización se busca determinar su peso molecular y su actividad frente a otros tipos de sustratos.

Las muestras de la CIA (picos 1, 2 y 3) no presentaron valores detectables de actividad (ND), aun después de haberla dejado incubando hasta 60 min. La determinación del contenido de proteínas totales permitió explicar en parte el motivo, dando para el pico 1 (mayoritario) una concentración cercana a 6 µg/ml, estimado por prolongación de la curva de calibración ($R^2 = 0,9970$) que abarcaba desde 10 µg/ml – 100 µg/ml. Esto significa que, probablemente la cantidad de proteína que ingresó a la columna fue muy baja. Por otro lado, contradiciendo estos resultados, en el

cromatograma obtenido figuraba una especie con elevada absorbancia a 280 nm (pico 1). Este hecho podría deberse a que muchos compuestos de tipo fenólico contienen su máximo de absorbancia en el rango 265-335 nm como se reportó en el trabajo de Rodríguez-Delgado *et al.* (2001), por lo cual, debió de retenerse mayor contenido de dichos compuestos en ese pico que no pudieron ser removidos y que dieron un falso-positivo. En la Figura 6B, puede observarse como en el pico 1 la absorbancia a 330 nm es superior a la absorbancia de la proteasa de pI alcalino (presente en el NR de dicha columna).

3.3- DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR POR MALDI-TOF MS.

El resultado del MALDI-TOF de la proteasa de pI 8,7 se observa en la Figura 8, donde la señal más alta corresponde a una proteína de masa molecular de 63,177 kDa. Presenta también otros picos secundarios, como el de 31,576 kDa que correspondería al especie doblemente cargada, por lo que la relación m/z disminuye a la mitad. Por otro lado, los picos correspondientes a las masas de 73,587 kDa y 127,783 kDa al tener una señal mucho inferior al de la proteasa, se consideran contaminantes que no pudieron ser removidos.

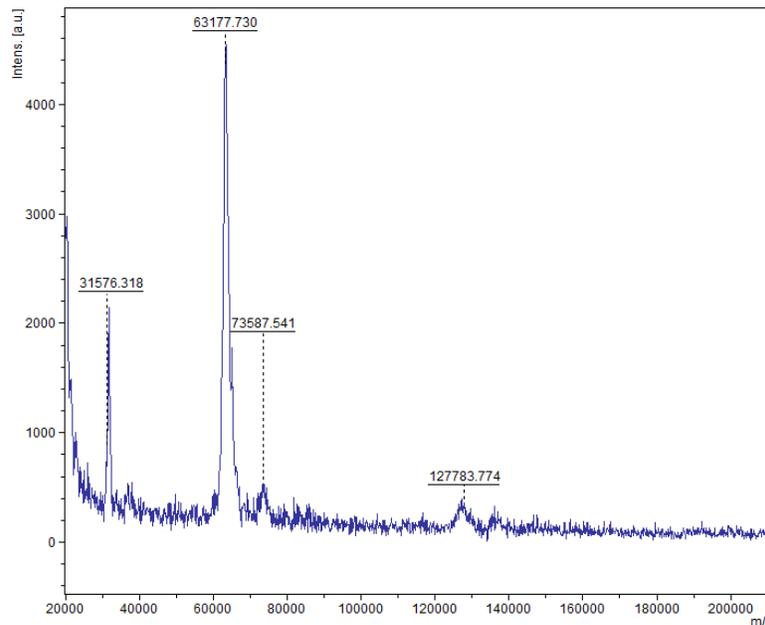


Figura 8: *Ensayo de MALDI-TOF MS.*
Determinación de la masa molecular de la proteasa de pI 8,7.

Se realizó también la determinación del peso molecular de la proteína presente en el pico mayoritario (pico 1) de la columna de intercambio aniónico (empleada para separar una proteasa ácida), cuya muestra había sido colectada sobre inhibidor al inicio. Se obtuvo un pico de menor intensidad que el mostrado en la Figura 8 con una masa de 63,408 kDa, lo que corrobora que esta peptidasa se purificó en muy baja concentración por lo que su actividad es no detectable.

Estos valores de masas se encuentran dentro del rango esperado para proteasas vegetales de tipo serínico (reportadas hasta la fecha) que es de 19 a 110 kDa, como se menciona en Antão & Malcata (2005). Como ejemplos se puede mencionar a la enzima la Religiosina C (*Ficus religiosa*) de 80 kDa purificada por Sharma *et al.* (2012), la Dubiumina (*Scissirostrum dubium*) de 66 kDa purificada por Ahmed *et al.* (2009), la proteasa serínica (*Nicotiana tabacum*) de 65 kDa purificada por Messdaghi & Dietz (2000), y la proteasa serínica (*Cucumis trigonus*) de 67 kDa extraída por Asif-Ullah *et al.* (2006), entre otras.

4- CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

4.1- CINÉTICA CON N- α -CBZ-P-NITROFENIL ÉSTER DE ALANINA Y CÁLCULO DE CONSTANTES CINÉTICAS

Se busca realizar una caracterización cinética de la proteasa de pI 8,7 empleando el sustrato N- α -CBZ-p-nitrofenil éster de alanina, que había presentado la mayor actividad esterolítica en muestras de PAR (López *et al.*, 1989). De este modo, a partir del gráfico concentración de sustrato vs velocidad de producto generado determinar las constantes K_M y V_{max} .

Para el ensayo, se empleó un amplio rango de concentraciones de sustrato (0,25-10 mM) buscando poder observar un máximo al final de la curva, puesto que tanto K_M como V_{max} se determinan a partir de aquella concentración de sustrato que satura la capacidad enzimática de la muestra. Los valores obtenidos fueron graficados en busca del modelo cinético de mejor ajuste con el programa SigmaPlot10.0, donde se tomó como criterio de decisión el mayor valor del coeficiente de determinación (R^2 tendiendo a 1) en regresiones no lineales.

De acuerdo al tipo de gráfico obtenido al medir la velocidad de catálisis en función de la concentración de sustrato, se puede clasificar el comportamiento cinético de una enzima en: hiperbólica o sigmoidea. Bajo el supuesto de un comportamiento cinético tipo Michaeliano, lo que representa una curva hiperbólica, la relación entre la velocidad de reacción y concentración de sustrato obedece la ecuación, conocida como la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

siendo V_0 la velocidad de la reacción, V_{\max} la velocidad máxima de catálisis, $[S]$ la concentración de sustrato y K_M la cte. de Michaelis-Menten. Ésta última puede interpretarse como la concentración necesaria para que la velocidad de catálisis alcance la mitad de la velocidad máxima; también brinda información acerca de la afinidad de la enzima por el sustrato, por ejemplo un valor de K_M pequeño indica una alta afinidad. El gráfico obtenido por este ajuste se muestra en la siguiente figura.

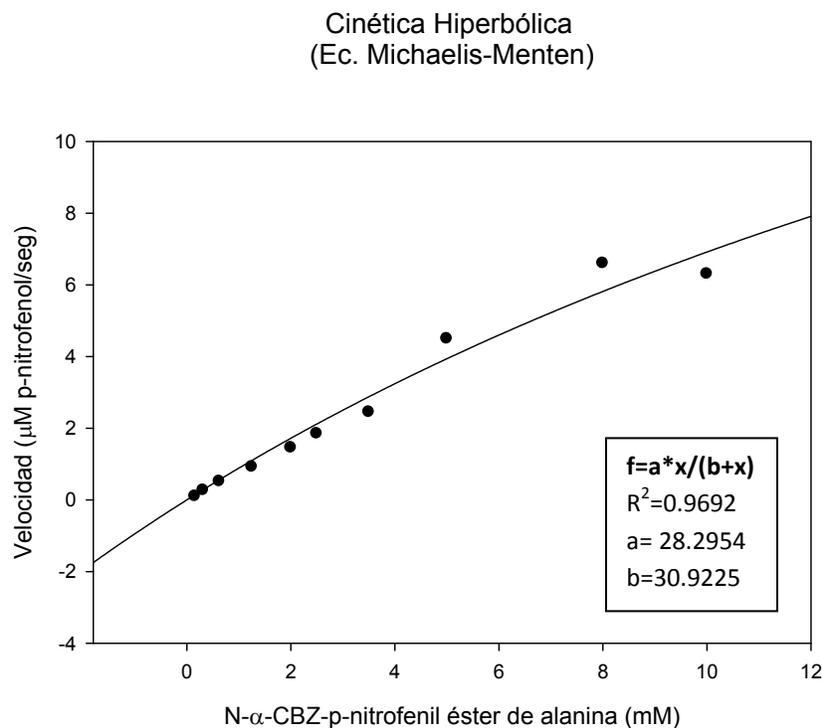


Figura 9: *Cinética Hiperbólica.* Análisis de la proteasa de pI 8,7 aplicando la Ecuación de Michaelis-Menten.

La curva obtenida presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9692 de

ajuste a un comportamiento michaeliano. Se observa que las distintas concentraciones de sustrato utilizadas no fueron suficientes para saturar la enzima y alcanzar el máximo de la curva. Sin embargo, el programa permite realizar la aproximación con los valores ingresados y a partir de los mismos informar los parámetros que describen la curva. Se obtuvo un valor de 28,2954 μM p-nitrofenol/s para V_{max} y 0,7731 mM para K_M (calculado considerando la concentración de sustrato en la cubeta). Si bien se trata del modelo que mejor describe la actividad de un gran número de enzimas, para muchas otras el modelo más adecuado no es hiperbólico, sino más bien sigmoideo. Cuando se realizó el gráfico de la doble recíproca (aproximación lineal de Lineweaver Burk), no se obtuvo un buen coeficiente de determinación lo que descarta una relación lineal entre los datos. Es por esto que se realizó el ajuste a una curva sigmoidea, comportamiento cinético común en enzimas multiméricas que muestran un efecto cooperativo durante la catálisis. Este efecto implica que la primer unión de la enzima al sustrato favorece posteriores uniones pudiendo, en enzimas con más de una subunidad, realizar una catálisis simultánea de varias moléculas de sustrato (Feduchi *et al.*, 2010). Se elige realizar un ajuste a esta curva mediante la Ecuación de Hill, cuya expresión es:

$$v/V_{\text{max}} = [S]^n / ([S]^n + K'_s)$$

donde n es igual al número de sitios de unión al sustrato por molécula de enzima y K'_s representa una constante de disociación global. Esta constante en la ecuación anterior no es igual a la concentración de sustrato que produce una velocidad semimáxima, excepto cuando $n=1$, en cuyo caso esta ecuación se reduce a la ecuación de Michaelis-Menten. Sin embargo, cuando $v = 0,5 V_{\text{max}}$, la ecuación queda expresada:

$$v/V_{\text{max}} = [S]^n / ([S]^n + [S_{0,5}]^n)$$

En esta ecuación, entonces, $S_{0,5}$ se define como la concentración de sustrato que da una velocidad semimáxima, y corresponde al punto de inflexión de la curva sigmoidea. En la cooperatividad positiva, n será mayor que 1, y menor que 1 si es negativa. Con los valores obtenidos se realiza la aproximación de comportamiento

sigmoideo, cuya curva se muestra en la Figura 10.

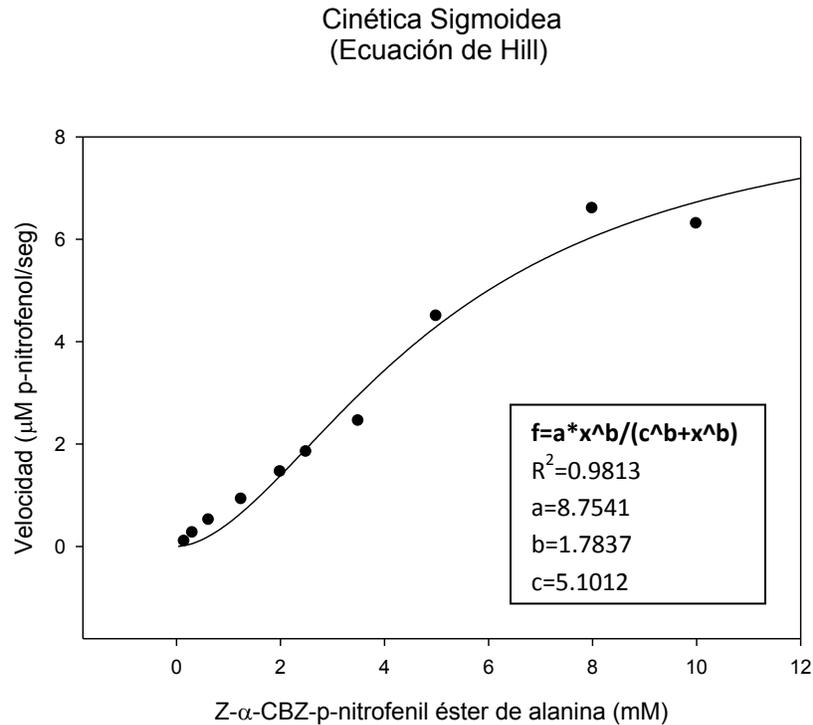


Figura 10: Cinética sigmoidea. Análisis de la proteasa de pI 8,7 aplicando la Ecuación de Hill.

En esta curva sigmoidea se obtuvo un mejor ajuste que para la curva hiperbólica, con un R^2 de 0,9813. Los valores de las constantes cinéticas obtenidos fueron 8,7541 μM p-nitrofenol/s para V_{max} y 0,1275 mM para $S_{0,5}$ también calculada sobre la concentración del sustrato en la cubeta. El ensayo se repitió en tres oportunidades y se obtuvo el mismo resultado en todos ellos. El valor de n fue de 1,7837 (un valor superior a 1), lo que indica que se trataría de una enzima con cooperatividad positiva. Otros trabajos también reportan un comportamiento semejante, como Obregón (2008) para las enzimas purificadas araujiána aI y araujiána aIII, extraídas de látex del fruto de *Araujia angustifolia*, empleando el mismo sustrato sintético. Se propone que podría tratarse de una enzima con más de una subunidad o al menos más de un sitio de unión al sustrato donde esta cooperatividad respondería a un efecto de reacción en cascada que se desencadena cuando se produce una laceración sobre los frutos.

4.2- ENSAYO DE CINÉTICA CON OTROS SUSTRATOS SINTÉTICOS PROBADOS

También se empleó otros sustratos sintéticos en diferentes concentraciones y condiciones de reacción, BAPNA, PFLNA, Arg- Arg-p-NA, pero no se observó actividad con ninguno de ellos.

PARTE B- Obtención de un hidrolizado de proteínas de soja con actividad antioxidante

1- PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Semejante a lo realizado en la PARTE A, se llevó a cabo una purificación parcial del EC pero en este caso con etanol como solvente. Se cambió el solvente precipitante en esta etapa debido a la toxicidad que posee la acetona, ya que a pesar de removerla con la bomba de vacío es posible que persistan trazas en la muestra. Como el objetivo de esta etapa es utilizar este extracto parcialmente purificado en la obtención de un producto que sería un componente potencial de un alimento, a tales fines el uso de etanol es más aceptable por su menor toxicidad. Se determinó en las muestras de PER la actividad caseinolítica, proteínas totales y actividad específica. Los resultados se observan en la Tabla 26, junto con los valores de las muestras de PAR y EC para su comparación.

Tabla 26: Extracto parcialmente purificado con etanol: comparación de valores.

Extracto	Actividad (Ucas/ml)	Proteínas (mg/ml)	AE (Ucas/mg)
EC -Mar 2013	7,2 ± 0,4	1,75 ± 0,08	4,1 ± 0,2
PER	3,9 ± 0,1	0,98 ± 0,04	3,9 ± 0,1
PAR	3,5 ± 0,3	0,22 ± 0,04	16,7 ± 0,8

Se puede observar que utilizando etanol en vez de acetona, se obtiene una mayor recuperación de proteínas (de 56% respecto del 12,6% para PAR), pero una menor actividad específica final, la cual fue de 3,9 ± 0,1 en lugar de 16,7 ± 0,8

Ucas/mg. Una disminución en la actividad enzimática, no solo se puede deber a la menor cantidad de proteína recuperada sino también a que el solvente remanente en la muestra disminuye su actividad. En este aspecto, el etanol resultó más difícil de evaporar que la acetona, hecho que había sido reportado en el trabajo de Bertucci (2012), motivo por el cual las muestras de PAR conservaron más actividad. Sin embargo, como las muestras de PER no son sometidas a más pasos de purificación, la actividad recuperada es la final y la que se utilizó en la etapa de hidrólisis de proteínas alimentarias.

2- REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DEL AISLADO DE SOJA Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

2.1- CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS

Se preparó un aislado de proteínas de soja a partir de harina desgrasada, tal como se describe en Materiales y Métodos (parte B, sección 2). El mismo contuvo una concentración de proteínas de $41,7 \pm 2,6$ mg/ml (4% p/v aproximadamente) determinada por el método de Lowry. Para la etapa de hidrólisis, el aislado fue diluido 1/10 en agua destilada, y junto con el extracto enzimático PER, se mantuvo una relación 1:9 (enzima:sustrato) en baño termostaticado a 45 °C con agitación constante. Con el fin de exponer mejor los enlaces peptídicos, principalmente en proteínas globulares, algunos autores como Ruiz *et al.* (2013) y Benitez *et al.* (2008) recomiendan una desnaturalización previa del aislado; sin embargo en este caso se optó por realizar la reacción directamente para evitar la formación de posibles aglomerados proteicos debido a la pérdida de su estructura.

2.2- SDS-PAGE DE LOS HIDROLIZADOS

Para seguir el avance de la proteólisis y obtener una estimación del tamaño de los péptidos generados, se tomaron alícuotas a distintos tiempos (deteniendo la reacción por shock térmico) y se realizó una SDS-PAGE con tricina con las alícuotas colectadas. El armado, condiciones de corrida y revelado del gel se desarrollaron según se detalló en Materiales y Métodos (Parte B sección 4.1). El gel obtenido se muestra a continuación.

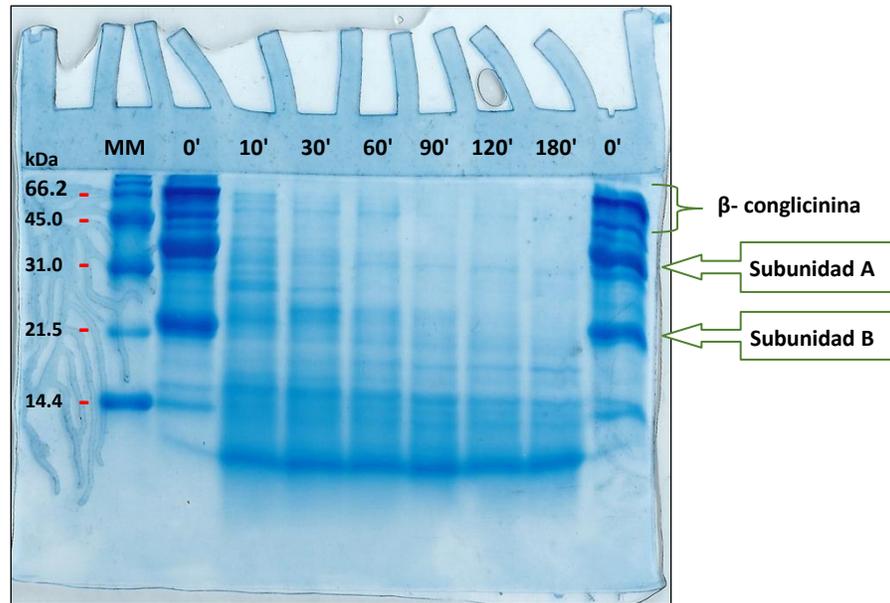


Figura 11: SDS-PAGE con tricina de 13,5% T de los hidrolizados de soja. MM: marcadores de masa molecular; 0': soja sin hidrolizar; 10', 30', 60', 90', 120' y 180': tiempos de hidrólisis (min).

En la Figura 11 se puede apreciar cómo a medida que transcurre el tiempo las bandas intensas de la calle del tiempo 0 se desvanecen, confirmando la hidrólisis de las proteínas presentes por parte del extracto enzimático, dando lugar a un bandeo de péptidos de menor peso molecular (< 16 kDa). Se ensayaron dos composiciones de gel (13,5% T y 16,1% T), lográndose una mejor resolución con el gel que favorece el avance de péptidos de mayor tamaño (13,5% T), ya que el tamaño de poro disminuye con el aumento de %T (García Pérez, 2000). Se observa que el aislado de soja sin hidrolizar muestra dos bandas intensas: una de 22 kDa y otra de 36 kDa aproximadamente, correspondientes a la subunidad ácida (A) y subunidad básica (B) de la glicinina. Las otras bandas, aquellas de peso entre 47 a 67 kDa, pertenecen a subunidades de la β -conglicinina (α , α' y β). La identificación de las principales proteínas de soja en geles de poliacrilamida fue realizada por Ruiz *et al.* (2013) y Medrano *et al.* (2011). A pesar de que algunos autores reportan dificultades al hidrolizar subunidades de la β -conglicinina debido a su glicosilación como Gibbs *et al.* (2004), en el presente trabajo ambas bandas del gel se observan casi completamente hidrolizadas a los 180 min.

2.3- DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

Se seleccionaron tres tiempos (30, 90 y 180 min) para la determinación del grado de hidrólisis (GH%) por el método del TNBS, tal como se describe en Materiales y Métodos (Parte B sección 4.3). Los valores obtenidos se grafican en la Figura 12; las barras muestran \pm DS. Se utilizó una curva de leucina como patrón ($R^2=0,996$).

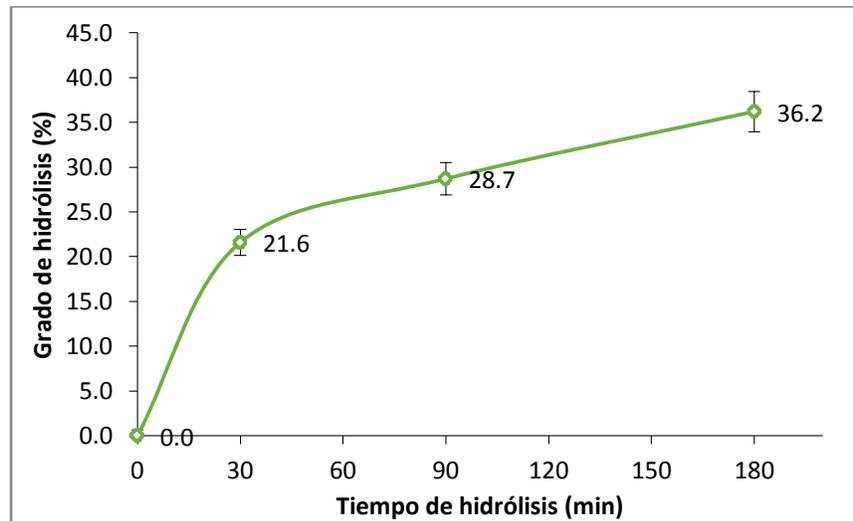


Figura 12: Ensayo del TNBS. Determinación del GH% en los hidrolizados de soja.

El GH es un parámetro muy variable y depende tanto del tipo de enzima, del sustrato utilizado, como de las condiciones de hidrólisis. En la Figura 12 se puede apreciar un incremento continuo del GH en función del tiempo, con una disminución de la pendiente luego de los primeros 30 min de hidrólisis, obteniendo hasta un 36,2% a los 180 min de reacción. Teniendo en cuenta que los hidrolizados que se producen para su uso en alimentación se pueden agrupar en: hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1% y el 10%, para la mejora de las propiedades funcionales; hidrolizados con grados de hidrólisis variable para su uso como saborizantes y por último, hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada (Benitez *et al.*, 2008), es que se considera que los hidrolizados obtenidos serían aptos para su utilización en formulaciones de alimentos.

Otras enzimas que también reportan resultados positivos en hidrolizar proteínas de soja son Flavourzyme (una proteasa fúngica) y PSG (proteasa de *Streptomyces griseus*) obteniendo un GH superior al 50% luego de 4 h de reacción sobre glicinina

reportado en el trabajo de Medrano *et al.* (2011), las enzimas Alcalasa y Novocym (subtilisinas de *Bacillus sp.*) con 35,1% y 33,3% GH respectivamente, luego de 8 h de reacción, obtenido en el trabajo de Hrckova *et al.* (2002), entre otras.

2.4- ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS HIDROLIZADOS

2.4.1- Cromatografía en fase reversa

Se realizó una HPLC-FR de los hidrolizados de 30, 90 y 180 min con el fin de observar el perfil peptídico de cada muestra respecto del grado de avance de la reacción. Los gráficos obtenidos se presentan a continuación y muestran la absorbancia a 280 nm en función del tiempo de retención.

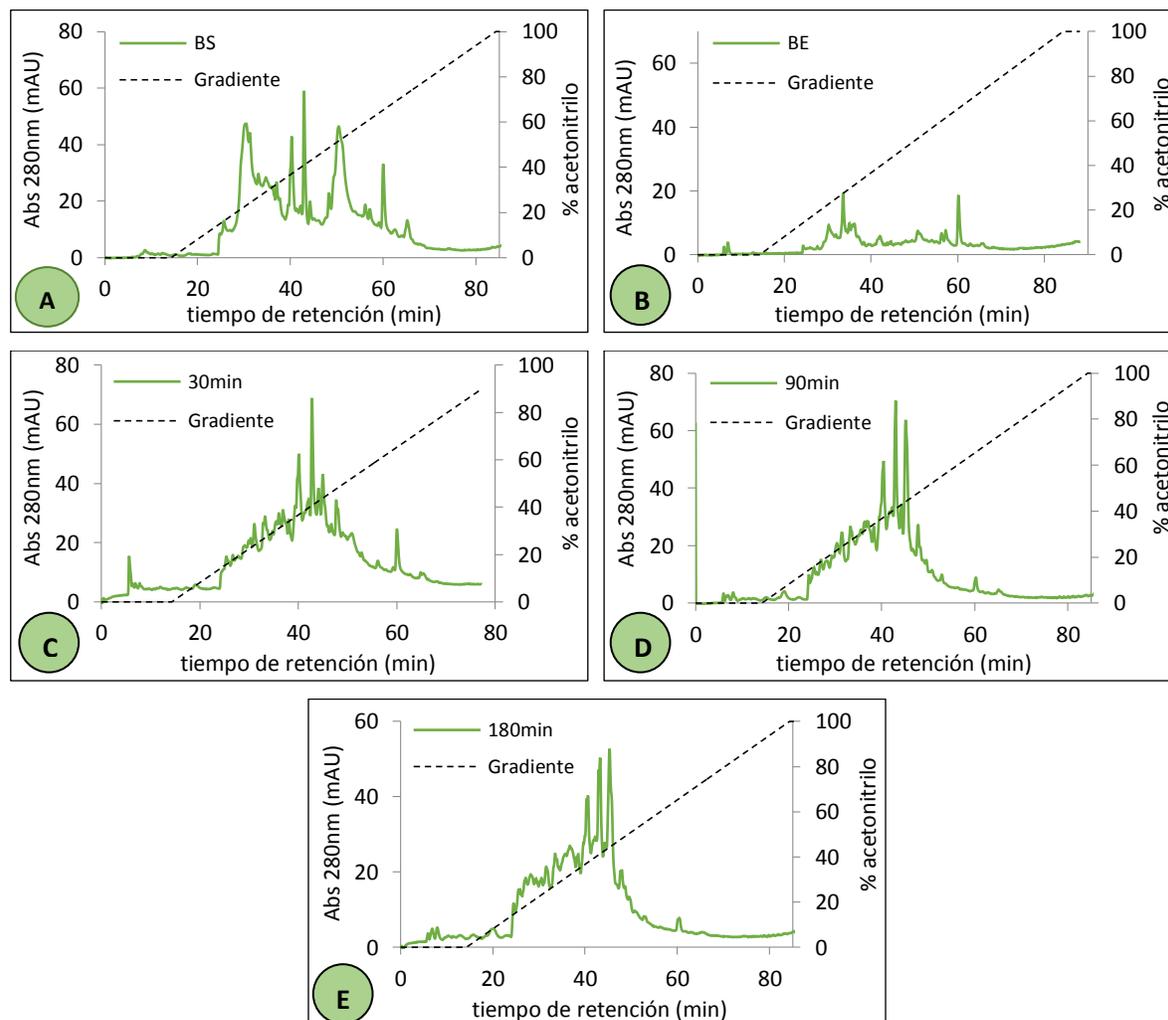


Figura 13: Cromatografía en fase reversa. A- blanco de enzima (BE), B- blanco de sustrato (BS), C- hidrolizados 30min, D- hidrolizado 90min y E- hidrolizado 180min.

En la Figura 13 se observa que con el transcurso de tiempo se obtiene un mayor número de picos correspondientes a los péptidos de bajo peso molecular y que el perfil no varía mucho luego de los 30 min de hidrólisis. También se detecta que los hidrolizados eluyen a tiempos mayores respecto del blanco; lo mismo se observó en el trabajo de Lv *et al.* (2009), para muestras de hidrolizado de soja, donde aquellas muestras con un mayor número de péptidos hidrofóbicos quedaban más retenidas en la columna. Esto sugiere que a medida que se hidrolizan las proteínas de soja se generan péptidos hidrofóbicos que en la proteína original estarían ocultos en el interior de su estructura globular.

2.4.2- Cromatografía de exclusión molecular

Se analizan las muestras de los hidrolizados de soja a los tiempos 30, 90 y 180 min por CEM con el objetivo de separar alguna fracción peptídica y analizar su actividad antioxidante. Se obtienen los perfiles que se muestran a continuación. Los gráficos muestran las lecturas a 280 nm en función del tiempo de retención.

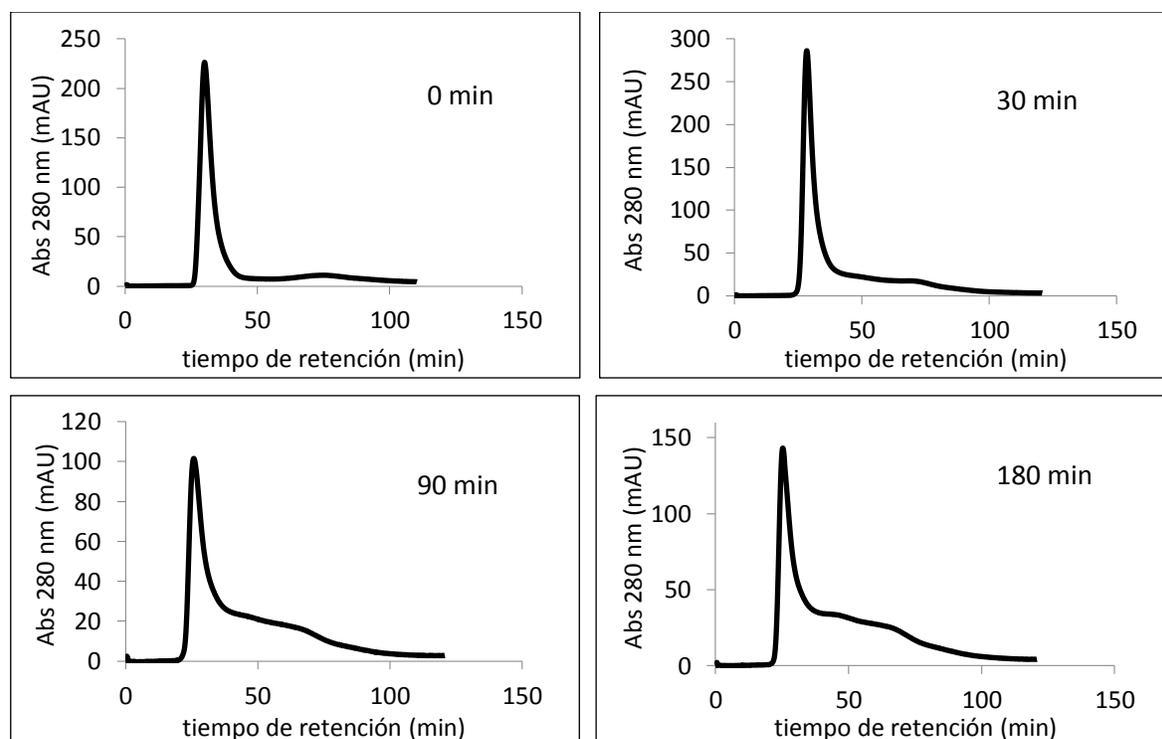


Figura 14: Cromatografía de exclusión molecular. Análisis de los hidrolizados a 0, 30, 90 y 180 min. Se midió la absorbancia a 215, 280 y 330 nm.

Se puede observar que para el blanco (t0) y la muestra a 30 min no se detectan grandes variaciones en el perfil obtenido, mostrando un pico pronunciado al inicio de la salida de la muestra (correspondiente a aquellos polipéptidos que eluyen con el buffer sin ser retrasados por la porosidad del relleno) seguido de una pequeña cola. Sin embargo, en los hidrolizados de 90 y 180 min esta cola u hombro (que corresponde a péptidos más pequeños generados durante la hidrólisis) se vuelve más importante con el tiempo de reacción. En base a esto se decide buscar un modo de fraccionar aquellos péptidos de menor masa molecular para volver a pasarlos por la columna, y así lograr una mejor resolución; estas fracciones serán utilizadas en ensayos posteriores.

3- BÚSQUEDA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.1- MÉTODO DEL β -CAROTENO

Se analizaron por el método del β -caroteno las muestras de los hidrolizados de los tiempos 30, 90 y 180 min, y los respectivos blancos tal como se describe en Materiales y Métodos (Parte B, sección 5.1). Considerando que se presentan dificultades para utilizar este método en muestras con péptidos de elevado peso molecular (debido a la formación de suspensiones opalescentes que dificultan la lectura por espectrofotómetro), se optó por filtrar los hidrolizados con membrana de 3 kDa.

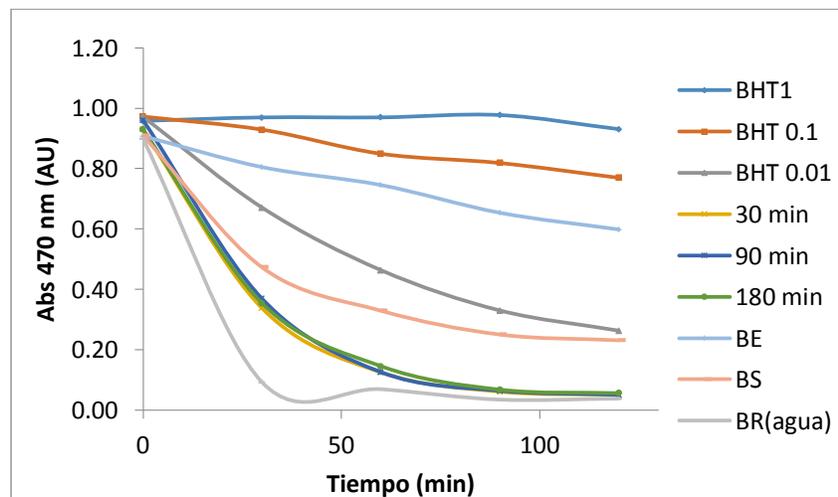


Figura 15: Ensayo de β -caroteno. Hidrolizados (30, 90 y 180 min); blancos (de reactivo, de enzima y de sustrato) y curva de calibración (0,01; 0,1 y 1 mg/ml de BHT).

Sin embargo, como se puede observar en el gráfico (Figura 14), no se encontró actividad antioxidante en las muestras tratadas de este modo. Se entiende que si hay presencia de péptidos con actividad, éstos podrían ser de un peso molecular superior a 3 kDa o menores de 3 kDa y encontrarse en baja concentración, por lo que no pudieron determinarse con este método. En otros trabajos se ha criticado esta técnica por otros inconvenientes como su baja reproducibilidad, problemas de cuantificación, formación de los radicales e interferencia con distintos factores como la temperatura, el pH, la presencia de metales y tipo de solvente (Prieto *et al.*, 2012).

3.2- MÉTODO DEL RADICAL ABTS⁺

Se realizó la detección de la actividad antioxidante por el método de radical ABTS⁺, como se describe en Materiales y Métodos (Parte B sección 5,2), en las muestras de hidrolizado de los tiempos 30, 90 y 180 min, y los blancos de enzima (BE) y de sustrato (BS). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16, donde se muestra el análisis estadístico (ANOVA), seguido del test de Tukey para comparar diferencias significativas entre pares de datos.

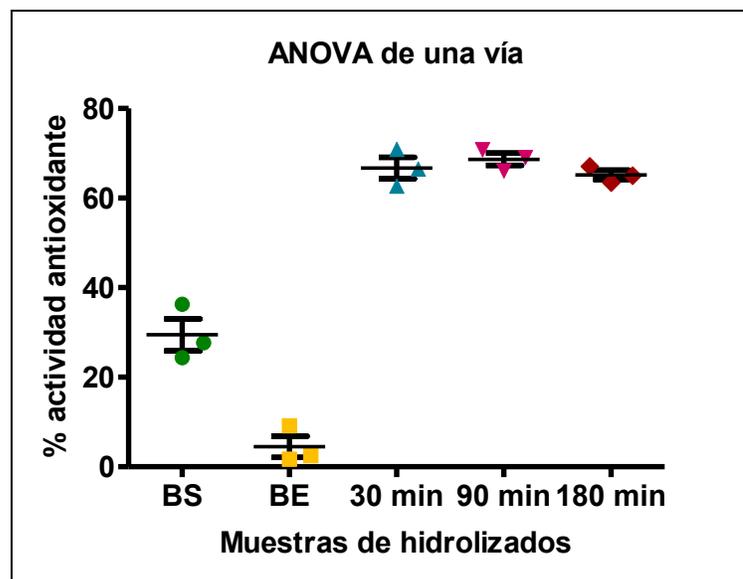


Figura 16: *Ensayo del radical ABTS⁺*. Análisis de los hidrolizados a distintos tiempos. BS: blanco de sustrato, BE: blanco de enzima, hidrolizados (min): 30, 90 y 180.

Se observa que los hidrolizados a los tres tiempos analizados muestran un porcentaje de actividad antioxidante superior a sus respectivos blancos ($p < 0,05$), donde la mayor actividad es recuperada a los 90 min de reacción ($68 \pm 2 \%$). Mediante la confección de la curva de calibración con Trolox en el rango 0,025 – 0,25 mg/ml (Figura 17), se estimó la capacidad antioxidante equivalente (TEAC) obteniendo un valor de 172,5 $\mu\text{mol TE/g}$ proteína para el hidrolizado de 90 min, obtenida restando los valores correspondientes al blanco de sustrato y blanco de enzima.

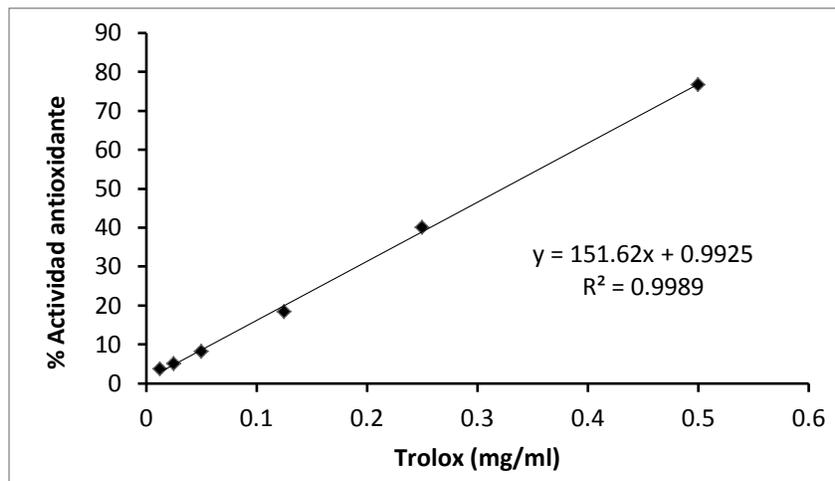


Figura 17: Curva de calibración de Trolox.

Si bien muchos extractos naturales son menos potentes que los antioxidantes sintéticos, debe tenerse en cuenta que los primeros pueden utilizarse en concentraciones mayores debido a que las restricciones por cuestiones toxicológicas son menores. Estos resultados se correlacionan con los descriptos previamente en el trabajo de Medrano *et al.* (2010) con valores entre 100 y 250 $\mu\text{moles TE/g}$, empleando PSG y Flavourzyme sobre glicinina correspondiendo dicha actividad a la fracción peptídica con masas ≤ 10 kDa. Por otro lado en el trabajo de Moure *et al.* (2006), se obtuvieron valores (superiores) de entre 820 y 3280 $\mu\text{moles TE/g}$ de proteína, en hidrolizados de soja obtenidos empleando Flavourzyme correspondiendo dicha actividad a péptidos con masas entre 30 - 50 kDa.

3.2.1- Cálculo de la IC_{50}

Se determinó la concentración efectiva media (IC_{50}) del hidrolizado de 90 min realizando una serie de diluciones de la muestra y calculando el porcentaje actividad antioxidante para cada una de ellas.

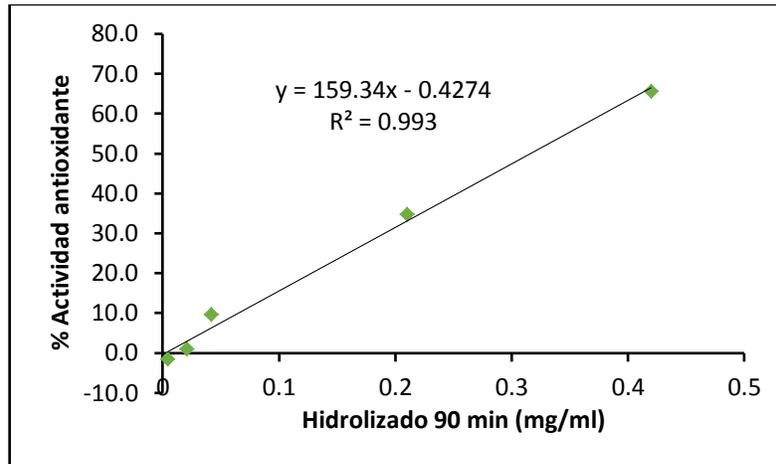


Figura 18: Cálculo de la IC_{50} por el método $ABTS^+$ del hidrolizado de 90 min.

Se obtuvo una concentración de $0,316 \pm 0,018$ mg/ml de hidrolizado para el 50% de actividad, un valor comparable con la IC_{50} del antioxidante sintético TROLOX, utilizado para las curvas de calibración, de $0,323 \pm 0,007$ mg/ml.

3.2.2- Empleo de filtros con distinto tamaño de poro

Con motivo de acotar las masas moleculares en las muestras de hidrolizado para llegar a realizar una caracterización más precisa de los péptidos responsables de la actividad antioxidante, se utilizaron filtros de membrana con distintos tamaños de poro. Se seleccionó el hidrolizado de 90 min por presentar la mayor actividad antioxidante y se analizaron los filtrados de 3, 10 y 30 kDa. Los resultados se muestran en la Figura 19.

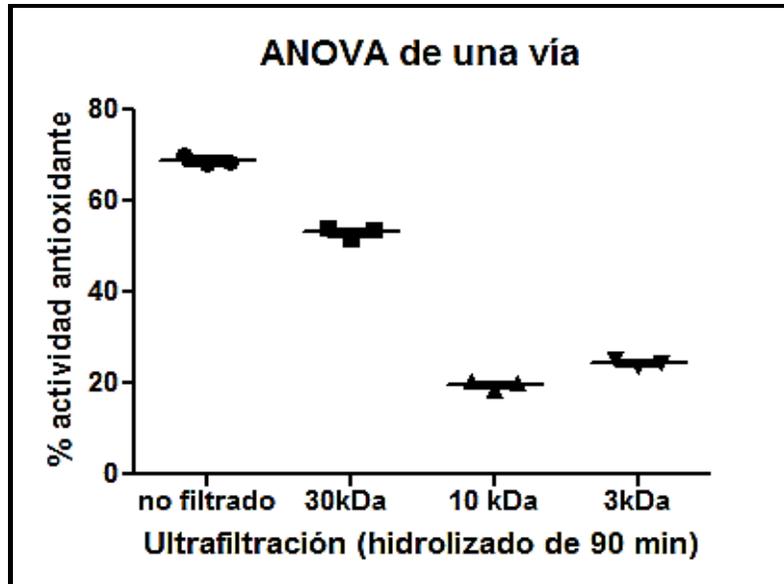


Figura 19: Ensayo del radical $ABTS^+$. Muestras de hidrolizado de 90 min de soja: s/filtrar y filtrado con membrana de 3 kDa, 10 kDa y 30 kDa.

Se observa que la mayor actividad antioxidante se detecta en el filtrado de 30 kDa, que conservó hasta el 71% de la actividad respecto del no filtrado.

3.2.3- Análisis del filtrado de 30 kDa por exclusión molecular

Se utilizó la columna de exclusión molecular (G25) para fraccionar los péptidos presentes en la muestra de hidrolizado de 90 min filtrado con membrana de 30 kDa (Figura 20), en la cual se había detectado mayor capacidad antioxidante por el método $ABTS^+$.

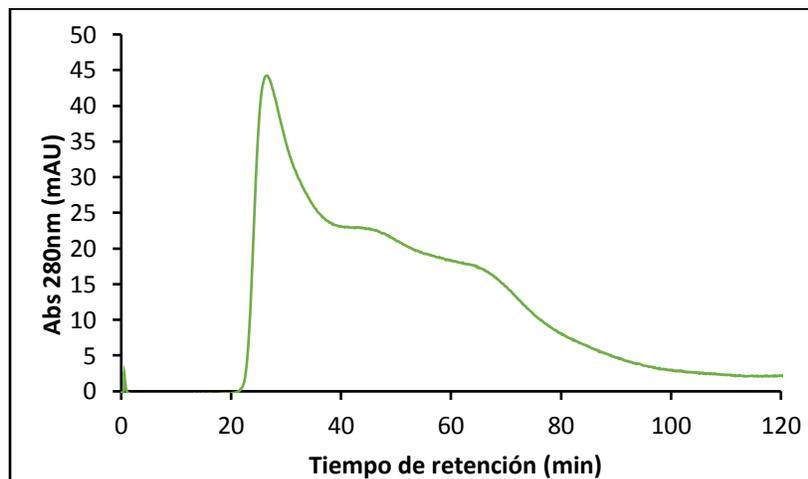


Figura 20: Cromatografía de exclusión molecular. Hidrolizado de 90 min filtrado con 30 kDa.

Como se observa en la figura, la etapa de filtración con membrana de 30 kDa logró descartar una gran cantidad de polipéptidos de mayores masas moleculares (primer pico al comienzo de la elución). A partir del perfil obtenido se colectaron fracciones de 4 ml/tubo (a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min) desde el comienzo de la aparición de los picos para ser posteriormente analizadas por el método del ABTS y determinar su actividad antioxidante. Esta metodología de separación en fracciones también fue empleada por Abu Salem *et al.* (2013) para una muestra de hidrolizado de aislado de soja. Se obtuvieron 10 fracciones en total; los resultados para cada una de ellas se expresan como concentración de Trolox (mg/ml) equivalente, normalizando previamente la concentración péptica realizando un cociente del área de cada fracción respecto del área total del cromatograma obtenido a 280 nm.

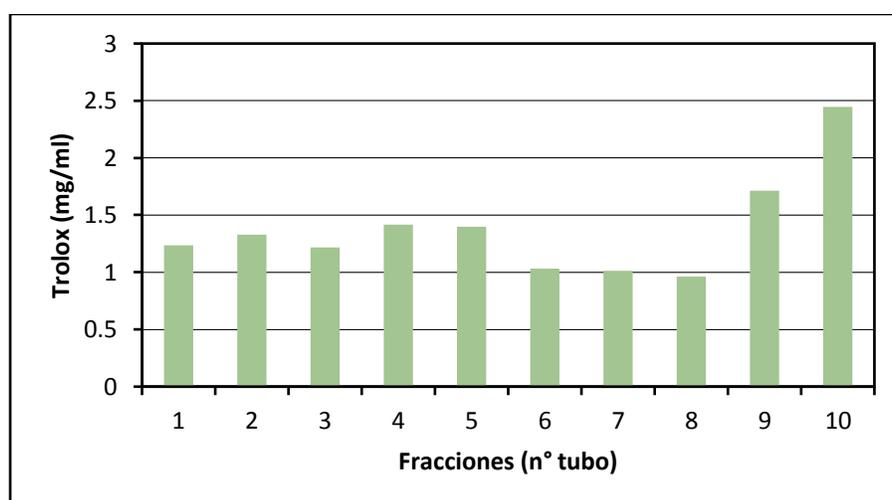


Figura 21: *Ensayo del radical ABTS⁺*.
Análisis de las fracciones obtenidas de la CEM (4 ml/tubo).

En la figura se observa que las últimas fracciones colectadas (9 y 10) presentaron una actividad levemente superior a las fracciones iniciales, es decir, que la mayor actividad en este filtrado correspondería a aquellos péptidos de menor tamaño.

3.3- ENSAYO DE PODER REDUCTOR

Se buscó determinar la capacidad reductora de la muestra de hidrolizado de 90 min sin filtrar y filtrada con 30 kDa, en la que se había detectado por el método del radical ABTS⁺ mayor actividad antioxidante. El ensayo se realizó de acuerdo a lo

descrito en Materiales y Métodos (Parte B, sección 5.3). La Figura 22 muestra la curva de calibración confeccionada con cisteína, la cual muestra una linealidad aceptable, con un R^2 de 0.9988.

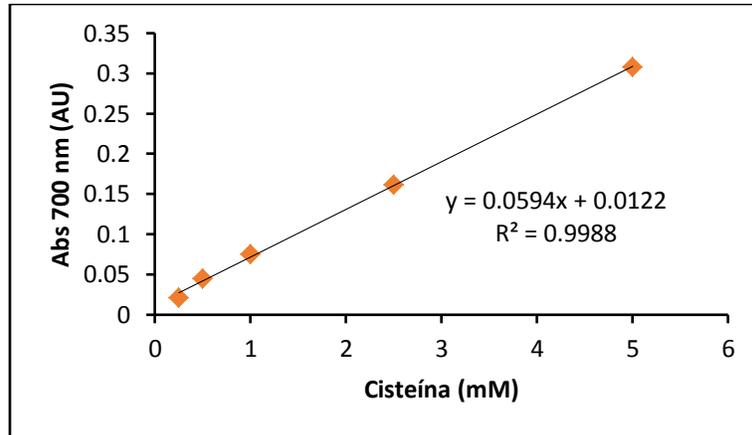


Figura 22: Curva de calibración de cisteína.

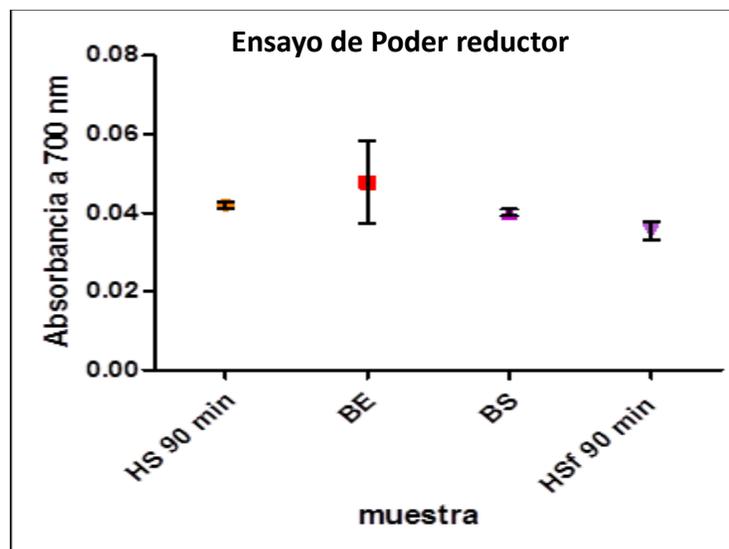


Figura 23: Medida de absorbancia a 700 nm y análisis estadístico con ANOVA. Hidrolizado de 90 min (HS 90 min) y filtrado con 30 kDa (HSf 90 min), blancos de enzima (BE) y de sustrato (BS).

La Figura 23 muestra el análisis de varianza de las muestras de hidrolizado de 90 min filtrado con 30 kDa y sin filtrar, y los respectivos blancos. Cuando se analizaron los datos de absorbancia a 700 nm por el ANOVA seguido del test de Tukey se observa que no existen diferencias significativas entre los grupos de datos correspondientes a los hidrolizados de 90 min filtrados y sin filtrar ($p > 0.05$) así como tampoco entre éstos y

sus blancos de enzima y de sustrato ($p>0.05$). Esto verifica, como se mencionó anteriormente, que no necesariamente hay correlación entre los distintos métodos de detección actividad antioxidante.

3.4- MÉTODO ORAC

Se realizó la determinación de actividad antioxidante por el método de ORAC de las muestras de hidrolizado de 90 min filtrado con 30 kDa y sin filtrar. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 24 a continuación.

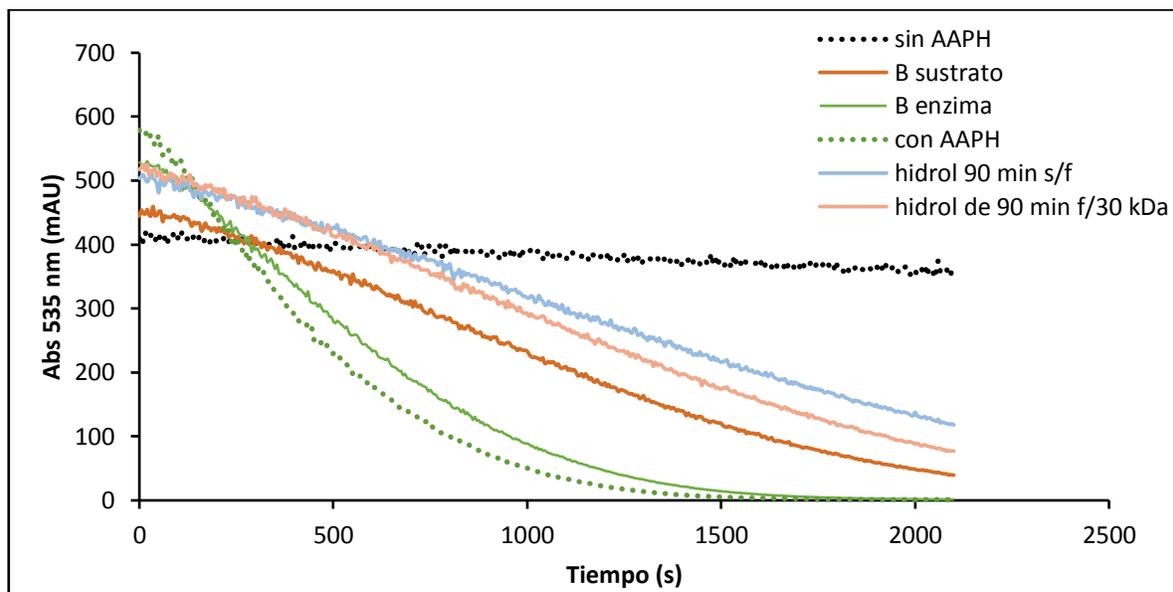


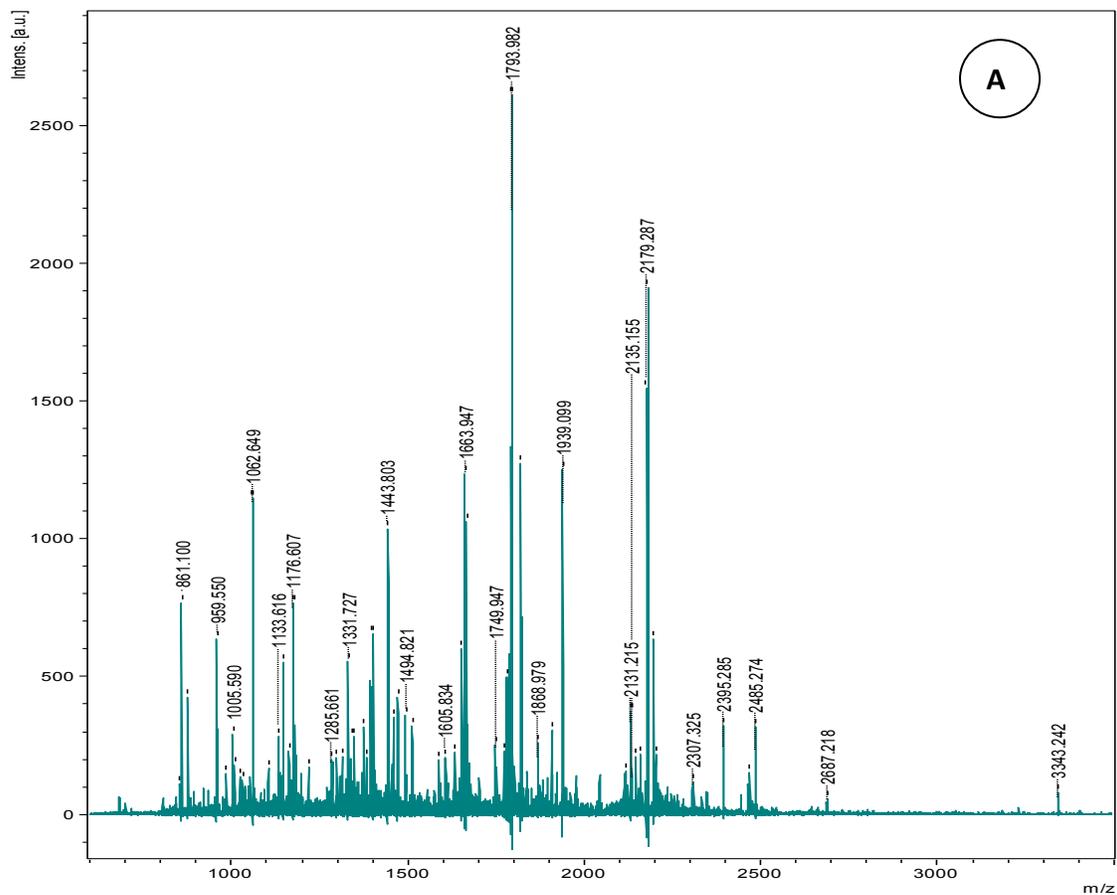
Figura 24: *Ensayo de ORAC.* Muestras: hidrolizado de 90 min, sin filtrar y filtrada con 30 kDa; blancos: de enzima y de sustrato; controles del método: con y sin AAPH

Se observa que las curvas correspondientes a los hidrolizados de 90 min (filtrado y sin filtrar) quedaron por encima de las curvas de los blancos de sustrato y enzima, lo que verifica presencia de actividad antioxidante en estas muestras. Mediante el análisis de las áreas bajo las curvas, se determinó un valor de TEAC de 176,9 μ moles TE/mg proteína para el hidrolizado de 90 min sin filtrar, pudiéndose conservar en el filtrado con 30 kDa un 87% de esa actividad, una proporción levemente superior a la obtenida por el método del ABTS⁺ (71%, inciso 3.2.1); sin embargo esto es de esperar ya que se los distintos métodos poseen distintos mecanismos de reacción. Por lo tanto,

se concluye presencia de actividad antioxidante en dichos hidrolizados, hecho verificado por dos técnicas diferentes.

4- ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Se determinaron las masas de los péptidos del hidrolizado de 90 min filtrado con 30 kDa (Figura 24A y 24B). En estas figuras se puede observar que se obtuvo un gran número de picos con masas <8000 Da. Si bien se esperaba encontrar péptidos con masas un poco superiores, ya que se observó un salto de actividad entre el filtrado con 10 kDa y 30 kDa, esto podría explicarse a la tendencia de los hidrolizados proteicos de agregarse con el tiempo de almacenamiento, como se reportó en el trabajo de Lv *et al.* (2009). Por lo tanto, no necesariamente todos péptidos comprendidos entre 10 y 30 kDa estarían en el filtrado.



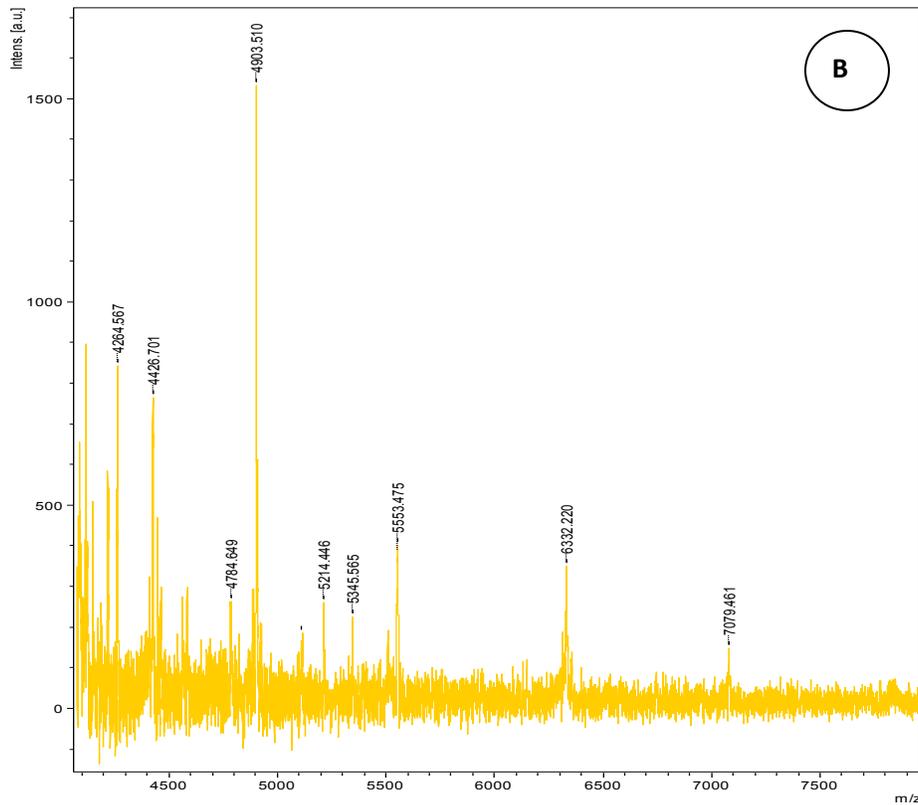


Figura 25: MALDI-TOF MS del hidrolizado de 90 min filtrado con 30kDa. A- Masas moleculares de 0-4 kDa. B- Masas moleculares de 4-8 kDa.

A partir de los espectros de masas se seleccionaron aquellos picos cuya intensidad fue mayor a 500 a.u. y se realizó un análisis bioinformático para intentar deducir las posibles secuencias de los péptidos presentes en ellos. Se tomaron las secuencias de las principales proteínas de aislado de soja de la base de datos UniProt y se ubicaron en ellas las secuencias de péptidos cuyas masas coincidieron con las obtenidas por el espectro de masas (Δ masas $\leq 0,01$ Da; herramienta FindPept). La Tabla 27 muestra las posibles secuencias de los péptidos, su ubicación en la proteína original y la diferencia de masas entre el valor teórico y el arrojado por el MALDI. En las secuencias teóricas de los péptidos se resaltaron aquellos aminoácidos que tienen características antioxidantes (Wang *et al.*, 2007) y se calculó el porcentaje de los mismos respecto del total de aminoácidos del péptido.

Tabla 27: Análisis de las masas obtenidas por MALDI

Proteína de origen	Secuencias de péptidos deducidas (corte virtual inespecífico)	Δ masas	Posición	Porcentaje de aác antiox. en la secuencia peptídica
Subunidad B (glicinina)	KYQNSGPLVN	-0.006	505-515	9,1
	NAVFDGELRR	0.004	432-441	10
	VFDGELRRGQ	0.004	434-443	10
	SYIKDVFRVIPSEV	0.006	476-489	14
	SVT <u>M</u> TRGKGRV <u>R</u> VV <u>N</u> <u>C</u>	0.007	414-429*	25
Subunidad α (β -conglucina)	PPHQKEERK	-0.003	158-166	11
	DADY <u>L</u> LIVILN	-0.001	252-261	10
	<u>T</u> LFKNQYGRIR	-0.003	205-215	27
	GLV <u>F</u> LASVSV <u>S</u> FGI	0.000	12-25	14
	LGLV <u>F</u> LASVSV <u>S</u> FG	0.000	11-24	14
	<u>R</u> F <u>E</u> TLFKNQY <u>G</u>	-0.009	202-212	36
	<u>F</u> E <u>T</u> LFKNQY <u>G</u> R	-0.009	203-213	36
	<u>H</u> KNKN <u>P</u> <u>F</u> <u>L</u> FGSN	0.001	190-201	25
	ITPEKNPQLRDLDI	0.002	425-438	7
	SKRAKSSSRK <u>T</u> ISSE	0.009	388-402	7
	LLPN <u>H</u> ADADY <u>L</u> LIVILN	-0.002	246-261	13
	PLLLLGLV <u>F</u> LASVSV <u>S</u> FGIAY	-0.009	7-27	14
Subunidad α' (β -conglucina)	<u>F</u> NKRSQQLQ	-0.003	236-244	11
	DADY <u>L</u> LIVILN	-0.001	268-277	10
	LQG <u>F</u> SKNILE	0.009	350-359	10
	VV <u>F</u> LASVSV <u>S</u> FGIA	0.000	13-26	14
	PAGY <u>P</u> VVVNAT <u>S</u> DL	0.000	525-538	14
	IPAGY <u>P</u> VVVNAT <u>S</u> D	0.000	524-537	14
	QQKEEGNKGRKGPLSSILRA	-0.002	600-619	-
Subunidad β (β -conglucina)	NQRN <u>F</u> LAGEK	0.004	368-377	10
	LSRRAKSSSRK <u>T</u> ISS	0.009	221-235	7

Se encontró un valor ≥ 25 % para los péptidos SVTMTRGKGRVRVVNC, (subunidad B de la glicinina), y TLFKNQYGRIR, RFETLFKNQYG, FETLFKNQYGR y HKNKNPFLFGSN de la subunidad α de la β -conglucina. Si comparamos estas secuencias con las de los péptidos antioxidantes descritos por Fukushima (2008) pertenecientes a la β -conglucina (VNPHDHQN, LVNPHDHQN, LLPHH y LLPHHADADY), se obtuvieron valores de porcentaje de aminoácido antioxidantes de 25, 22, 40 y 30% respectivamente. Por lo tanto, las secuencias teóricas

obtenidas presentarían valores de proporción de aminoácidos antioxidantes aceptables respecto de las publicadas por este autor.

Como trabajo a futuro se propone tomar las fracciones (9 y 10) obtenidas de la columna de exclusión molecular para la muestra de 90 min de hidrolizado filtrado con 30 kDa, secuenciar los péptidos presentes en ellas, seleccionar aquellos con mayor proporción de aminoácidos antioxidantes y sintetizarlos *in vitro* para realizar una caracterización de los mismos.

CONCLUSIONES

PARTE A: Purificación y caracterización de una proteasa a partir del látex de *Maclura pomifera*

A partir del látex extraído de frutos de *Maclura pomifera* se obtuvieron extractos crudos con una AE en el rango de $4,1 \pm 0,2 - 5,4 \pm 0,6$ Ucas/mg. Mediante una purificación parcial por precipitación con acetona (proporción 1:1 con el EC) se removió parte de las sustancias no proteicas de la muestra, conservando el 49% de actividad y el 13% de proteínas, obteniendo una AE de $16,7 \pm 0,8$ Ucas/mg. La purificación con la columna de intercambio catiónico de esta muestra de PAR permitió obtener una de las proteasas mayoritarias del látex, con una AE de $32,3 \pm 0,4$ Ucas/mg (factor de purificación: 7,8), con un pI de 8,7 determinado por isoelectroenfoque, y una masa molecular de 63,177 kDa determinada por espectrometría de masas. Se comprobó actividad esterolítica en esta proteasa con el sustrato N- α -CBZ-p-nitrofenil éster de alanina. Se analizó su comportamiento cinético, determinando que presentaba un mejor ajuste a una cinética sigmoidea (ecuación de Hill) que un comportamiento Michaeliano, obteniendo una valor de 8,75 μ M p-nitrofenol/s para Vmax y 0,1275 mM para la concentración de sustrato que da la mitad de Vmax ($S_{0,5}$); con un n (n° de sitios de unión sustrato-enzima) de 1,7. Estos resultados sugieren que podría tratarse de una enzima con más de una subunidad.

PARTE B: Obtención de péptidos con actividad antioxidante a partir de proteínas de soja empleando proteasas del látex de *Maclura pomifera*

A partir de la muestra de EC obtenida en la Parte A se realizó una purificación parcial por precipitación con etanol (proporción 1:1) consiguiendo una AE de $3,9 \pm 0,1$ Ucas/mg en el extracto final (PER). Se preparó un aislado de proteínas de soja a partir de harina desgrasada conteniendo una concentración de $41,7 \pm 2,6$ mg/ml de proteínas determinada por Lowry. Se realizó la etapa de hidrólisis manteniendo una proporción 1:9 (enzima:sustrato) a 45 °C en agitación durante 3 h, tomando alícuotas a distintos tiempos y deteniendo la reacción por shock térmico (7 min a 100 °C). Se verificó que las proteínas de soja (tanto glicinina como β -conglucina) fueron hidrolizadas por proteasas del látex, obteniendo un bandeo de péptidos de masas

inferiores a 16 kDa, determinado por SDS-PAGE de 13,5% T, y de carácter más hidrofóbico que las proteínas de origen, deducido en base al perfil obtenido por HPLC-FR. Las muestras de hidrolizado de 30, 90 y 180 min fueron evaluadas por distintas técnicas para determinar su actividad antioxidante; se obtuvo el mayor valor en el hidrolizado de 90 min, detectado por los métodos de ABTS⁺ y ORAC, presentando valores de TEAC de 172,5 y 176,9 μmol de TE/mg proteína respectivamente, comparables con otros hidrolizados proteicos de soja. En esta determinación se realizó un análisis de varianza seguido del test de Tukey (diferencias significativas, $p < 0,05$). La muestra contuvo un grado de hidrólisis de 28,7% y una IC₅₀ de $0,316 \pm 0,018$ mg/ml. Estos valores sugieren la posibilidad de emplear este hidrolizado de soja en la industria alimenticia, tanto como conservante (sustituto de un antioxidante sintético) como en la formulación de un alimento funcional.

Las fracciones del hidrolizado de 90 min filtrado con 30 kDa que eluyeron al final de la columna de exclusión molecular, arrojaron los valores más altos de actividad antioxidante (superior a 2 mg/ml de concentración de Trolox), pudiendo a futuro a partir de los mismos continuar con su aislamiento, identificación y caracterización. Un análisis bioinformático de los valores de las masas (MALDI) de los péptidos presentes en este hidrolizado, permitió asignarles a aquellos péptidos que se encontraban en mayor concentración, una secuencia tentativa e identificando en los mismos 5 péptidos con una proporción $\geq 25\%$ de aminoácidos con características antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen J. (1979) "Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid.", *Journal Agriculture Food Chemistry*, **27**:1256-1262.
- Aehle W. (2006) "Enzymes in industry: production and applications." Wiley-VCH, Weinheim. Pgs. 110 y 145.
- Ahmed I. A. M., Morishima I., Babiker E. E. & Mori N. (2009) "Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium Fresen*". *Phytochemistry*, **70**: 483-491.
- Abu-Salem F. M., Mahmoud M. H., El-Kalyoub M. H., Gibriel A. Y. & Abou-Arab A. (2013) "Characterization of Antioxidant Peptides of Soybean Protein Hydrolysate". *International Journal of Agricultural, Biosystems Science and Engineering*. **7**: 249-253.
- Alvarado Carrasco C. & Guerra M. (2010) "Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos." *Anales Venezolanos de Nutrición*, **23**(1):45-50.
- Arcila-Lozano C. C., Loarca-Piña G., Lecona-Urbe S. & González de Mejía E. (2004) "El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes" Revista vol 54, N°1, Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Sociedad Latinoamericana de Nutrición, Venezuela.
- Asif-Ullah Mufti, Kim Key-Sun & Yu Yeon Gyu (2006) "Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus Roxburghi*". *Phytochemistry*, **67**: 870–875.
- Barrett A. J., Rawlings N. D. & O'Brien E. A. (2001) "The MEROPS Database as a Protease Information System", *Journal of Structural Biology*, Elsevier
- Barrett A. J., Rawlings N. D. & Woessner J. F. (2004) Introduction in "Handbook of Proteolytic enzymes" 2ed Elsevier Academic Press, vol 2.
- Basso N., Paglia N., Stella I., Cavanagh E., Ferder L., Lores Arnaiz M.R. & Inserra F. (2005) "Protective effect of the inhibition of the renin–angiotensin system on aging". *Regulatory Peptides*, **128**:247-252.
- Bertucci J. I. (2012) "Búsqueda de péptidos bioactivos en hidrolizados de lactosuero

- bovino obtenidos empleando fitopeptidasas”, Trabajo final.
- Bhalodi M., Shukla S. & Saluja A. K. (2008) Research Article “In-vitro Antioxidant activity of the flowers of *Ipomoea aquatic* Forsk.” *Pharmacognosy Magazine*, **4**:226-230.
- Bradford, M. M. (1976) “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding” *Analytical Biochemistry*, **72**:248-254
- Bruno M. A., Lazza C. M., Errasti M. E., López L. M.I., Caffini N. O. & Pardo M. F. (2010) “Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits”, *LWT – Food Science and Technology*, **43**:696-701.
- Buchanan B. B., Grussen W. & Jones R. L. (2000) “Biochemistry and molecular Biology of Plants”. *American Society of Plant Physiologists Rockville, M.D.*, pgs.75-82.
- Caffini N.O., Natalucci C. & Salas Bravo C. (2009). “Tipos de proteasas, distribución y rol en los vegetales“ en “Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales”. -Primera edición- Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Editor: Dr. Caffini, N.O. ISBN: 9789879641361. Buenos Aires, Argentina. Pgs: 9 y 10.
- Christen Y. (2000) “Oxidative stress and Alzheimer’s disease”. *American Journal of Clinical Nutrition*, **71**(2):621-629.
- Corrons M. A., Bertucci J. I., Liggieri C. S., López L. M. I. & Bruno M. A. (2012) “Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases”. *Food Science and Technology (LWT)*, **47**:103-109.
- Coussens L. M., Fingleton B. & Matrisian L. M. (2002) “Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations.” *Science*, **295**:2387-2392.
- De Mejía E. & De Lumen B. (2006) “Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases”. *Sexuality, reproduction and menopause*. **4**:91-95
- Devlin T. M. (2004) “Bioquímica. Libro de Texto con aplicaciones clínicas.” 5ta edición, Ediciones Reverté, Barcelona, España. pág. 379.
- Domsalla A. & Melzig M. F. (2008) “Occurrence and properties of proteases in plant lattices.”. *Planta Medica*, **74**:699-711.

- Feijoo-Siota L. & Villa T. J. (2011) "Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications". *Food and Bioprocess Technology*, **4**:1066-1088.
- Fukushima, D. (2011) "Soy proteins" c/o Noda Institute for Scientific Research, Japan en "Handbook of food proteins", 2011-Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 222, Editor: G. O. Phillips & P. A. Williams, Ed. Woodhead Publishing Limited, ISBN: 9780857093639, pág 210 y 211, Cambridge, UK.
- García Pérez H. M. (2000) "Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia." *Universo Diagnóstico*, **1**(2):31-41.
- Gibbs B. F., Zougman A., Masse R. & Mulligan C. (2004) "Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food" *Food Research International*, **37**:123-131.
- Guadix A., Guadix E. M., Páez-Dueñas M. P., González-Tello P. & Camacho F. (2000) "Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas". *Ars Pharmaceutica*, **41**:79-89.
- Kim G. N., Jang H. D. & Kim C. I. (2007) "Antioxidant capacity of caseinophosphopeptide prepared from sodium caseinate using Alcalasa". *Food Chemistry*, **104**: 1359-1365.
- Kirk O., Borchert T. V. & Fuglsang C. C. (2002) "Industrial enzyme applications". *Current Opinion in Biotechnology*, **13**:345-351.
- Kitts D. D. & Weiler K. (2003) "Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery". *Current Pharmaceutical Design*, **9**:1309-1323.
- Korhonen H. & Pihlanto A. (2006) "Bioactive peptides: Production and functionality". *International Dairy Journal*, **16**:946-960.
- Kumari M., Sharma A. & Jagannadham M. V. (2012) "Religosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*". *Food Chemistry*, **131**: 1295-1303.
- Leary D., Vierros M., Hamon G., Arico S. & Monagle C. (2009) "Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest". *Marine Policy*, **33**:183-194.

- Lehninger A.L., Nelson D.L. & Cox, M.M. (2005). Capítulos 4, 5 y 6 en “Principles of Biochemistry”. 4th Edition. W.H. Freeman. Pgs: 190-236. New York, USA.
- Liggieri C., Obregon W., Trejo S. & Priolo N. (2008) “Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L.”. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **41**(2):154-162.
- Liggieri C., Natalucci C., Obregón W., Sequeiros C., Trejo S. & Priolo N. (2009) “Proteasas de *Asclepiadaceae*” en “Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales”. -Primera edición- Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Editor: Dr. Caffini, N.O. ISBN: 9789879641361. Buenos Aires, Argentina. Pgs: 13-19.
- López L. M.I., Claudia L. N. & Caffini N. O. (1989) “Proteasas Presentes en el Látex de Frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae)”. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **8** (3):179-185.
- López, L. M. I., Natalucci, C. L., Caffini, N. O. & Curotto, E. (1993). “Isolation and partial characterization of serine proteinases present in the latex of *Maclura pomifera* (“Osage orange”) fruits.” *Acta Alimentaria*, **22**:131-142.
- López L. M. I., Brullo A., Natalucci C. L., Caffini N. O., Sorgentini D. & Wagner, J. (1998). “Thermal behavior, solubility and structural properties of soy concentrate hydrolyzed by new plant proteases.” *Journal of Food Biochemistry*, **22**:125-141.
- López L. M. I. & Lazza C. M. (2009) “Proteasas de Moraceae” en “Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales”. -Primera edición- Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Editor: Dr. Caffini, N.O. ISBN: 9789879641361. Págs: 71 y 72. Buenos Aires, Argentina.
- Lv Y., Guo S. & Yang B. (2009) “Aggregation of hydrophobic soybean protein hydrolysates: Changes in molecular weight distribution during storage”. *Food Science and Technology*, **42**:914–917.
- Maccioni R.B., Otth C., Concha I.I. & Munoz J.P. (2001) “The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer’s pathology”. *European Journal Biochemistry*, **268**:1518-1527.

- Malawer E. G. (1995) "Introduction to Size Exclusion Chromatography" in "Handbook of Size Exclusion Chromatography" New York, U.S.A Edited by Chi-san Wu in "Chromatographic science series" collection- volumen 69. ISBN: 0824792882. Pgs.: 1-5.
- Marcuse R. (1960) "Antioxidative effect of amino-acids". *Nature*, **186**: 886-887.
- Marinova M., Cuc N. T. K. & Tchorbanov B. (2008) "Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by food grade proteinases and aminopeptidases of plant origin". *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **22**:835-838.
- Martínez-Tomé M., Jiménez A.M., Ruggieri S., Frega N., Strabbioli R. & Murcia M.A. (2001) "Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives". *Journal of Food Protection*, **64** (9):1412-1419.
- Medrano A. & Del Castillo M. D. (2011) "Obtención de péptidos antioxidantes de glicinina de soja". *INNOTEC-Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*, **6**:32-36.
- Moure A., Dominguez H., Parajo J. C. (2006) "Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates". *Process Biochemistry*, **41**: 447-456.
- Messdaghi D. & Dietz K. J. (2000) "Characterization of an extracellular chymostatin-sensitive serine protease preferentially expressed in young plant tissues". *Biochimica et Biophysica Acta*, **1480**: 107-116.
- Nishinari K., Fanga Y., Guo S. & Phillips G. O. (2014) "Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification". *Food Hydrocolloids*, **39**:301-318.
- Obregón W. D., Cursiarello R., Caffini N. O. & Priolo N. S. (2006) "Hidrolitic profile and isolation of the proteolytic component of látex from *Araujia angustifolia* fruits". *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **25**:206-212.
- Obregón W. D. (2008) "Hidrolasas de látex de especies del género araujia. purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas". Tesis Doctoral.
- Obregón W. D., Hernández M. y Priolo N. (2009) "Métodos de Obtención de Proteínas Vegetales" en "Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales". -Primera edición- Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Editor: Dr. Caffini, N.O. ISBN: 9789879641361.

- Págs: 138-140. Buenos Aires, Argentina.
- Peña Alonso J. R. (2011) "Manual de histología vegetal" Ediciones Mundi Prensa. Impreso en España. ISBN: 9788484764298. Versión digital. Cap. 4: Parénquima, Pág 72-75.
- Peña-Ramos E.A. & Xiong Y.L. (2001) "Antioxidative activity of whey protein hydrolyses in a liposomal system" *Journal of Dairy Science*, **84**:2577-2583.
- Peterson G.L. (1979) "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall". *Analytical Biochemistry*, **100**:201-220.
- Prieto M. A., Rodríguez-Amado I., Vázquez J. A. & Murado M. A. (2012) "β-Carotene Assay Revisited. Application To Characterize and Quantify Antioxidant and Prooxidant Activities in a Microplate". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**: 8983-8993.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. & Rice-Evans C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Radical Biology & Medicine*, **26**:1231-1237.
- Rábade-Gonzalez N., Corona-Badillo J. A., Aranda-Barradas J. S. & Oliver-Salvador M. C. (2011) "Production of plant proteases in vivo and in vitro-A review". *Biotechnology Advances*, **29**:983-996.
- Ralison S. S., Tounkara F., Karangwa E., Yong H. S. & Le G.W (2013) "In Vitro Antioxidant Activities of Protein Hydrolysate from Germinated Black Soybean (*Glycine max* L.)". *Advance Journal of Food Science and Technology*, **5**(4): 453-459.
- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2013) "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." *Nucleic Acids Research*, **42**:1-7.
- Rawlings N. D. & Barrett A.J. (1993) "Evolutionary families of peptidases". *Biochemistry Journal*, **290**:205-218.
- Reyes Munguía A., Galicia Cardoso M. T. & Carrillo Inungaray M. L. (2011) "Antioxidantes: la magia de lo natural" Art. Revista académica de investigación, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
- Rodríguez-Delgado M.A., Malovana S., Pérez J. P., Borgesa T., García Montelongo F. J. (2001) "Separation of phenolic compounds by high-performance liquid q

- chromatography with absorbance and fluorimetric detection”. *Journal of Chromatography*, **912**: 249–257.
- Ruiz E. I. J., Calderón de la Barca A. M., Sotelo-Mundo R. R., Arteaga-Mackinney G. E., Valenzuela-Melendez M. & Peña-Ramos A. E. (2013) “Partial Characterization of Ultrafiltrated Soy Protein Hydrolysates with Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities” *Journal of Food Science*, **78**(8):1152-1158.
- Sakanaka S. & Tachibana Y. (2006) “Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates”. *Food Chemistry*, **95**:243-249.
- Saloua F., Eddine N. I. & Hedi Z. (2009) “Chemical composition and profile characteristics of Osage Orange *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider seed and seed oil”. *Industrial Crops and products*, **29**:1-8.
- Schaller A. (2004) “A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases”. *Planta*, **220**:183-197.
- Schägger H. (2006) “Tricine-SDS-PAGE”. *Nature Protocols*, **1**(1):16-22.
- Sharma A., Kumari M. & Jagannadham M. V. (2012) “Religin C, a cucumisin-like serine protease from *Ficus religiosa*”. *Process Biochemistry*, **47**: 914-921.
- Silverstein R. M. (1974) “The assay of the bromelains using N-CBZ-L lysine p-nitrophenyl ester and N-CBZ-L glycine p-nitrophenyl ester as substrates”. *Analytical Biochemistry*, **62**:478-484.
- Tauber H. (1949) “The Chemistry and Technology of Enzymes” J. Wiley & Sons ed., New York, pág. 171.
- Tiwari B. K., Valdramidis V. P, O` Donnell C. P., Muthukumarappan K., Bourke P. & Cullen P. J. (2009) “Application of natural antimicrobials for food preservation”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**:5987-6000.
- Torres M. J., Trejo S. A., Martin M. I., Natalucci C. L., Avilés F. X. & López L. M. I. (2010) “Purification and Characterization of a Cysteine Endopeptidase from *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. Latex Displaying High Substrate Specificity” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(20):11027-11035.

- Torres M. J., Trejo S. A., Obregón W. D., Avilés F. X., López L. M. I. & Natalucci C. L. (2012) "Characterization of the proteolytic system present in *Vasconcellea quercifolia* latex" *Planta*, **236**:1471-1484.
- Tsao R., Yang R. & Young J. C. (2003) "Antioxidant isoflavones in Osage Orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**:6445-6451.
- Valles D., Furtado S., Hernández M., Salas Bravo C. E. & Cantera A. M. B. (2009) "Potencialidades tecnológicas y perspectivas de aplicación" en "Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales". -Primera edición- Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Editor: Dr. Caffini, N.O. ISBN: 9789879641361. Pág: 187-200. Buenos Aires, Argentina.
- Voet D. & Voet J. G. (2006a) "Bioquímica". Ed. Médica Panamericana, pág 473.
- Voet D. & Voet J. G. (2006b) "Bioquímica". Ed. Médica Panamericana, pág.: 484.
- Voet D. & Voet J. G. (2006c) "Bioquímica". Ed. Médica Panamericana, pág.: 180.
- Wang J., Zhao M., Zhao Q. & Jiang Y. (2007). "Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems." *Food Chemistry*, **101**:1658-1663.
- Whitehurst, R.J. & Law, B.A. (2002) "Enzymes in food technology". CRC Press, Boca Raton, USA.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M. Wilson J. & Qian M. (2002) "Free radical scavenging properties of wheat extracts". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**:1619-1624.
- Yúfera E.P. (2007) "Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Tomo II" Universidad Politécnica de Valencia. Editorial Reverté. ISBN: 9788429179545 Barcelona, España. Edición digital. Capítulo 41: Proteínas IV: Enzimas, pág 1016.
- Zulueta A., Esteve M. J., Frígola A. (2009) "ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products". *Food Chemistry*, **114**:310-316.