

**UNIVERSIDAD:** Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas.

LIPROVE – Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba.

**NÚCLEO DISCIPLINAR:** Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones.

**TÍTULO DEL TRABAJO: FITOPROTEASAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA Y FARMACÉUTICA.**

**AUTOR/ES:** Abreu Payrol Juan, Colombo Laura, Almeyra Carla, Durante Natalia, Carranza G. Mauro y Obregón David.

**E-MAIL DE LOS AUTORES:** [davidobregon@biol.unlp.edu.ar](mailto:davidobregon@biol.unlp.edu.ar)

**PALABRAS CLAVES:** fitoproteasas, tecnología verde.

**PALAVRAS CHAVES:** fitoproteasas, tecnologia verde.

## INTRODUCCIÓN

Las proteasas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, necesarias para el crecimiento y adaptación de diversos organismos en el medio ambiente. Las mismas son utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica y otras relacionadas. Sus características específicas permiten a los industriales ejercer un control de calidad más estricto; con un menor consumo de energía y condiciones de tratamiento más ligeras, además pueden utilizarse para tratar los desechos biológicos resultantes de la fabricación de alimentos, puesto que las propias enzimas son biodegradables. Se ha comprobado que los procedimientos modernos de fabricación de alimentos, benefician tanto a los sectores industriales como a los consumidores.

Si bien la mayoría son de origen animal o microbiano, en los últimos años ha tenido gran desarrollo la investigación de proteasas de origen vegetal, dando lugar a lo que hoy se conoce como "tecnología verde".

A diferencia de otros usos industriales para las enzimas, las aplicaciones médicas y farmacéuticas de las mismas requieren generalmente pequeñas cantidades de enzimas muy purificadas. Esto contrasta con muchos procesos industriales en los que el medio de cultivo está relativamente bien definido y por, consiguiente, puede utilizarse un extracto enzimático sin purificar. Además, si el destino de una enzima o de un producto obtenido por métodos enzimáticos es su administración a un paciente, resuelta evidente que el preparado debe contener las menores cantidades posibles de material extraño para evitar probables efectos secundarios.

El objetivo de este trabajo es la purificación y caracterización parcial de proteasas en plantas *Bromelia pinguin* L. ("maya" o "piña de ratón"). Esta es una planta ampliamente distribuida en Centroamérica y las islas del Caribe, en particular, esta especie fue cultivada en Cienfuegos, Cuba. Del fruto se obtiene una preparación que ha sido utilizada como antiparasitaria.

Para caracterizar bioquímicamente a esta enzima, se determinó la especificidad de sustrato, activadores e inhibidores de su actividad y parámetros cinéticos de la enzima.

Asimismo se determinó parámetros fundamentales para su aplicación industrial como son la termoestabilidad y el pH óptimo.

Luego se realizó la purificación a homogeneidad de la enzima aislada a partir de los frutos y se caracterizó la fracción pura mediante el estudio de los parámetros cinéticos clásicos ( $K_m$ ,  $V_{máx}$  y  $k_{cat}$ ) empleando sustratos proteicos y sintéticos. Finalmente se están diseñando posibles modelos para ensayar su aplicación biotecnológica.

A su vez también se estudiará el mecanismo de acción de las peptidasas sobre proteínas de uso alimentario, tanto en la modificación de sus propiedades funcionales como en el proceso de tiernizado de la carne vacuna.

## DESARROLLO

### Metodología

El extracto crudo se obtuvo por homogeneización y posterior tamizado de la pulpa de los frutos, el que fue luego sometido a un fraccionamiento etanólico (cuatro volúmenes) y posterior centrifugación a 15.000 rpm durante 30 min. El precipitado redissuelto en agua destilada se nombra pinguinaína parcialmente purificada (PPP), que fue estudiado por isoelectroenfoque seguido de zimograma.

La purificación preliminar de PPP se realizó por cromatografía de intercambio catiónico (FPLC, columna SP-Sepharose HR, buffer acético – acetato 50 mM; pH 5.5; gradiente de cloruro de sodio 0 - 70 mM), a partir de la cual se obtuvo tres componentes activos, uno no retenido y dos retenidos (denominados B1 y B2). Posteriormente se realizó una cromatografía de intercambio aniónico al no retenido, eluyendo de la misma dos componentes activos (denominadas A1 y A2).

La actividad proteásica de los componentes se determinó utilizando caseína como sustrato, en buffer Tris – HCl 50 mM (pH 8,0), conteniendo cisteína 5 mM. La mezcla fue incubada a 37 °C y la reacción se detuvo agregando ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v). Los blancos se prepararon añadiendo TCA a la enzima previamente a la incorporación del sustrato. Los tubos fueron centrifugados y la absorbancia de los sobrenadantes se midió a 280 nm.

La actividad proteolítica vs. pH se midió sobre una solución de caseína al 1% conteniendo cisteína 5 mM dentro del rango de pH 6,0 a 12,0 usando sales sódicas de los siguientes buffers de Good [17]: MES, MOPS, TAPS, AMPPO y CAPS. Adicionalmente se ensayó la estabilidad de la preparación enzimática durante 2 h en el rango de pH de máxima actividad.

Con el objeto de determinar el efecto del calentamiento sobre la estabilidad de las preparaciones enzimáticas se mantuvieron las soluciones a pH óptimo durante 0, 10, 20, 40, 60 y 120 min a 22°C, 37 °C, 45 °C, 55 °C, 65°C y 75°C. Posteriormente se midió la actividad caseinolítica residual de las muestras incubadas en esas condiciones utilizándose como parámetro para evaluar el efecto que produce la temperatura sobre estas proteasas.

Los parámetros cinéticos se obtuvieron utilizando distintas concentraciones de sustratos derivados de aminoácidos específicos para este tipo de proteasas, tal como el – piroglutamil – L – fenilalanina – L – leucina – p – nitroanilida (PFLNA) 0,5 mM, disuelto en buffer fosfatos 0,1M de pH 6,5 conteniendo KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: a 180 mL de sustrato se agregaron 1,5 mL de buffer, se homogeneizó, se agregaron 120 mL de enzima y se mezcló por inversión de la cubeta. Posteriormente se leyó la absorbancia a 410 nm en forma continua cada 5 seg. durante 2 min. El blanco de reacción se realizó de la misma manera, pero con el agregado de buffer en lugar de enzima.

Fueron ensayados a su vez Z-Phe-Arg-pNA (fenilalanina-arginina-paranitroanilida) y Z-Arg-Arg-pNA (arginina-arginina-paranitroanilida), en las mismas condiciones que el ensayo anterior.

También se utilizó el derivado de alanina de los N – CBZ – p – nitrofenil ésteres, en concentración 1 mM., el cual se vio en estudios anteriores que era el de mayor preferencia esterolítica. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C, en buffer Tris – HCl 50 mM de pH 8,0 conteniendo EDTA 2 mM. El blanco de reacción se realizó de la misma manera, pero con el agregado de buffer en lugar de enzima.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se vio que los componentes A<sub>a</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> son estables a altas temperaturas luego de varias horas de incubación. Asimismo mantienen una notable estabilidad en el rango de pH de 7 a 9, con actividad proteolítica máximas entro de esos valores.

Los valores obtenidos de K<sub>cat</sub> y K<sub>m</sub> frente a los sustratos utilizados da indicio de que estas enzimas poseen en su sitio activo grupos característicos de las familias de las proteasas cisteínicas utilizando un sustrato propio de las misma tal como lo es el pflna

Se observó que estas enzimas tienen mayor preferencia por los derivados de ala, cuando se utiliza los ncbz aminoácidos derivados.

Para las mismas se obtuvieron los siguientes valores de km cuando se sometió a las enzimas a diferentes concentraciones de este sustrato.

A1: km= 0.122mM

A2: km=0,665mM

B1: Km: 0,186 mM

Estos resultados indicarían que estas proteasas serían eficientes para su aplicación en tecnología de alimentos así como en la industria farmacéutica,

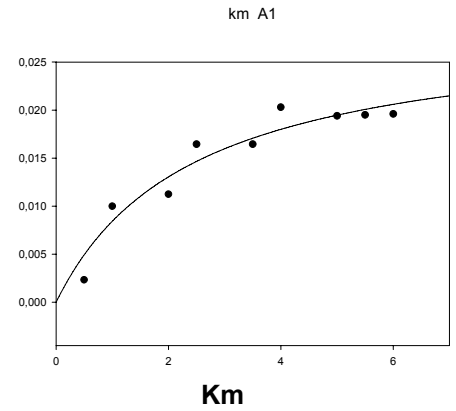
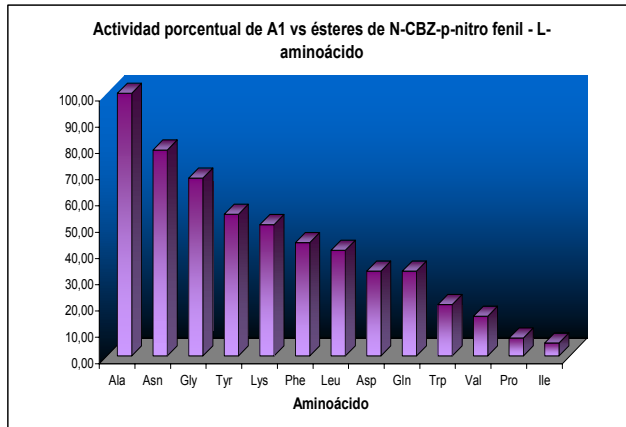
Se prosigue con el estudio de la mismas, asimismo se demostró las propiedades que poseen estas enzimas en la coagulación de la leche para la posible formación de quesos, y también en la formación de hidrolizados de soja para consumo humano.

## BIBLIOGRAFÍA

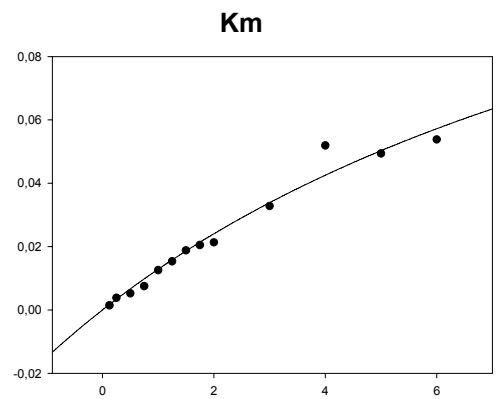
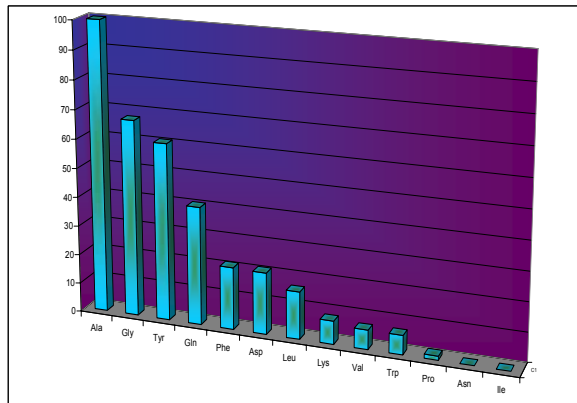
Toro Goyco E, Marezki A y Matos ML (1968). Arch. Biochem. Biophys. 126: 9100.

Abreu Payrol J, Obregón WD, Natalucci CL, Caffini NO (2005). Fitoterapia, in press.

Rowan AD, Buttle DJ y Barrett AJ (1990). Biochem. J. 266: 869.



**Actividad porcentual de A2 frente a ésteres de N-CBZ p-nitrofenil L-aminoácido**



**Actividad porcentual de B1 frente a esteres de N-CBZ p-nitrofenil L-**

