



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

TESIS DE DOCTORADO

**“DESARROLLO DE METODOLOGÍAS BIOSEPARATIVAS QUE
EMPLEAN POLÍMEROS DE CADENA FLEXIBLE Y
MACROLIGANDOS DE AFINIDAD. SU APLICACIÓN AL
AISLAMIENTO DE FITOPROTEASAS DE USO INDUSTRIAL.”**

Presentada por: María Victoria Rocha

Rosario, Argentina

2016

***“DESARROLLO DE METODOLOGÍAS BIOSEPARATIVAS QUE EMPLEAN
POLÍMEROS DE CADENA FLEXIBLE Y MACROLIGANDOS DE AFINIDAD.
SU APLICACIÓN AL AISLAMIENTO DE FITOPROTEASAS DE USO
INDUSTRIAL”***

.....

María Victoria Rocha
Licenciada en Biotecnología
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ) dependiente de CONICET-UNR, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2011 y el 30 de noviembre de 2015, bajo la dirección de la Dra. Bibiana Beatriz Nerli.

Directora: Bibiana Beatriz Nerli

Jurado:

Jurado:

Jurado:

Defendida:

- Durante el período de desarrollo de esta tesis doctoral, fueron publicados parte de sus resultados en revistas internacionales especializadas:
 - (2016) María Victoria Rocha, Melisa Di Giacomo, Sofía Beltramino, Watson Loh, Diana Romanini and Bibiana Beatriz Nerli “A sustainable affinity partitioning process to recover papain from *Carica papaya* latex using alginate as macro-ligand.” Separation and Purification Technology, **168**, 168-176. Elsevier Science Ireland Ltd.
 - (2013) María Victoria Rocha and Bibiana Beatriz Nerli. “Molecular features determining the partitioning patterns of papain and bromelain in aqueous two-phase systems.” International Journal of Biological Macromolecules, **61**, 204-211. Elsevier Science Ireland Ltd.
 - (2013) Mauricio Braia, Maximiliano Ferrero, María Victoria Rocha, Dana Loureiro, Gisela Tubio and Diana Romanini. “Bioseparation of papain from *Carica papaya* latex by precipitation of papain-poly (vinyl sulfonate) complexes.” Protein Expression and Purification, **91**, 91-95. Elsevier Science Ireland Ltd.
- Además se realizaron las siguientes presentaciones en congresos Nacionales e Internacionales:
 - Melisa Di Giacomo, María Victoria Rocha y Bibiana Nerli. “Obtención de papaína a partir de látex de *Carica papaya* mediante procesos extractivos benignos al ambiente.” IX Jornada de Ciencia y Tecnología. Rosario, Argentina, Noviembre 2015.
 - María Victoria Rocha, Melisa Di Giacomo, Sofía Beltramino, Diana Romanini y Bibiana Nerli. “Estudio de la interacción de las fitoproteasas bromelina y papaína con alginato sódico como base del desarrollo de una estrategia bioseparativa.” XIX Congreso Argentino de Investigación Fisicoquímica. Buenos Aires, Argentina, Abril 2015.
 - Sofía Beltramino, Melisa Di Giacomo, María Victoria Rocha, Diana Romanini y Bibiana Nerli. “Aplicabilidad del reparto de afinidad, con alginato como macroligando, en la recuperación de bromelina y papaína.” 3^{er} Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos. Santa Fe, Argentina, Diciembre 2014.
 - María Victoria Rocha, Melisa Di Giácomo, Sofía Beltramino y Bibiana Nerli. “Recuperación de bromelina a partir de tallo de ananá mediante extracción líquido-líquido con sistemas bifásicos acuosos sustentables.” XV Congreso y XXXIII Reunión

Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Facultad de Ciencias Agrarias, Zavalla, Argentina, Noviembre 2013.

- María Victoria Rocha, Delfina Ensinck, Andrea Livieri y Bibiana Beatriz Nerli. “Evaluación de la estabilidad estructural y funcional de dos fitoproteasas cisteínicas, papaína y bromelina, en presencia de diferentes polietilenglicoles”. XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Rosario, Argentina, Abril 2013.

- María Victoria Rocha and Bibiana Beatriz Nerli. “Features of partitioning equilibrium of papain and bromelain in a sustainable aqueous two-phase system”. International Conference on Chemical Thermodynamics (ICCT) and the 67th Calorimetry Conference. Buzios, Brasil, Agosto 2012.

- María Victoria Rocha y Bibiana Beatriz Nerli. “Caracterización del reparto de cisteíno proteasas vegetales en sistemas bifásicos acuosos sustentables.” 2^{do} Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos. La Plata, Argentina, Mayo 2012.

- María Victoria Rocha y Bibiana Beatriz Nerli. “Estudio comparativo de las variables que afectan el reparto de dos fitoproteasas bromelina y papaína en sistemas bifásicos acuosos de bajo impacto.” XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina, Diciembre 2011.

- María Victoria Rocha, Mauricio Javier Braia, María Cecilia Porfiri, Maximiliano Ferrero y Diana Romanini. “Obtención de papaína de *Carica papaya* utilizando estrategias bioseparativas que se basan en la formación de complejos insolubles entre polímeros iónicos y proteínas.” V Jornadas de Ciencia y Tecnología UNR. Rosario, Argentina, Noviembre 2011.

- Mauricio Javier Braia, María Cecilia Porfiri, Maximiliano Ferrero, María Victoria Rocha, Gisela Tubio and Diana Romanini. “Papain-poly (vinyl sulfonate) complex formation as the first stage in bioseparation”. 16th International Conference on BioPartitioning and Purification. Puerto Vallarta, Jalisco, México, Septiembre 2011.

- Se ha logrado la siguiente distinción:

- ***Mención al mejor trabajo de la sección “Procesos de Purificación” SAPROBIO2014.*** Título: “Aplicabilidad del reparto de afinidad, con alginato como macroligando, en la recuperación de bromelina y papaína” Autores: Beltramino; Sofía, Di Giacomo, Melisa; Rocha, María Victoria, Romanini, Diana; Nerli, Bibiana. Jurado:

Comité científico del 3^{er} Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos, Santa Fe, Argentina.

- Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado con las siguientes becas:

- Becas doctorales TIPO I y II, otorgadas por CONICET (2011-2016). Directora: Dra. Bibiana B. Nerli; Codirectora: Dra. Diana Romanini

- Algunos de los resultados presentados en esta tesis han sido obtenidos durante estadias en el exterior en el marco de proyectos de cooperación:

- Pasantía en el Instituto de Química de la Universidad de Campinas (Brasil) bajo la dirección del Prof. Watson Loh con motivo del proyecto “Diseño de estrategias separativas integradoras para la recuperación primaria de bioproductos industriales”, evaluado y financiado por el Consejo de Investigaciones y Científicas y Técnicas (CONICET-Argentina) y la Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP-Brasil). Período 2013-2015.

Porque con su luz iluminaron este camino...

A Juana, Greta

y Fede...

Muchos años vividos... muchos momentos disfrutados... muchas horas compartidas...

Luego de un extenso trayecto hacia un horizonte anhelado, hago un "stop" y busco hacia atrás... Miles de recuerdos renacen una y otra vez... Recuerdos formados por las personas que hicieron de este andar, un placentero camino hacia ese horizonte que hoy irrumpe...

Habiendo culminado este trayecto, no quiero dejar de agradecer a aquellos que han sido parte...

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a la persona que siempre estuvo, quien impulsó mis días, "mi mamá académica" ... quien guió mis pasos, me dio fuerzas para siempre seguir... Gracias Bibi por compartir tus conocimientos, brindar tus enseñanzas, hacer que todo sea especial... Gracias por aconsejarme, tanto en lo profesional como en lo personal, por tantas horas compartidas...

Feliz de coincidir en esta vida!

A mis compañeros del lab... docentes, investigadores, becarios, pasantes... gente increíble, de gran calidez humana, excelentes profesionales... Gracias por los instantes plasmados, los almuerzos disfrutados, las mesadas trabajadas... Gracias por acompañarme en el día a día y hacer que todo sea más llevadero!

Eternamente agradecida para con mi familia... Gracias a mi papá Aníbal y a mi guía celestial Betty, quienes me inculcaron los valores del estudio, me formaron, me marcaron para hoy llegar...

A mis hermanos Nico y Tacho, seres únicos y bondadosos... Simplemente gracias por estar...

Infinitas gracias a esos seres de luz que son motivo de mi vida y potencian mi felicidad...

Juana, Greta y Fede...gracias por siempre estar, aquí y ahora... LOS AMO

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
PALABRAS TOMADAS DE IDIOMAS EXTRANJEROS	VIII
RESUMEN	IX
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Rol de las enzimas en la industria	1
1.2 Procesos bioseparativos para la obtención de enzimas	3
1.3 Extracción líquido-líquido con sistemas bifásicos acuosos	4
1.3.1 Caracterización de los sistemas bifásicos acuosos: diagrama binodial	6
1.3.2 Sistemas bifásicos acuosos más utilizados	7
1.3.3 Componentes de los sistemas bifásicos acuosos	9
1.3.3.1 <i>Polietilenglicol. Propiedades</i>	9
1.3.3.2 <i>Ácido cítrico. Propiedades</i>	10
1.3.4 Equilibrio de reparto de una macromolécula en un sistema bifásico acuoso	11
1.3.5 Ecuación de estado para el reparto de proteínas	11
1.3.6 Factores que gobiernan el reparto de una proteína	13
1.4 Estrategias basadas en afinidad	15
1.4.1 Reparto de afinidad	16
1.4.2 Precipitación de afinidad	18
1.4.3 Reparto de afinidad utilizando macroligandos poliméricos ..	19
1.5 Alginato como potencial macroligando	20
1.5.1 Características generales	20
1.5.2 Propiedades fisicoquímicas	23
1.5.2.1 <i>Viscosidad</i>	23
1.5.2.2 <i>Estabilidad térmica</i>	24
1.5.2.3 <i>Solubilidad</i>	24
1.6 Enzimas proteolíticas y su uso en procesos industriales	25
1.7 Fitoproteasas seleccionadas: bromelina y papaína	27
1.7.1 Características generales	27
1.7.2 Principales aplicaciones	30

1.7.3	Condiciones para la producción en Argentina	31
1.7.4	Métodos de aislamiento	33
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1	Materiales	37
3.2	Métodos	41
3.2.1	Espectroscopía de absorción	41
3.2.2	Espectroscopía de fluorescencia	42
3.2.3	Cálculo de las propiedades superficiales de bromelina y papaína	42
3.2.4	Extinción de la fluorescencia nativa	43
3.2.5	Espectroscopía de dicroísmo circular	44
3.2.6	Viscosimetría	45
3.2.7	Dispersión dinámica de la luz	46
3.2.8	Calorimetría de titulación isotérmica	48
3.2.9	Medidas de actividad enzimática de las proteasas	50
3.2.10	Cuantificación de proteínas totales	51
3.2.11	Cuantificación de alginato de sodio	51
3.2.12	Cuantificación de azúcares reductores	52
3.2.13	Preparación de los sistemas bifásicos acuosos	52
3.2.14	Determinación del coeficiente de reparto de bromelina y papaína	53
3.2.15	Caracterización termodinámica del equilibrio de reparto de bromelina y papaína	54
3.2.16	Determinación del coeficiente de reparto de alginato de sodio	55
3.2.17	Caracterización de los sistemas bifásicos acuosos polietilenglicol +alginato/citrato: obtención del diagrama binodial	55
3.2.18	Efecto de la presencia de polímeros sobre la actividad de bromelina y papaína	56
3.2.19	Efecto de la presencia de sales sobre la actividad enzimática de bromelina y papaína	57

3.2.20	Determinación de la concentración óptima de CaCl ₂ para la formación del gel de alginato	57
3.2.21	Cinética de formación del gel de alginato	58
3.2.22	Redisolución de geles de alginato	58
3.2.23	Determinación de las condiciones óptimas de gelificación del alginato en fase superior del sistema polietilenglicol 8000/citrato	58
3.2.24	Extracción de bromelina y papaína con sistemas polietilenglicol/citrato a partir de los extractos crudos	59
3.2.25	Recuperación de bromelina y papaína a partir de extractos crudos mediante reparto de afinidad empleando alginato de sodio como macroligando	59
3.2.26	Cálculo de rendimiento y factor de purificación	60
3.2.27	Evaluación de la estabilidad de papaína recuperada en la precipitación de afinidad	61
3.2.28	Manejo de los datos experimentales	61
4	RESULTADOS: INTERACCIONES POLÍMEROS-FITOPROTEASAS	62
4.1	Técnicas espectroscópicas	64
4.1.1	Espectroscopía UV-Visible	64
4.1.2	Fluorescencia nativa	68
4.1.3	Extinción de la fluorescencia nativa	72
4.1.4	Dicroísmo circular	76
4.2	Propiedades hidrodinámicas	80
4.2.1	Medidas de viscosidad	80
4.2.2	Dispersión dinámica de la luz	83
4.3	Técnicas calorimétricas	85
4.3.1	Calorimetría de titulación isotérmica	85
4.4	Conclusiones parciales	88
5	RESULTADOS: REPARTO DE LAS FITOPROTEASAS EN SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS POLIETILENGLICOL/CITRATO	90
5.1	Evaluaciones previas al reparto	91
5.1.1	Efecto del tiempo de incubación proteína+polímero	91

5.1.2	Efecto de temperatura de incubación proteína+polímero	94
5.2	Comportamiento de reparto de las fitoproteasas comerciales	97
5.2.1	Efecto del peso molecular del polietilenglicol y composición del sistema sobre el equilibrio de reparto	97
5.2.2	Comparación del perfil de reparto de bromelina y papaína	99
5.2.3	Caracterización termodinámica del equilibrio de reparto ...	100
5.3	Recuperación de las fitoproteasas a partir de sus extractos crudos	104
5.3.1	Efecto del peso molecular del polietilenglicol sobre el equilibrio de reparto de las fitoproteasas presentes en los extractos	104
5.3.2	Rendimiento y factor de purificación del proceso extractivo	105
5.4	Comportamiento de reparto de azúcares reductores	108
5.5	Conclusiones parciales	110
6	RESULTADOS: ESTRATEGIAS QUE INCLUYEN ALGINATO COMO LIGANDO DE AFINIDAD	111
6.1	Reparto de afinidad	113
6.1.1	Efecto de la presencia del alginato de sodio sobre la actividad enzimática	113
6.1.2	Distribución del alginato de sodio entre las fases	115
6.1.3	Reparto de las enzimas en sistemas bifásicos adicionados con alginato de sodio	116
6.1.4	Caracterización de los sistemas bifásicos polietilenglicol +alginato/citrato: diagramas binodiales	117
6.1.5	Selección de la concentración óptima de alginato a emplear en repartos	119
6.2	Precipitación y redisolución de los complejos enzima-alginato ...	121
6.2.1	Efecto de la presencia de CaCl ₂ y NaCl sobre la actividad enzimática	121
6.2.2	Determinación de las condiciones óptimas para la formación del gel de alginato	123
6.2.3	Determinación de las condiciones de redisolución de los geles de alginato	124

6.2.4	Determinación de las condiciones óptimas para la precipitación de bromelina y papaína	126
6.3	Diseño de una estrategia bioseparativa combinada: reparto de afinidad empleando alginato como macroligando	128
6.4	Estabilidad de papaína en el gel de alginato	130
6.5	Reciclado de alginato de sodio	131
6.6	Conclusiones parciales	132
7	CONCLUSIONES GENERALES	133
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ac	Acetato
ALG	Alginato
ASA	Área superficial accesible
AR	Azúcares reductores
BAPNA	N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
BR	Bromelina de tallo
C	Concentración
DC	Dicroísmo circular
DLS	Dispersión dinámica de la luz
FI	Fase inferior
FP	Factor de purificación
FS	Fase superior
HS	Hidrofobicidad superficial
I_f	Intensidad de fluorescencia
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
k_{af}	Constante de afinidad
Kr	Coefficiente de reparto
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer
LLU	Longitud de la línea de unión
LNPE	α -N-carbobenzoxi-L-lisin-p-nitrofenil éster
LU	Línea de unión
NaALG	Alginato de sodio
NaCit	Citrato de sodio
PAP	Papaína
PCF	Polímero de cadena flexible
PEG	Polietilenglicol
pI	Punto isoeléctrico
Pi	Fosfato
PM	Peso molecular
PT	Proteínas totales
R	Rendimiento
RD	Gel redissuelto

R_h	Radio hidrodinámico
RM	Relación molar
SBA	Sistema bifásico acuoso
SN	Sobrenadante
T	Temperatura
T_m	Temperatura de desnaturalización
TRIS	Tris[hidroximetil]aminometano
U.A.	Unidades arbitrarias
V'	Componente estática de extinción
β	Selectividad
$\lambda_{em/exc}$	Longitud de onda de emisión/excitación
$[\theta]$	Elipticidad molar
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca

PALABRAS TOMADAS DE IDIOMAS EXTRANJEROS

buffer: solución amortiguadora de pH

light scattering: dispersión de la luz

software: programa informático

iceberg: agua estructurada entorno de la superficie proteica

performance: desempeño

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se abordó el estudio del aislamiento, a partir de sus fuentes naturales, de dos fitoproteasas de aplicación industrial: bromelina (BR) y papaína (PAP). Para ello se propuso combinar dos estrategias bioseparativas de bajo impacto: el *reparto de afinidad* en sistemas bifásicos acuosos (SBAs) formados por polietilenglicol y citrato de sodio (PEG/NaCit), empleando alginato como macroligando, seguido de la *precipitación de afinidad*, metodología que aprovecha la capacidad del alginato de gelificar reversiblemente en presencia de iones calcio. Ambas metodologías comparten ciertas ventajas: son sencillas, rápidas, económicas, escalables y no requieren de instrumental sofisticado.

Como punto de partida del desarrollo bioseparativo propuesto, se estudiaron las interacciones entre las enzimas de interés y los polímeros de fase (polietilenglicoles) y de afinidad (alginato) a fin de lograr la identificación y caracterización de las posibles fuerzas intermoleculares involucradas. Mediante la aplicación de técnicas basadas en propiedades espectroscópicas, hidrodinámicas y calorimétricas, fue posible inferir una diferenciación de los polímeros utilizados, agrupándolos en dos clases según sus comportamientos frente a las proteasas: i) los de mayor peso molecular (PEG2000, PEG4600 y PEG8000) y ii) los de menor peso molecular (PEG600 y PEG1000) y el alginato de sodio. Con respecto a los primeros, los efectos observados indicaron que los mencionados PEGs se excluyen preferencialmente de la superficie proteica por un mecanismo de tipo estérico, no afectándose significativamente el contenido de estructura secundaria de las fitoproteasas. Por su parte, los PEGs más pequeños y el alginato ocasionaron alteraciones que evidenciaron su unión preferencial a las fitoproteasas. En el caso del alginato, las perturbaciones fueron más marcadas, sugiriendo la existencia de interacciones fuertes y específicas entre este polímero y las proteínas.

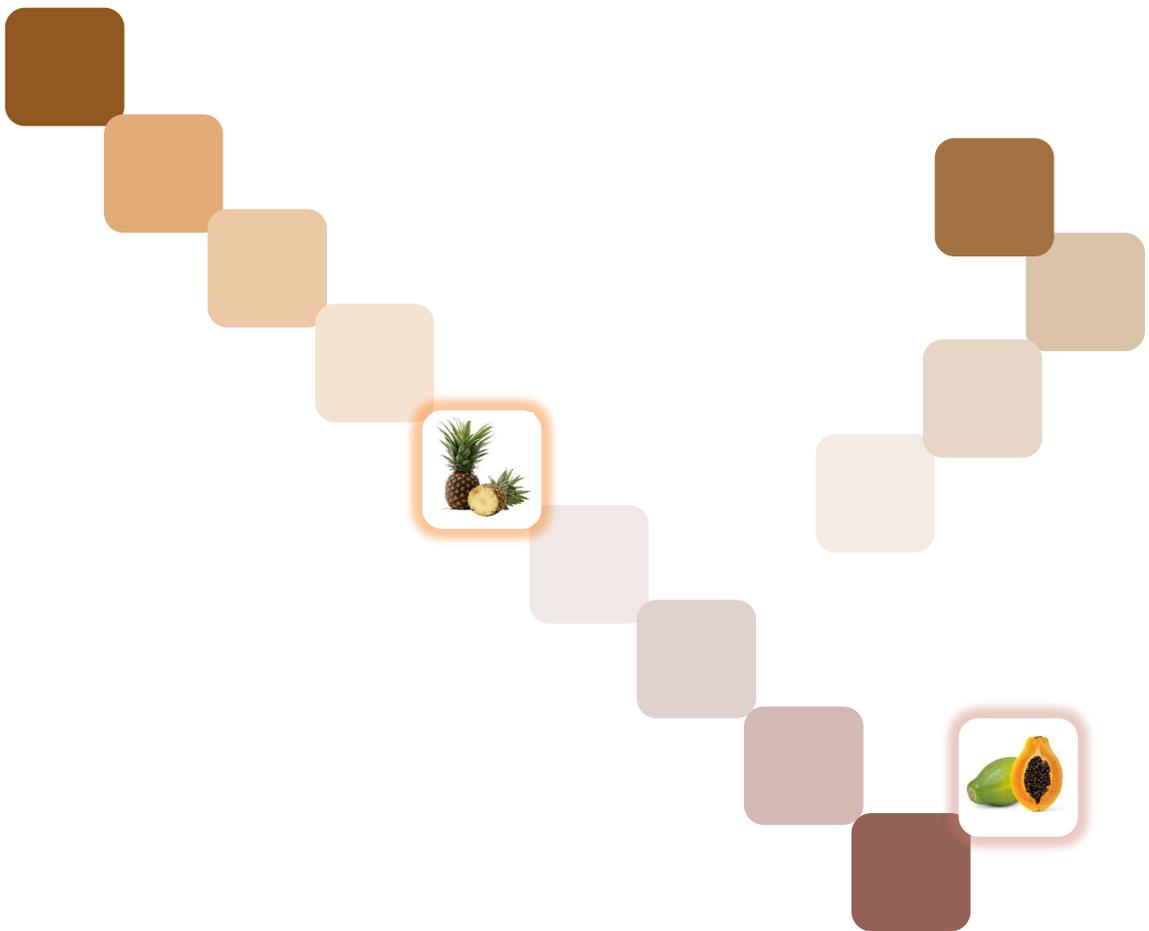
El estudio del reparto de BR y PAP comerciales en los diferentes sistemas PEG/NaCit mostró un desplazamiento del equilibrio de reparto de ambas proteasas hacia la fase salina a medida que aumentaba el tamaño del polímero empleado. A pesar de que ambas enzimas presentan características fisicoquímicas semejantes (peso molecular, punto isoeléctrico, etc.) sus perfiles de reparto reflejaron comportamientos disímiles, evidenciando BR una mayor tendencia que PAP a distribuirse hacia la fase rica en PEG. Esta conducta también fue observada cuando se ensayó el reparto de las

fitoproteasas presentes en el extracto de tallo de ananá y en el látex de papaya. En dicho caso, el análisis del proceso separativo/extractivo de BR, mostró a los SBAs formados por PEG2000, PEG4600 y PEG8000 como los de mejor *performance*, ya que permitieron recuperar mayoritariamente a la enzima en fase salina, con rendimientos cercanos al 90% y factores de purificación de 2,0-2,5, indicadores que pueden considerarse aceptables para una primera etapa de recuperación de la enzima. Cuando se trabajó con el látex de papaya, los resultados fueron poco satisfactorios ya que, si bien todos los sistemas permitieron recuperar la PAP en forma significativa en la fase inferior con rendimientos mayores al 60%, los valores del factor de purificación apenas superaron la unidad. Excepcionalmente, el sistema formado por PEG8000 demostró una buena capacidad de purificación (FP 2,50) en la fase polimérica pero con bajo rendimiento (20%). Como estrategia posible para mejorar el desempeño del proceso extractivo, se evaluó la inclusión de alginato como ligando de afinidad en los SBAs. Este polímero se repartió mayoritariamente hacia la fase superior, rica en PEG, y su presencia, en concentraciones adecuadas (0,1-0,3 %P/P), direccionó a BR y PAP hacia dicha fase, mejorando considerablemente los rendimientos.

Estos resultados, junto con la determinación de las condiciones óptimas de formación de los geles de alginato y su redisolución, permitieron diseñar una estrategia integrada (reparto + precipitación de afinidad) para recuperar las fitoproteasas a partir de sus respectivas fuentes naturales. Su aplicación sobre el extracto de tallo de ananá mostró indicadores de desempeño adecuados en términos de rendimiento de BR (79,3%), pero no así en purificación (1,51). Sin embargo, para el procesamiento del látex se pudo recuperar el 72% de PAP y purificarla 2,41 veces, siendo esta *performance* sensiblemente mejor que aquella lograda en la extracción líquido-líquido con SBAs sin alginato.

Como conclusión final, se puede afirmar que la metodología integradora propuesta resultó eficaz como primer paso extractivo para la recuperación de PAP a partir de látex de *Carica papaya*, no sólo por sus indicadores, sino por las ventajas de esta metodología en términos de simplicidad y sustentabilidad. En el caso de la extracción de BR a partir de tallo de ananá se halló más conveniente la extracción empleando SBAs PEG/NaCit sin alginato.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Rol de las enzimas en la industria

Las enzimas son catalizadores biológicos altamente efectivos que participan en un gran número de procesos metabólicos, aumentando la velocidad de las reacciones químicas. Son ampliamente utilizadas en distintos tipos de industrias debido a que presentan características óptimas que las hacen útiles para su aplicación a macro escala.

¿Cuáles son las principales ventajas del uso de estos biocatalizadores? (Johannes y col., 2006):

- *poseen alta eficiencia*, ya que pueden acelerar la velocidad de los procesos por factores de hasta 10^8 - 10^{10} , incluso actuando a muy bajas concentraciones;
- *son altamente selectivas*, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables, pudiendo diferenciar entre moléculas quirales, grupos funcionales, etc.;
- *no son perjudiciales para el medio ambiente*, dado que se trata de moléculas que naturalmente forman parte de las células de los organismos vivos.

En cuanto a sus desventajas, la más importante está dada por su inestabilidad en el tiempo, sin embargo, existen tratamientos que tienden a minimizarla, como por ejemplo, la inmovilización en soportes o matrices poliméricas por retención física, donde existen interacciones débiles entre la enzima y el soporte; o por unión química, donde interviene la formación de enlaces químicos. La inmovilización de enzimas puede resultar interesante ya que podría favorecer el aumento de la rigidez estructural de la conformación nativa (debido a las uniones covalentes) que la volvería más resistente a la desnaturalización térmica o química (por ejemplo, pH o fuerza iónica) y la protección frente a la autólisis debido a que la enzima se encuentra confinada a una porción del espacio (Arroyo, 1998). También es posible aumentar la estabilidad estructural por glicosilación con polisacáridos iónicos y no-iónicos como el dextrano, el alginato y el quitosán (Fernández y col., 2003).

El primer proceso industrial catalizado por enzimas fue desarrollado en 1960 (Illanes, 2008). Desde entonces, el mercado mundial de biocatalizadores se ha expandido de manera exponencial como consecuencia de su progresiva implementación en numerosos procesos industriales. Actualmente, las industrias modernas continúan explorando las ventajas de las enzimas, incorporándolas activamente en sus procesos productivos, con el propósito de disminuir costos, aumentar la velocidad de los

procesos, mejorar la calidad de los productos y, en la mayoría de los casos, reducir significativamente el impacto ambiental (van Beilen y Li, 2002; Jegannathan y Nielsen, 2013). Una perspectiva del potencial incremento en la producción mundial de enzimas puede observarse en la figura 1.1:

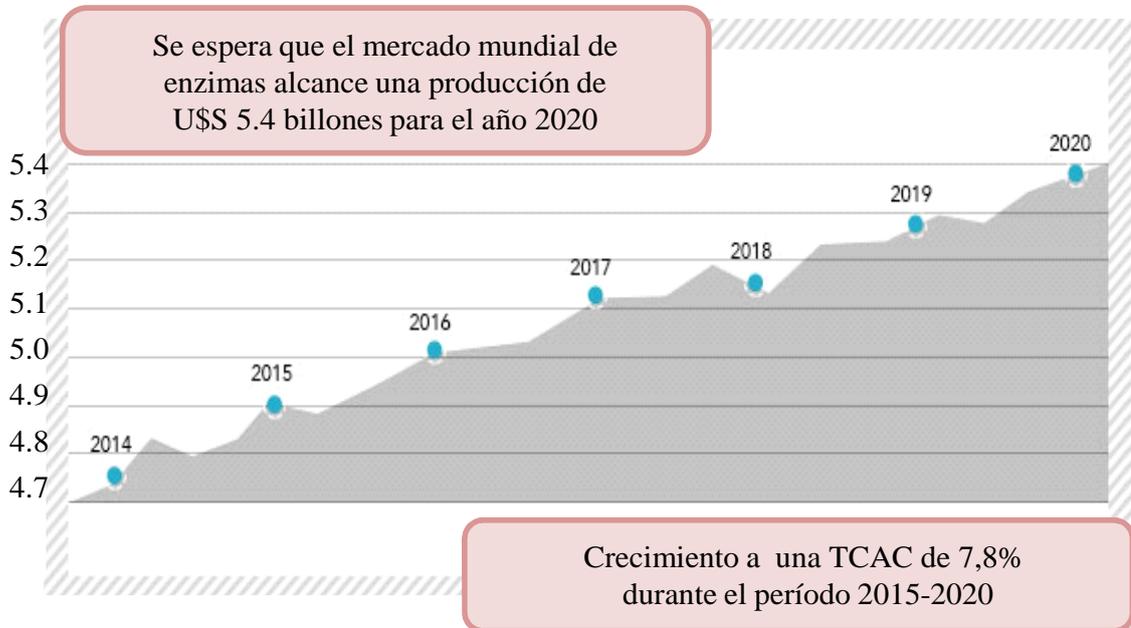


Figura 1.1: Perspectiva del incremento mundial en la producción de enzimas según la tasa de crecimiento anual compuesto (TCAC) (Sumant, 2016).

Dentro de este marco, las enzimas industriales pueden ser clasificadas en dos grandes categorías: *i) según su actividad* y *ii) según sus volúmenes de producción*. En la primera se ubican aquellas que tienen gran actividad biológica y, por lo tanto, sus volúmenes de producción son pequeños; como ejemplo se pueden mencionar las enzimas utilizadas en la industria farmacéutica y en análisis clínico. En el segundo grupo se encuentran las enzimas que cuentan con menor actividad biológica y cuyos volúmenes de producción y aplicación son mayores que las anteriores. Es precisamente en este segundo grupo donde se encuentran las enzimas con mayor aplicación en diferentes procesos industriales, como por ejemplo, en la obtención y mejoramiento de alimentos, bebidas, en la industria textil, de cueros, remediación ambiental, detergentes, etc. (Castellanos y col., 2006). Estas aplicaciones industriales representan más del 80% del mercado mundial de enzimas (Whitehurst y Van Oort, 2010) y se estima que son más de 500 los productos generados a partir de procesos que implican la utilización de estos catalizadores biológicos (Johannes y Zhao, 2006; Kumar y Singh, 2013).

Frente a la necesidad de disponer de grandes cantidades de enzimas (y en algunos casos con alto grado de pureza) es que se han desarrollado avances en bioseparación de proteínas y en el diseño de procesos para la recuperación de productos de valor agregado. Vislumbrando el amplio espectro de utilización/aplicación de estas biomoléculas de naturaleza proteica y la masiva demanda tanto en áreas básicas como aplicadas, resulta de máximo interés el desarrollo y aplicación de métodos bioseparativos de enzimas de interés biotecnológico que sean sencillos, sustentables y aplicables a macro escala.

1.2 Procesos bioseparativos para la obtención de enzimas

Un proceso de bioseparación de enzimas hace referencia a la recuperación, aislamiento y purificación de una proteína a partir de un producto complejo, proveniente de una fuente vegetal, animal o microbiana (Sadana, 1997). En los últimos años, la problemática bioseparativa ha cobrado relevancia debido a la creciente necesidad de disponer de grandes cantidades de enzimas en diferentes procesos productivos. Los métodos de purificación de proteínas más utilizados comprenden cuatro etapas principales: *i) separación de células y fragmentos celulares a partir del medio en que se encuentran (clarificado o clarificación); ii) concentración y/o purificación de baja resolución o recuperación primaria*, en la cual se separa a la molécula de interés de aquellas de diferentes propiedades fisicoquímicas tales como peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI); *iii) purificación de alta resolución*, operación que permite aislar la molécula en cuestión de otras de muy similares características y, por último, *iv) acondicionamiento del producto final*. Cada una de las etapas mencionadas puede estar, a su vez, formada por más de una operación unitaria (Pessoa Junior y Kilikian, 2005).

Un proceso ideal de bioseparación debe ser, en principio, sencillo, rápido y económico, ya que representará aproximadamente un 70% del costo total final del producto (Lima y Mota, 2003). Es indispensable, además, que el proceso combine alta productividad con alta selectividad de separación, asegurando reproducibilidad y, en lo posible, escalado industrial. Cabe destacar que la selectividad en la bioseparación dependerá de la aplicación a la que se va a destinar el producto final, la cual determinará la pureza y concentración requeridas y los niveles permitidos de cada una de las impurezas que lo acompañan. En este sentido, las especificaciones comerciales de pureza para las proteínas de uso medicinal suelen ser mucho más estrictas que las correspondientes a enzimas industriales.

Las técnicas bioseparativas más utilizadas se pueden dividir en dos grandes grupos principales: *i) de alto rendimiento y alta purificación*, como puede ser la cromatografía de afinidad; o *ii) de baja purificación y alto rendimiento* como, por ejemplo, la precipitación, extracción líquido-líquido, ultrafiltración, etc. Estas últimas resultan las más fáciles de escalar y con menores costos de implementación. En la industria, reviste mayor importancia el aspecto económico, es decir, es deseable obtener una elevada relación rendimiento/costo. Una de las maneras de maximizar esta relación es utilizar metodologías que permitan el reciclado de los reactivos empleados en los sucesivos pasos del proceso, y emplear equipos sencillos.

Otro aspecto a tener en cuenta en los procesos de bioseparación, principalmente a macro escala, es el ecológico, debido a que al manejar grandes masas de muestra, también se producen grandes cantidades de desechos. Se requiere entonces, contar con métodos poco agresivos con el medio ambiente, es decir, que generen la menor cantidad de material de desecho y/o que los mismos sean biodegradables o no tóxicos.

1.3 Extracción líquido-líquido con sistemas bifásicos acuosos

En el contexto planteado precedentemente, una metodología que se ha posicionado favorablemente en los últimos años, por reunir muchas de las condiciones deseables para la bioseparación de enzimas, es la extracción líquido-líquido con sistemas bifásicos acuosos (SBAs) (Walter y col., 1991).

Los SBAs pueden ser definidos como sistemas en los cuales dos fases acuosas coexisten en equilibrio. Se obtienen al mezclar, en medio acuoso y por encima de cierta concentración crítica, dos polímeros de cadena flexible (PCFs) neutros o bien un PCF y una sal de anión cosmotrópico, a una dada temperatura (Walter y Johansson, 1986). Estos sistemas que se originan espontáneamente luego del mezclado se conocen como *sistemas preformados* y poseen dos fases, una rica en uno de los polímeros y la otra rica en el otro polímero o la sal. Esta situación se representa esquemáticamente en la figura 1.2

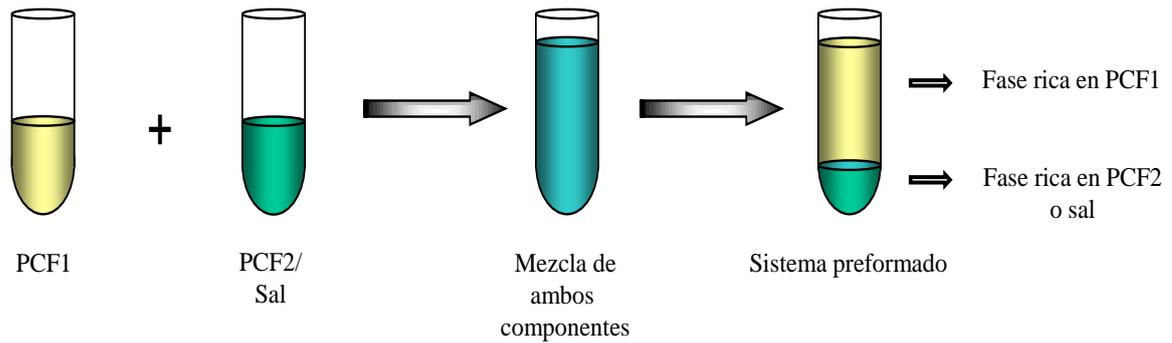


Figura 1.2: Esquema representativo de la formación de un SBA.

La extracción líquido-líquido empleando SBAs es considerada una metodología separativa muy ventajosa por reunir ciertas condiciones, las que se detallan a continuación (Diamond y Hsu, 1990):

- *biocompatibilidad*, debido a que ambas fases están formadas por una alta proporción de agua (80%) existe la posibilidad de regular las condiciones de trabajo, como el pH, osmolaridad y fuerza iónica, proporcionando un entorno adecuado para las moléculas biológicas;

- *baja tensión interfacial*, dado que la composición de las fases es fundamentalmente acuosa hay muy poca variación entre sus respectivas tensiones superficiales, impidiendo que las moléculas se desnaturalicen al pasar de una fase a la otra, tal como sucede en la interfase aire-agua;

- *fácilmente escalable a nivel industrial*, por tratarse de una técnica que emplea sistemas líquidos;

- *sencilla de operar y sin requerimiento de equipos sofisticados*;

- *bajo costo*.

Durante el reparto en SBAs diversas biomoléculas se distribuyen entre las dos fases del sistema de acuerdo a un coeficiente de reparto (K_r) que depende tanto de las características de la biomolécula como de aquellas propias del sistema empleado. La elección de las condiciones experimentales adecuadas permite purificar una proteína de interés contenida en una mezcla compleja, haciendo que la misma se reparta mayoritariamente hacia una de las fases y las que constituyen sus impurezas hacia la fase contraria. En la extracción con SBAs puede repartirse, sin previo tratamiento, el material crudo (homogenado, extracto, etc.) conteniendo restos celulares y membranas. Esto permite evitar una etapa inicial de filtrado y sus consiguientes dificultades:

taponamiento de filtros, aumento de costos y de los tiempos de procesamiento. De esta forma, el reparto con SBAs se considera una operación “integradora” ya que en una única operación cursan el clarificado y la purificación parcial de la molécula blanco (Albertsson, 1986; Walter y Johansson, 1986).

1.3.1 Caracterización de los sistemas bifásicos acuosos: diagrama binodial

Todo SBA tiene, bajo condiciones definidas de temperatura y presión, un diagrama de fases o diagrama binodial que lo caracteriza e identifica (Albertsson, 1986). Una representación esquemática del mismo para un SBA PCF1/PCF2 o PCF1/sal puede verse en la figura 1.3.

La concentración de la especie que predomina en la fase inferior (FI) se representa en el eje de las abscisas (x), en este caso PCF2 o sal; y la del PCF que predomina en la fase superior (FS), en el eje de las ordenadas (y), es decir PCF1; ambas expresadas como porcentaje en peso (%P/P). En estos diagramas, la llamada curva binodial separa dos zonas, una por encima de la curva, cuyos puntos (x, y) corresponden a mezclas de concentraciones polímero-polímero o polímero-sal que darán lugar a sistemas de dos fases, y otra zona, por debajo de la curva, que corresponde a mezclas que darán lugar a la formación de sistemas monofásicos.

El punto A, por ejemplo, representa la composición total inicial de un SBA cuyas concentraciones de equilibrio en FS, rica en PCF1, y en FI, rica en PCF2 o sal, están dadas por los puntos C y B, respectivamente. De igual manera, un sistema con composición total inicial A' tendrá en el equilibrio, una composición C' en la FS y B' en la FI, y así sucesivamente ocurrirá con los sistemas A'', A''', etc. El conjunto de puntos C, C', C'', ..., Cⁿ y B, B', B'', ..., Bⁿ; que representan las composiciones de las fases para cada sistema en equilibrio, pertenecen y definen la denominada curva binodial. Cada par de puntos tales como B y C (B' y C', B'' y C'', etc.) se llaman “nodos” y las líneas que los unen, “líneas de unión” (LU) (Rogers y Eiteman, 1995; Zaslavsky y Huddleston, 1995). Cualquiera de los posibles sistemas cuya composición total inicial esté incluida dentro de los puntos de una misma LU (por ejemplo A, D y E en la línea de unión CB) darán lugar, en el equilibrio, a SBAs con la misma composición final superior e inferior (siempre y cuando se mantengan las condiciones experimentales constantes: presión, temperatura, buffer, sales, etc.), pero con volúmenes distintos en ambas fases. Por aplicación de la regla de la palanca, se cumple que la razón

entre el peso de la FS y la FI es igual a la razón entre las longitudes de las líneas AB y AC, respectivamente.

A medida que la composición inicial del sistema se mueve, por ejemplo, en la dirección A, A', A'',..... Aⁿ, las composiciones de las fases en equilibrio se hacen cada vez más parecidas entre sí, llegándose al “punto crítico” (Aⁿ), en el cual, teóricamente, se igualan.

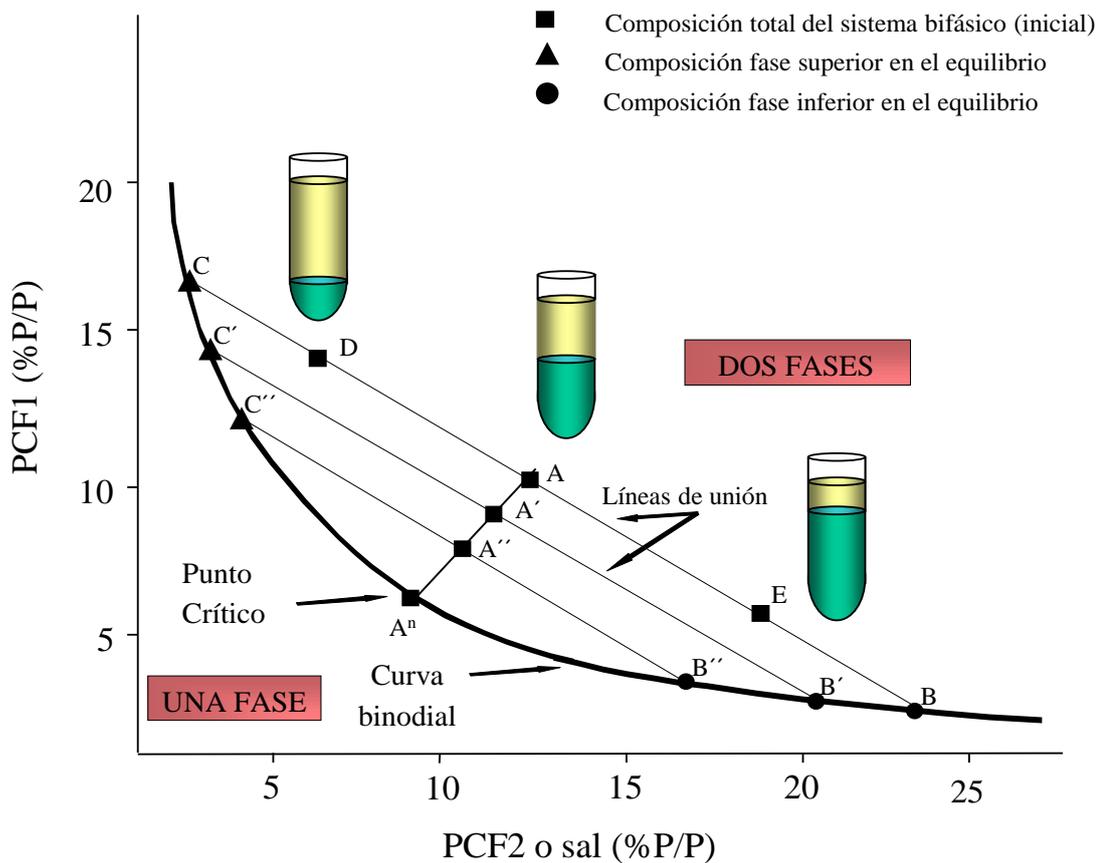


Figura 1.3: Representación esquemática del diagrama binodial de un SBA.

Cuando se trabaja con SBAs no reportados en la literatura, es necesario determinar experimentalmente su diagrama binodial ya que un adecuado conocimiento del equilibrio permitirá predecir las composiciones de fase de distintos sistemas de composición total conocida y, contribuir así, al diseño y optimización del proceso extractivo.

1.3.2 Sistemas bifásicos acuosos más utilizados

Los SBAs fueron descubiertos a fines de 1890 por Beijernick (1896) pero recién medio siglo más tarde, y gracias a los trabajos de Albertsson (1986), cobraron

relevancia en bioseparación. Desde entonces, se han desarrollado con éxito numerosos procesos extractivos de productos biológicos empleando estos sistemas. Podemos citar como ejemplos, la obtención de ADN plasmídico con un rendimiento cercano al 100% a partir de lisados alcalinos (Duarte y col., 2007), la extracción mayoritaria de beta-glucuronidasa de elevada pureza en tabaco transgénico (Ross y Zhang, 2010) y la purificación de α -amilasa a partir de germen de trigo y β -amilasa de batata, con factores de purificación de 42 y 43, respectivamente, y rendimientos de alrededor del 90% (Teotia y Gupta, 2001).

Tabla 1.1: Componentes más utilizados para la formación de SBAs.

Sistemas formados por dos polímeros (SBAs polímero/polímero)	
polietilenglicol +	dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, ficoll, hidroxipropil almidón
polivinil alcohol +	metil celulosa, hidroxipropil dextrano, dextrano, acrílico
Sistemas formados por un polímero y una sal (SBAs polímero/sal)	
polietilenglicol +	fosfato, citrato, tartrato y succinato de sodio o potasio
	sulfato de aluminio, sodio, magnesio

En la tabla 1.1 se describe la constitución de los SBAs de uso más difundido. Los primeros trabajos se focalizaron sobre los SBAs formados por dos polímeros (polímero/polímero), siendo los más empleados aquellos formados por polietilenglicol (PEG) y dextrano. Sin embargo, en los últimos tiempos esto ha revertido hacia los del tipo polímero/sal. Estos sistemas no poseen gran diferencia de densidad entre las dos fases, presentan baja viscosidad, menores costos y ofrecen una separación mucho más rápida que aquellos formados por dos PCFs. El polímero usado casi de forma excluyente en la preparación de los SBAs polímero/sal es el PEG, debido a propiedades que se describirán a continuación. Dentro de las sales predominaron inicialmente los fosfatos y sulfatos, pero las altas concentraciones requeridas para originar el SBA y los potenciales problemas de eutroficación, que los hacen perjudiciales para el medio ambiente, plantearon la necesidad de sustituirlos. En virtud de esto, últimamente se ha ido incrementando el estudio y la aplicación de SBAs formados por sales de aniones biodegradables. En esta línea se ha trabajado con SBAs formados por PEG y citrato de

sodio (NaCit) (Marcos y col., 1998; Tubío y col., 2006) y aquellos formados por PEG y tartrato de sodio (Malpiedi y col., 2010). La baja solubilidad de los tartratos y la dificultad en la formación de los SBAs ha limitado su uso, siendo por ende los SBAs PEG/NaCit los de mayor preferencia en los últimos tiempos.

1.3.3 Componentes de los sistemas bifásicos acuosos

1.3.3.1 Polietilenglicol. Propiedades

Tal como se mencionó, es el polímero más utilizado para la formación de los SBAs polímero/sal. Se trata de un PCF que puede ser lineal o ramificado, cuya estructura se muestra en la figura 1.4. Condiciones de síntesis controlada permiten disponer de PEGs con diferentes grados de polimerización (n), lo cual determina la existencia de PEGs de diferentes PMs. Los polímeros más utilizados en aplicaciones médicas y biotecnológicas tienen un tamaño que se encuentra entre los 600 a 20000 Da. Su distribución de PMs es estrecha debido a que el método de síntesis más comúnmente empleado presenta varios pasos de transferencia de cadenas y de terminación. Esto hace que, para la explicación de muchos de los procesos en los que interviene este polímero, en especial aquellos donde se analiza la variable PM, sea adecuada su consideración como muestra monodispersa. Generalmente, aquellos PEGs de PMs menores que 1000 resultan líquidos viscosos prácticamente incoloros y aquellos de PMs mayores suelen ser sólidos blancos cristalinos (Harris, 2013).

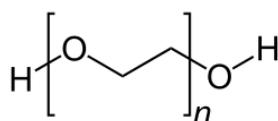


Figura 1.4: Estructura química del polietilenglicol; n: grado de polimerización.

Puede solubilizarse en agua como así también en la mayoría de los solventes orgánicos. En agua, debido a su carácter anfipático, logra estructurar moléculas de agua alrededor de su cadena etilénica y formar puentes de hidrógeno con al menos dos o tres moléculas de agua. En los PEGs de altos PMs, la cadena polimérica se pliega sobre sí misma originando interacciones segmento-segundo donde quedan atrapadas moléculas de agua adicionales que están unidas de manera laxa. Este comportamiento de las

moléculas de PEGs en solución acuosa es particularmente importante para la comprensión de su aplicación bioseparativa. Su alta movilidad y la propiedad de excluir a otros polímeros que se encuentran en la misma solución acuosa se traduce en la posibilidad de formar sistemas bifásicos, generando interés en distintas ramas científicas e industriales (Harris, 2013). Además no es tóxico, presenta baja inmunogenicidad y no daña proteínas activas y células, a pesar de presentar capacidad de interactuar con membranas celulares. Los oxhidrilos terminales y los grupos éter, levemente ácidos y básicos respectivamente, brindan sitios adecuados para interactuar con restos aminoacídicos de las proteínas.

1.3.3.2 *Ácido cítrico. Propiedades*

El ácido cítrico es un ácido orgánico encontrado principalmente en frutas como el limón o la mandarina. Es no tóxico y totalmente biodegradable. Posee capacidades conservantes y antioxidantes. Es un polvo blanco de estructura cristalina, que puede existir tanto en forma anhidra como monohidratada. Se trata de un ácido tricarbóxico, triprótico, con valores de pKa 3,13; 4,76 y 6,40 cuya estructura se encuentra representada en la figura 1.5 A. Mezclas apropiadas de las diferentes formas protonadas (ácido y base conjugada) del ácido conforman soluciones tampones que permiten trabajar en condiciones reguladas de pH.

Por pérdida secuencial de sus tres protones se origina el anión citrato trivalente (Cit^{3-}), con alta densidad de carga negativa y con capacidad de estructurar moléculas de agua a su alrededor. Esta propiedad o carácter cosmotrópico del anión Cit^{3-} (Tanford, 1961) le permite, en soluciones acuosas con PCFs, separarse y originar sistemas bifásicos.

Las sales más comunes de ácido cítrico son las de K^+ o Na^+ (figura 1.5 B), siendo las sódicas las de mayor carácter cosmotrópico por el menor tamaño del catión.

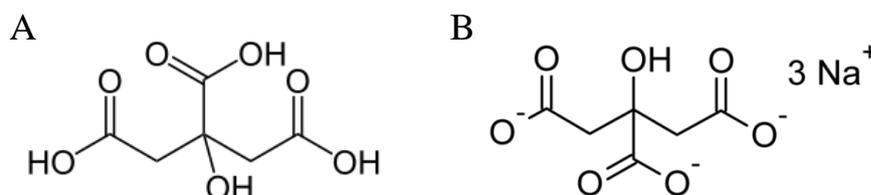


Figura 1.5: Estructuras químicas del (A) ácido cítrico y (B) su sal sódica.

Dentro de las aplicaciones del NaCit puede mencionarse su uso en la producción de colirios y ungüentos, como antioxidante, conservante de alimentos y anticoagulante. También se lo utiliza para el preparado de *buffers* de pHs entre 3,00 y 6,00 de distintas concentraciones.

1.3.4 Equilibrio de reparto de una macromolécula en un sistema bifásico acuoso

Macromoléculas (Ms) tales como proteínas y ácidos nucleicos se reparten entre las fases de un SBA de acuerdo a la afinidad que presenten por cada una de ellas (Zaslavsky, 1994). Esto se ve reflejado numéricamente en el coeficiente de reparto (Kr_M) que se define como:

$$Kr_M = \frac{C_{M(FS)}}{C_{M(FI)}} \quad (1.1)$$

donde $C_{M(FS)}$ y $C_{M(FI)}$ son las concentraciones de la macromolécula en la fase superior (FS) y fase inferior (FI) del sistema, respectivamente, valores que pueden determinarse por distintos métodos según las características de la molécula en cuestión.

Si bien se han realizado diferentes abordajes teóricos, al presente, no se conoce con precisión el mecanismo por el cual cursa el reparto de una M entre dos fases, pero sí se tiene certeza que éste depende de las diferentes y complejas interacciones entre la molécula a separar y las moléculas que la rodean (moléculas de solvente, PCF, ligandos, etc.) (Walter y Johansson, 1986). Intervienen además la formación de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals, así como también los efectos estéricos. Asimismo influyen el tamaño, la conformación y las propiedades de superficie de la sustancia sometida al reparto (hidrofobicidad, carga superficial, etc.).

1.3.5 Ecuación de estado para el reparto de proteínas

La condición de equilibrio termodinámico para una M que se reparte entre dos fases cargadas eléctricamente (debido a la presencia de iones) es la igualdad del potencial electroquímico de la M ($\mu_{M(FS)}, \mu_{M(FI)}$) en ambas fases (FS y FI) (Zaslavsky, 1992):

$$\mu_{M(FS)} = \mu_{M(FI)} \quad (1.2)$$

El potencial electroquímico de la M en cada fase (F) se puede expresar como la suma de la contribución de dos términos: uno no electrostático ($\mu'_{M(F)}$) y otro electrostático ($\mathcal{F} Z \Psi$):

$$\mu_{M(F)} = \mu'_{M(F)} + \mathcal{F} Z \Psi \quad (1.3)$$

siendo $\mu'_{M(F)}$ el potencial químico de la molécula en la fase; \mathcal{F} , la constante de Faraday; Z , la carga eléctrica neta de la M, y Ψ , el potencial eléctrico de la fase. A su vez $\mu'_{M(F)}$ depende de:

$$\mu'_{M(F)} = \mu^{\circ}_{M(F)} + R T \ln a_{M(F)} \quad (1.4)$$

donde $\mu^{\circ}_{M(F)}$ es el potencial químico estándar y $a_{M(F)}$, la actividad de la M en la fase. Reemplazando convenientemente las ecuaciones 1.3 y 1.4 en la igualdad 1.2 resulta la siguiente expresión:

$$\ln K_r = \ln K_r^{\circ} - (F Z \Delta \Psi) / R T \quad (1.5)$$

siendo $\Delta \Psi$ la diferencia de potencial eléctrico entre ambas fases y K_r° el coeficiente de reparto de la proteína en ausencia de factores electrostáticos.

Si bien la ecuación 1.5 es útil para explicar el efecto de distintos factores, fundamentalmente electrostáticos, sobre el valor de K_r , sólo responde al enfoque propio de la termodinámica clásica y no supone la aplicación de ningún modelo a nivel microscópico.

Otra ecuación de estado para el reparto de Ms entre dos fases poliméricas es la derivada por Ostrom (Guan y col., 1993) que tiene en cuenta la interacción entre la proteína, el solvente y el PCF, a través del segundo coeficiente del virial:

$$\ln Kr = \frac{1}{PM} \left\{ \ln(w_{1(FS)}/w_{1(FI)}) - 2 B_{M(FS)} \Delta C_{PCF1} + 2 B_{M(FI)} \Delta C_{PCF2} \right\} \quad (1.6)$$

donde PM es el peso molecular de la proteína, $w_{1(FS)}$ y $w_{1(FI)}$ son las fracciones molares de solvente en la fase superior e inferior, $B_{M(FS)}$ y $B_{M(FI)}$ son los coeficientes del virial de la proteína en cada fase y ΔC_{PCF1} y ΔC_{PCF2} son las diferencias de concentración de los polímeros de cadena flexible entre la FS y la FI. Esta expresión resulta muy útil para explicar cómo el aumento en el PM del polímero direcciona la sustancia que se reparte a la fase contraria y cómo cambia Kr al variar el PM de la proteína que se reparte, pero no contempla el efecto de otras variables como, por ejemplo, la hidrofobicidad superficial de la proteína, su pI, etc.

1.3.6 Factores que gobiernan el reparto de una proteína

La amplia evidencia experimental con la que cuentan los SBAs permite hacer generalizaciones acerca del efecto que ejercen algunas variables sobre el comportamiento de reparto de una proteína:

- *Composición de las fases del SBA o longitud de la línea de unión (LLU)*: muy cerca del punto crítico las composiciones de las fases en equilibrio son similares y los valores observados de Kr son próximos a la unidad. Contrariamente, para composiciones totales alejadas de dicho punto, la marcada diferencia entre las concentraciones de los componentes en cada fase determina el desplazamiento del equilibrio de reparto hacia la fase por la cual la M presenta la mayor afinidad relativa (Zaslavsky y Huddleston, 1995).

- *Peso molecular del polímero*: la variación en el PM de los polímeros que constituyen cada una de las fases influye sobre el reparto del biomaterial por dos mecanismos: i) *alterando el diagrama de fases* y ii) *modificando la interacción proteína-polímero*. Un aumento del PM del PCF induce el desplazamiento del equilibrio de reparto hacia la fase donde dicho polímero se encuentra en menor concentración (Abbott y col., 1991). Este efecto es tanto más pronunciado cuanto mayor es el tamaño de la proteína que se reparte.

- *Peso molecular de la proteína*: generalmente las moléculas pequeñas (aminoácidos, azúcares de bajo PM, etc.) se distribuyen por igual entre las fases, mientras que partículas o moléculas más grandes, tales como proteínas, organelas,

ácidos nucleicos, lo hacen preferentemente hacia la FI de un dado SBA (Baskir y col., 1989) o precipitan en la interface.

- *Propiedades de superficie de la proteína:* en la estructura tridimensional de una proteína se puede observar que sólo una parte de sus aminoácidos están expuestos al medio. Por lo general, dichos aminoácidos son hidrofílicos, mientras que los más hidrofóbicos se encuentran en su interior. Las características de los aminoácidos que se encuentran en contacto con el solvente (superficiales) son las que condicionan las interacciones de dicha proteína con los componentes de fase y, por ende, su comportamiento de reparto. Teniendo en consideración que la hidrofobicidad superficial de la proteína es una medida que refleja la cantidad de aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran expuestos, un incremento en su valor incide en el equilibrio de reparto de una M desplazándola hacia la fase polimérica (Walter y Johansson, 1986).

- *Composición de residuos aminoacídicos específicos:* la presencia de residuos de triptófano (Trp) en la superficie de la proteína aumenta su tendencia a repartirse hacia la FS, rica en el polímero PEG (Huddleston y col., 1991). Se ha postulado que la interacción responsable de dicho comportamiento sería una transferencia de carga específica entre el PEG y los residuos de Trp, basada en el rol de dador de hidrógenos que tendría el nitrógeno pirrólico del anillo indol.

- *Carga de la proteína y pH del medio:* la composición de aminoácidos (tipo y número de grupos ionizables) y el pH del medio determinan la carga neta de la proteína que se reparte. La siguiente expresión empírica, análoga a la deducida aplicando la termodinámica clásica (ecuación 1.5), muestra la relación observada entre dicha carga (Z) y K_r :

$$\log K_r = \log K_r^\circ + \gamma Z \quad (1.7)$$

donde γ es una constante que depende de la composición del sistema y de la sal empleada y K_r° , el valor del coeficiente de reparto en ausencia de carga. El pH también puede afectar al reparto induciendo en la proteína algún cambio conformacional como dimerización, agregación e incluso desnaturalización con la consiguiente exposición al solvente de restos aminoacídicos más hidrofóbicos.

- *Composición iónica del medio:* cuando los SBAs son adicionados con sales en concentraciones del orden de 100-200 mM (fuerza iónica baja), se genera una diferencia de potencial eléctrico en la zona interfacial debido a una distribución desigual

de los iones entre ambas fases, afectándose el reparto de las proteínas cargadas (ecuación 1.7). La magnitud de este efecto depende principalmente de las características de la sal agregada y no de su concentración. A fuerzas iónicas altas (≥ 1 M) el reparto muestra una fuerte dependencia con la concentración de la sal, generándose un desplazamiento de la molécula que se reparte hacia la fase polimérica (Harris y col., 1998).

- *Temperatura*: el efecto de esta variable sobre el reparto de proteínas puede ser explicado por dos causas: *i) cambio en la composición del sistema*: la temperatura afecta el diagrama binodial y con ello, cambian las composiciones de equilibrio. En las proximidades del punto crítico, pequeños cambios de temperatura pueden generar grandes perturbaciones en la composición del sistema e incluso pueden dar lugar a su homogeneización (sistema monofásico) (Kaul, 2000); *ii) modificación de la interacción polímero-proteína o proteína-solvente*: estos cambios pueden ser consecuencia de variaciones en la solvatación, en la estructura o desnaturalización de la proteína.

- *Presencia de ligandos de afinidad*: frecuentemente se observa que cuando se incorpora al SBA una molécula con afinidad por la proteína blanco, el Kr de dicha proteína se ve modificado, ya que la misma se redirecciona hacia la fase donde la molécula adicionada se repartió mayoritariamente. Esta práctica se ha utilizado en muchos casos para aumentar la selectividad del proceso extractivo (Johansson y Andersson, 1984; Teotia y Gupta, 2001) dando lugar a una nueva metodología de afinidad, cuyas características e implicancias merecen un abordaje particular y más profundo, tal como se verá a continuación.

1.4 Estrategias basadas en afinidad

Las macromoléculas en general, y las proteínas en particular, debido a su tamaño y complejidad estructural, pueden interactuar en forma específica y reversible con otras moléculas, generalmente más pequeñas, llamadas ligandos, mediante fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas (Tanford, 1961). La selectividad de esta unión, basada en un reconocimiento a nivel molecular entre el ligando y el sitio (en la proteína), ha permitido desarrollar diversos métodos de “afinidad” destinados a la purificación de biomoléculas, dentro de los cuales la cromatografía de afinidad es uno de los más conocidos, pero no el único (Mondal y Gupta, 2006).

Los ligandos de afinidad pueden ser clasificados en base a diferentes criterios, siendo uno de ellos su tamaño. Aquellos de bajo PM como son los colorantes,

cofactores, iones metálicos y análogos de sustratos, entre otros, han sido empleados en forma frecuente, libres o inmovilizados en diferentes matrices. En general, presentan constantes de afinidad (k_{af}) superiores a 10^6 M^{-1} (Street, 1994).

Dentro del grupo de ligandos de mayor tamaño, denominados también macroligandos, se pueden distinguir:

- *proteicos*, tales como anticuerpos, antiproteasas, lectinas, etc., son de naturaleza más lábil y se caracterizan por ser muy específicos con k_{af} de hasta 10^{15} M^{-1} .

- *polisacáridos*, como polímeros de metacrilato (Eudragit), alginatos, chitosan, almidones modificados, carboximetilcelulosa, etc., son de aplicación más reciente y presentan k_{af} en el rango 10^2 - 10^6 M^{-1} . Se trata de moléculas que responden a un concepto de “macroligando de afinidad” más amplio, por el cual no es requisito que el ligando presente una relación biológica (in vivo) con la proteína de interés. En cambio, sí es necesario, que el mismo presente selectividad por la proteína blanco bajo ciertas condiciones y que esa unión tenga una fuerza adecuada. Esto se refiere a que la afinidad no debe ser demasiado alta, para favorecer la disociación del complejo proteína-ligando durante la etapa de elución. Este tipo de ligando se ha empleado exitosamente en dos metodologías desarrolladas en los últimos años: el *reparto de afinidad* y la *precipitación de afinidad*.

1.4.1 Reparto de afinidad

La afinidad específica de ciertas macromoléculas biológicas por ligandos naturales o artificiales y el reparto de éstas en SBAs son combinados en un método de extracción selectiva llamado *reparto de afinidad* (Johansson y col., 1983; Johansson y Andersson, 1984; Ruiz-Ruiz y col., 2012). Esta metodología reúne la simplicidad y sensibilidad del reparto líquido-líquido con la especificidad de los métodos de afinidad y permite incrementar la selectividad del proceso. El agregado del ligando específico puede realizarse inmovilizándolo (uniéndolo covalentemente) a uno de los componentes poliméricos. De esta forma, dicho ligando queda restringido a una de las fases del sistema, que es aquella donde predomina el polímero que ha sido conjugado con el ligando (Tejedor y col., 1992). En estas condiciones la extracción resulta selectiva ya que la molécula blanco se dirige casi unilateralmente hacia la fase que contiene al conjugado polímero-ligando mientras que el resto de los componentes lo hacen hacia la fase contraria. En estos SBAs sólo se sustituye una fracción del polímero libre por su conjugado (polímero-ligando), ya que el reemplazo de la totalidad resultaría en una

elevada concentración de ligando y consecuentemente, en la aparición de impedimentos estéricos para la interacción macromolécula-ligando durante el proceso de reparto. Unir covalentemente el ligando al polímero puede involucrar un esfuerzo considerable así como también una purificación tediosa del producto polímero-ligando respecto de otras impurezas y del ligando libre. Si bien existen metodologías de producción de conjugado PCF-ligando a gran escala, los procesos de obtención suelen ser complicados y requerir varios pasos cromatográficos y extracciones con solventes orgánicos (Xu y col., 2002).

Una forma alternativa más sencilla de preparar SBAs de afinidad consiste en directamente adicionar el ligando específico sobre el SBA tradicional (no hay unión covalente polímero-ligando). Éste se repartirá preferentemente hacia una de las fases, frecuentemente la fase polimérica, condicionando así el reparto de la molécula de interés.

Una amplia variedad de moléculas han sido empleadas como ligandos en esta metodología. Entre ellas se destacan moléculas altamente conjugadas, como los colorantes, debido a su estructura muy semejante a los sustratos y cofactores de enzimas. Algunas de las ventajas que poseen estos ligandos son sus bajos costos y su gran disponibilidad comercial (Zaslavsky y Huddleston, 1995; Denizli y Pişkin, 2001; Rocha y col., 2012). En los últimos años, se han agregado ciertos polímeros de naturaleza polisacárida como alginato, chitosan, carboximetilcelulosa, etc., como verdaderos “macroligandos” con propiedades ventajosas que se discutirán más adelante (Teotia y Gupta, 2004; Teotia y col., 2004).

Se han desarrollado diferentes modelos para describir el reparto de afinidad. El más empleado, independientemente del tipo de ligando, ha sido propuesto por Flanagan y Barondes (1975) y está basado en la termodinámica de los sistemas en equilibrio. El modelo permite arribar a la siguiente expresión, válida en condiciones saturantes de ligando:

$$K_{r_{M+L}} = K_{r_M} \left(\frac{1 + C_{L(FS)} k_{af(FS)}}{1 + C_{L(FI)} k_{af(FI)} / K_{r_L}} \right)^n \quad (1.8)$$

donde $K_{r_{M+L}}$ y K_{r_M} son los coeficientes de reparto de la macromolécula (proteína) en presencia y en ausencia de ligando, respectivamente, K_{r_L} es el coeficiente de reparto del ligando libre presente en el SBA o unido covalentemente al PCF, $k_{af(FS)}$ y $k_{af(FI)}$ son las

constantes de afinidad proteína-ligando en FS y FI, respectivamente, $C_{L(FS)}$ y $C_{L(FI)}$ son las concentraciones de ligando en FS y FI, respectivamente, y n es el número de moléculas de ligando unidas por cada molécula de proteína. Esta expresión demuestra que el coeficiente de reparto de una molécula de interés se incrementa con la concentración del ligando agregado.

1.4.2 Precipitación de afinidad

La *precipitación de afinidad* permite la recuperación de una macromolécula a partir de una mezcla compleja mediante el empleo de ciertos ligandos poliméricos capaces tanto de interactuar en forma específica con la molécula blanco como de precipitar reversiblemente ante estímulos externos tales como cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, presencia de ciertos cosolutos, etc. Esta bifuncionalidad del ligando es la base de la estrategia de purificación (Hilbrig y Freitag, 2003), ya que, en una primera etapa, el ligando en su forma soluble se une específicamente a la proteína de interés en condiciones óptimas de pH, fuerza iónica, etc. dando complejos proteína-ligando los que luego se insolubilizan y separan por decantación ante modificaciones apropiadas de alguna de las variables del medio. Finalmente, y mediante el estímulo adecuado (cambio de alguna condición del medio), se induce la disociación del complejo, la precipitación del ligando libre (para su reciclado) y la recuperación la proteína. Los ligandos utilizados en estas técnicas son conocidos como ligandos inteligentes o sensibles a multi-estímulos (Kumar y col., 2007). Particularmente, ciertos polímeros como el quitosán, alginato, etc. han mostrado ser ligandos específicos de alfa-amilasas y aglutininas y participar de equilibrios de precipitación dependientes del pH, la fuerza iónica o la concentración de iones Ca^{2+} (Senstad y Mattiasson, 1989; Teotia y col., 2001). El grado de disociación de diferentes grupos presentes en estos polímeros, también dependiente del pH, determina diferentes estados de carga eléctrica y permite considerarlos como policationes o polianiones según el caso.

La precipitación de afinidad presenta como ventajas: fácil escalado, adaptación a procesos continuos, requerimiento de equipos relativamente simples y empleo de muy bajas concentraciones de ligando. Sus principales desventajas son la coprecipitación de diversos tipos de impurezas difíciles de remover por lavado, alcanzándose en muchos casos factores de purificación moderados.

1.4.3 Reparto de afinidad utilizando macroligandos poliméricos

La integración de la precipitación de afinidad con la extracción con sistemas bifásicos acuosos, ha dado origen al *reparto de afinidad con macroligandos poliméricos*, novedosa metodología que retiene las ventajas de ambas técnicas y permite superar sus inconvenientes (Teotia y col., 2006). La misma, representada esquemáticamente en la figura 1.6, consiste en la incorporación de un macroligando de afinidad de la proteína de interés, sobre un SBA del tipo PEG/sal. La distribución asimétrica de dicho ligando hacia la fase rica en PEG induce, luego de la siembra del material crudo, un direccionamiento de la proteína blanco hacia la fase donde el ligando se halla en mayor proporción.

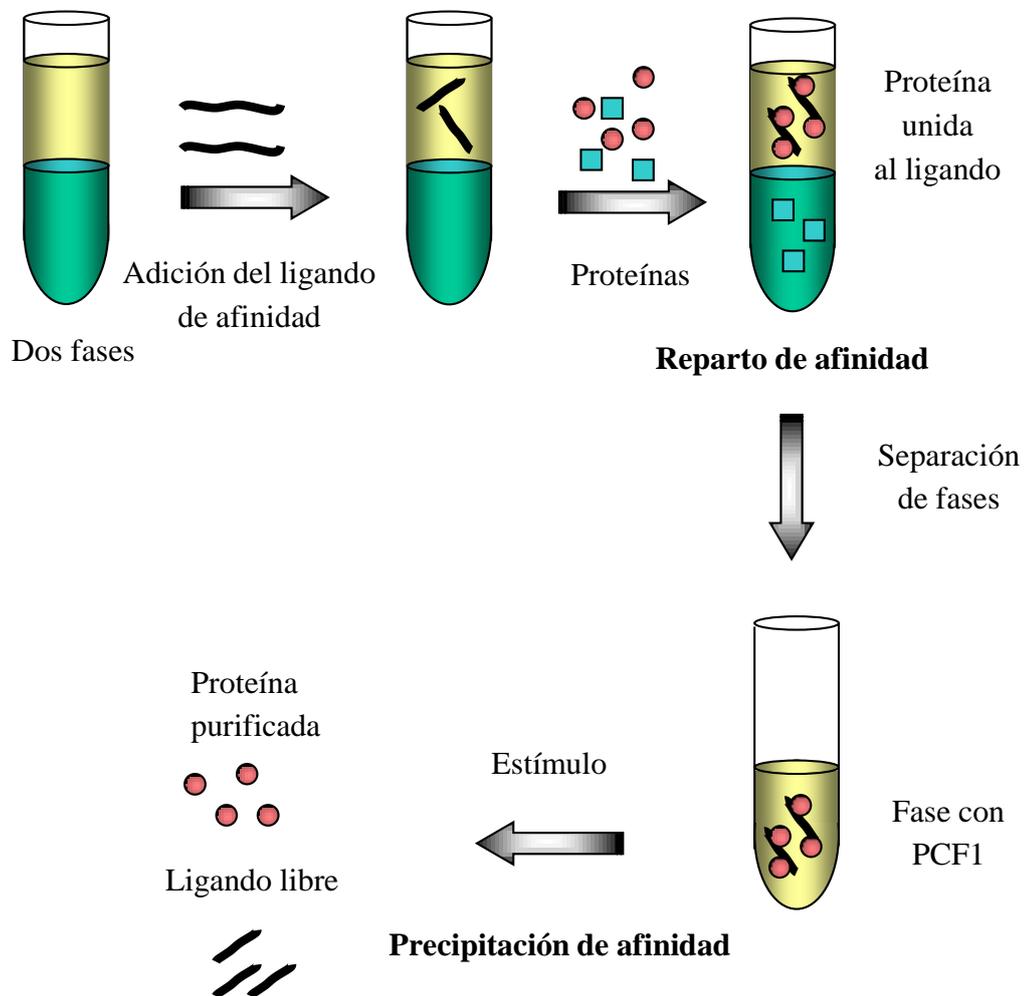


Figura 1.6: Esquema del reparto de afinidad utilizando macroligandos poliméricos para la recuperación de enzimas.

La separación posterior de fases, seguida de precipitación del complejo proteína-ligando, disociación y precipitación del ligando libre (estímulo adecuado mediante), resulta en la purificación de la proteína deseada y la recuperación tanto del ligando como de la fase rica en PEG. Con esta metodología se logra:

- remoción de células y restos particulados durante la etapa extractiva,
- mayor selectividad debido a la introducción de un macroligando de afinidad,
- el reciclado tanto de las fases como del polímero de afinidad.

Esta técnica ha sido exitosamente empleada con diversas proteínas (Teotia y col., 2001; Teotia y Gupta, 2004).

1.5 Alginato como potencial macroligando

1.5.1 Características generales

El alginato (ALG) es un polisacárido lineal, natural, soluble en agua, que se encuentra formando parte de la pared celular de las algas marinas pardas (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*), constituyendo hasta el 40% de su peso seco. Su principal función es dar rigidez, elasticidad, flexibilidad y capacidad de enlazar agua (Escalona y col., 2005). En su estado natural se encuentra formando un complejo insoluble con sales de calcio y magnesio. En cuanto a su estructura, el ALG está constituido por subunidades alternadas de ácidos urónicos, β -(1,4)-D-manurónico (M) y ácido α -(1,4)-L-gulurónico (G), cuyas estructuras se muestran en la figura 1.7.

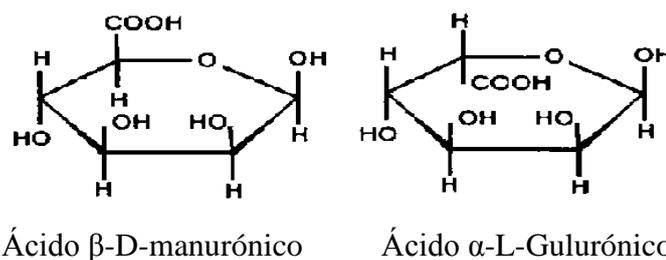


Figura 1.7: Subunidades constitutivas del polímero ALG.

La cadena polimérica que constituye el ALG se compone de tres tipos de regiones o bloques que pueden verse representados en la figura 1.8: *i) los bloques GG*, que contienen solo unidades derivadas del ácido α -L-gulurónico; *ii) los bloques MM*, que se constituyen enteramente de ácido β -D-manurónico; y *iii) las regiones MG*, que

consisten en unidades alternadas de ambos ácidos (McHugh, 1987). Las constantes de disociación de los monómeros G y M son 3,38 y 3,65, respectivamente, (Draget y col., 2005) por lo que el ALG está negativamente cargado en un amplio rango de pH. Las diferentes configuraciones espaciales adoptadas por los bloques MM y GG se deben a los diferentes enlaces glucosídicos entre los carbonos C-1 y C-4 de las unidades monoméricas. Las regiones de bloques MM corresponden a cadenas lineales, mientras que los bloques GG presentan una estructura en forma de zig-zag.

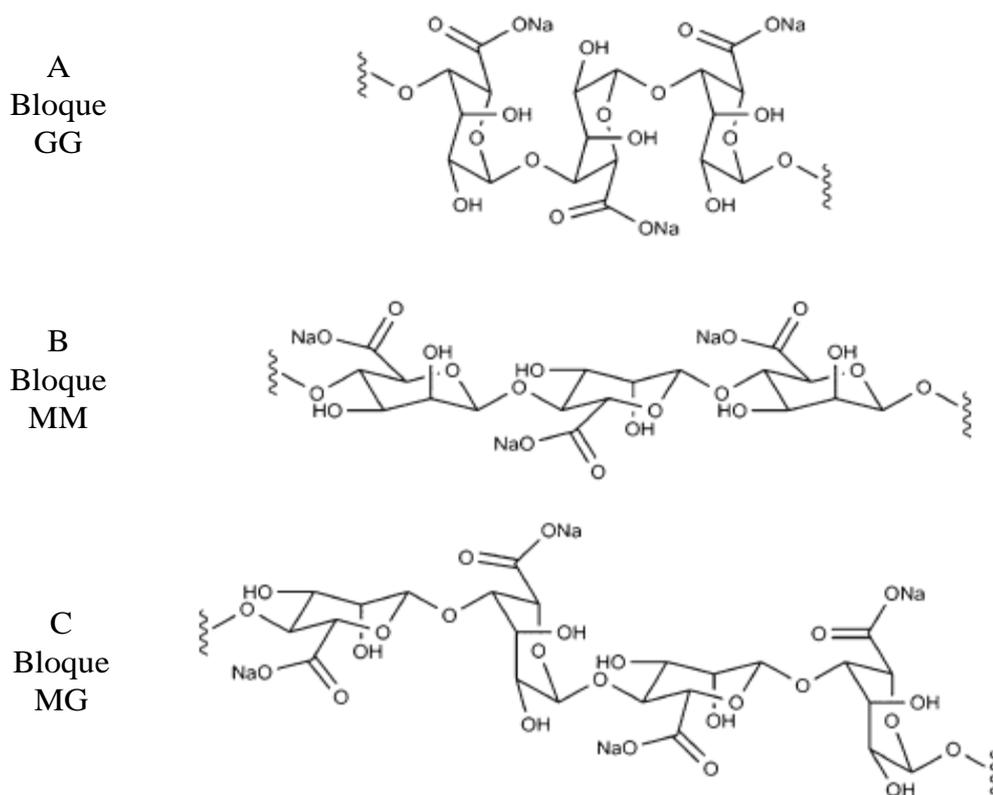


Figura 1.8: Diferentes conformaciones espaciales del ALG. (A) Polímero en forma de zig-zag de bloques GG; (B) polímero lineal de bloques MM y (C) secuencia alternada de bloques M y G.

Cuando dos cadenas de bloques GG se alinean lado a lado, se generan “huecos” capaces de acomodar en su interior iones calcio, dando lugar a estructuras oligoméricas como la que se muestra en la figura 1.9. Este modelo, propuesto por Grant (1973) y conocido como modelo de la “caja de huevos”, resulta útil para explicar las propiedades gelificantes del ALG al reaccionar con sales cálcicas u otros tipos de cationes divalentes.

Las características de los geles formados varían según los porcentajes de regiones de bloques GG y MM presentes, los cuales dependen de la especie de alga desde donde se extrajo el polímero. La estabilidad y resistencia de un gel en particular se relaciona con lo bien que el catión puede “ajustarse” en los huecos que se forman entre los bloques de gulurónico. Así, el estroncio, más voluminoso, forma estructuras aún más resistentes que el calcio y por el contrario el magnesio, más pequeño, no queda firmemente unido y, las soluciones de alginato de magnesio no forman geles.

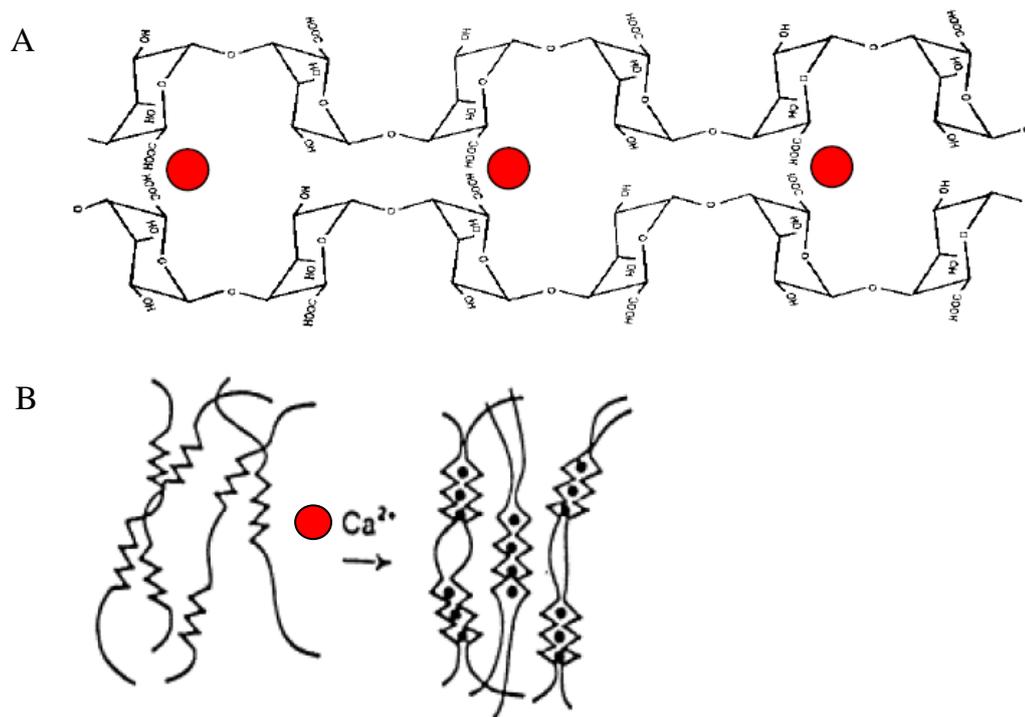


Figura 1.9: Estructura del ALG (GG) en presencia de Ca^{2+} . (A) Modelo de la “caja de huevos”, interacción entre los grupos COO^- y el Ca^{2+} (●); (B) disposición de las cadenas de ALG en estructuras oligoméricas: gelificación.

El ALG es un polímero biocompatible, no tóxico, no inmunogénico y biodegradable, propiedades que lo sitúan en un lugar privilegiado tanto a nivel industrial como comercial. Adicionalmente, la aplicación del ALG está íntimamente ligada a sus propiedades hidrocoloides y a su reactividad frente a cationes di o trivalentes (el Ca^{2+} más precisamente), propiedades que dependen de su geometría molecular y le permiten actuar como espesantes, gelificantes y formadores de películas (Funami y col., 2009).

A continuación se describirán algunas de las propiedades fisicoquímicas de este biopolímero vinculadas a su comportamiento en solución y que determinan sus potenciales aplicaciones.

1.5.2 Propiedades fisicoquímicas

1.5.2.1 Viscosidad

Esta propiedad de las soluciones de ALG depende, principalmente, de la longitud de las cadenas, cuanto mayor sea, más alta será la viscosidad. Al disolverse en agua, las moléculas se hidratan y, por ende, aumenta la viscosidad de la solución.

El grado de polimerización (GP) de un ALG es una medida de su PM promedio y está determinado por el número de unidades de ácidos urónicos presentes en la cadena polimérica. Siendo esto así, la viscosidad de las soluciones se relaciona directamente con el GP y el PM; mientras que la pérdida de viscosidad, que se produce comúnmente durante el almacenamiento, es una medida del grado de avance del proceso de despolimerización (McHugh, 1987).

La viscosidad de las soluciones de ALG es función de numerosos factores, entre los que pueden mencionarse:

- *Peso molecular*: cuanto mayor es el PM del ALG, más viscosas resultan sus soluciones. Se dispone de ALGs comerciales de distintos PMs y GP, los cuales dependen de las condiciones de extracción y/o manufactura. Los más comunes son aquellos con GPs comprendidos entre 100 y 1000 unidades, cuyas soluciones al 1% y a temperatura ambiente ($\cong 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) presentan viscosidades en el rango de 10-1000 mPa.s. Estos se clasifican en ALGs de viscosidad alta ($\cong 600\text{ mPa s}$), media (350 mPa s) y baja (200 mPa s).

- *Concentración*: la viscosidad de las soluciones de ALG crece con su concentración en forma similar a lo que ocurre con otras soluciones poliméricas, elevándose en forma muy notoria a partir de concentraciones superiores al 2%.

- *Temperatura*: al igual que en la mayoría de los fluidos, las soluciones de ALG disminuyen su viscosidad al aumentar la temperatura. Este proceso es reversible para cierto rango de temperaturas, ya que la solución vuelve a su valor de viscosidad inicial por enfriamiento. Sin embargo, si las soluciones del polímero se mantienen a temperaturas elevadas ($> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante períodos extensos, la viscosidad decrece irreversiblemente debido a un proceso de despolimerización.

- *pH*: la viscosidad de las soluciones es casi independiente del pH en el rango 5,00-10,00, presentando un valor ligeramente mayor cerca de la neutralidad (pH 6,00-8,00) debido a efectos repulsivos de los grupos carboxilos cargados negativamente (COO^-), los que mantienen extendidas las cadenas del polímero e incrementan su capacidad de unión de moléculas de agua. En solución ácida el ALG formará un gel ya

que a bajos pHs los COO^- de los ácidos urónicos aceptan protones, lo que hace que se favorezca la formación de enlaces entre bloques GG. Por debajo de pH 4,50 la viscosidad tiende a incrementarse por la disminución de la solubilidad del ácido algínico libre, el cual precipita en forma de gel en el intervalo de pH 3,00-4,00 (Pasin y col., 2012).

- *Fuerza iónica*: la viscosidad de las soluciones de ALG decrece por la adición de sales de cationes monovalentes. Al aumentar la fuerza iónica, disminuye la repulsión por cargas y el polímero tiende a adoptar conformaciones más plegadas, siendo este efecto común a todos los polielectrolitos. Un comportamiento contrapuesto se presenta al adicionar iones de metales polivalentes, dentro de los cuales el calcio, es particularmente importante.

1.5.2.2 Estabilidad térmica

En general, los ALGs con alto GP son menos estables que los que tienen bajo GP. Soluciones de alginato de sodio (NaALG) de viscosidad media/baja a pHs neutros son poco susceptibles a la acción microbiana y pueden ser mantenidas a 25 °C por varios años, sin pérdida apreciable de viscosidad. Las soluciones de NaALG de alta viscosidad son las menos estables de todas y presentan una alta tendencia a sufrir despolimerización a medida que se incrementa la temperatura. El ácido algínico, con un GP de aproximadamente 40 unidades de ácido urónico por cadena, evidenciará muy pocos cambios a 20 °C durante el primer año. Normalmente, para optimizar la estabilidad de las soluciones de NaALG se requieren pHs entre 5,00 y 9,00, así como también pequeñas cantidades de calcio logran aumentar en gran medida la estabilidad. Una condición que se debe tener en cuenta para los ALGs comerciales es que siempre deben ser almacenados en un lugar fresco, a 25°C o inferior, ya que las temperaturas elevadas pueden causar despolimerización significativa que afecta a las propiedades comercialmente útiles, tales como la viscosidad y resistencia del gel (McHugh, 1987).

1.5.2.3 Solubilidad

El ALG, en forma de sal sódica, potásica o magnésica, es soluble en soluciones acuosas a pH superiores a 3,5. También es soluble en algunos solventes orgánicos como el alcohol; pero es insoluble en leche, ya que contiene calcio.

La solubilidad del ALG se ve afectada tanto por factores físicos como químicos, los que se explican a continuación:

- *Factores físicos*: la solubilización de los compuestos de ALG se ve afectada tanto por el tamaño como por la forma de las partículas que conforman el reactivo

sólido. Los materiales formados por partículas grandes resultan más fáciles de dispersar y suspender, aunque presenten baja velocidad de hidratación. Aquellos materiales formados por partículas finas se disolverán más rápidamente, pero tendrán mayor tendencia a la aglomeración.

- *Factores químicos*: la solubilización de estos productos en agua resulta dificultosa si se realiza en presencia de compuestos que compiten con las moléculas de ALG por el agua necesaria para su hidratación. Así, la presencia de azúcares, almidón o proteínas retardará el tiempo necesario para la solubilización. Las sales de cationes monovalentes (como el NaCl) tienen un efecto similar (restricción del agua) a concentraciones cercanas al 0,5%. En estos casos es aconsejable incorporar estos cosolutos luego de que el ALG fue hidratado y disuelto. La presencia de pequeñas cantidades de cationes polivalentes también previene la hidratación de los ALGs y, en proporciones elevadas, pueden causar su precipitación.

1.6 Enzimas proteolíticas y su uso en procesos industriales

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NCIUBMB) recomienda el uso del término “*peptidasa*” para referirse a todas aquellas enzimas que catalizan la degradación de proteínas (proteólisis) mediante la adición de una molécula de agua en los enlaces peptídicos. La peptidasas, también conocidas como proteasas o enzimas proteolíticas, pueden ser clasificadas según distintos criterios:

- *Tipo de reacción que catalizan*: según la NCIUBMB estas enzimas se encuentran dentro del grupo 3 (hidrolasas) y del subgrupo 4 (hidrolasas de enlaces peptídicos). A su vez, la subclase 3.4 pueden clasificarse según la ubicación de los enlaces que hidrolizan en: *i) exopeptidasas*: aquellas enzimas que remueven uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino; y *ii) endopeptidasas*: aquellas que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína, siendo estas las más importantes desde el punto de vista industrial (Barrett, 1994).

- *Naturaleza del sitio activo*: Hartley (1960) propuso clasificar a las proteasas (endopeptidasas) de acuerdo a características de sus mecanismos catalíticos en seis clases principales: *i) serínicas* (EC 3.4.21); *ii) cisteínicas* (también conocidas como tiolproteasas, EC 3.4.22); *iii) aspárticas*, inicialmente conocidas como proteasas ácidas; *iv) glutámicas* (EC 3.4.23); *v) metalopeptidasas* (EC 3.4.24); *vi) treonínicas* (EC 3.4.25); considerándose un séptimo grupo de *endopeptidasas de mecanismo catalítico*

desconocido (EC 3.4.99). A su vez, estos subgrupos 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 forman complejos covalentes enzima-sustrato (aspárticas, glutámicas y metalopeptidasas).

-Estructura basada en relaciones evolutivas: Rawlings y Barret (1993) han clasificado a las proteasas en familias y clanes de acuerdo a su secuencia aminoacídica y relación. Las proteasas que comparten suficiente homología de secuencia fueron clasificadas dentro de la misma familia, y las familias que se cree tienen un ancestro común se colocaron dentro del mismo clan. Los nombres de los clanes y familias en la base de datos MEROPS están basados en letras S, C, T, A, G, M y U, que se refieren a los tipos catalíticos. Sin embargo, algunos de los clanes son de tipo mixto y contienen familias con dos o más tipos catalíticos, siendo designados con la letra "P". Esta clasificación resultó en la creación de la base de datos MEROPS peptidasa, que se revisa y actualiza constantemente: <https://merops.sanger.ac.uk/> (Rawlings y col., 2010).

Las proteasas son consideradas el grupo de enzimas de mayor implicancia industrial y comercial, representando aproximadamente el 60% del total de enzimas empleadas en la industria (Sumantha y col., 2006). Cabe resaltar que en lo referido a la producción de alimentos, las 2/3 partes de las enzimas utilizadas son proteasas. También se las utiliza en la fabricación de bebidas, en panificación, como ablandadores de carne y en la clarificación de cerveza. Asimismo se emplean en numerosos procesos productivos, principalmente en la industria de los detergentes y del cuero, así como también presentan importantes aplicaciones farmacéuticas y terapéuticas (Feijoo-Siota y Villa, 2011).

La amplia distribución de proteasas en plantas, animales y microorganismos demuestra que son enzimas fundamentales en los organismos vivos, cumpliendo importantes papeles fisiológicos en muy diversos procesos biológicos (Rao y col., 1998). En cuanto a las aplicaciones mencionadas precedentemente, si bien las enzimas proteolíticas más utilizadas en la industria son las microbianas, las proteasas vegetales o "*fitoproteasas*" siguen siendo preferidas en muchos procesos debido a ciertas características particulares de especificidad, actividad y estabilidad (de Roos y col., 2004). Las fitoproteasas han sido objeto de renovada atención en las últimas décadas, principalmente por parte de la industria farmacéutica y biotecnológica, no sólo a causa de la alta actividad proteolítica que presentan sobre una amplia variedad de proteínas,

sino también debido a que son activas en un amplio rango de temperatura y pH (Dubey y col., 2007). Todos estos factores han estimulado la investigación y el aumento del número de trabajos en fitoproteasas, principalmente en cisteín proteasas tales como papaína, bromelina y ficina. En la tabla 1.2 se listan las fitoproteasas disponibles comercialmente.

Tabla 1.2: Fitoproteasas disponibles comercialmente.

Enzima (Número CAS)	Fuente	Proveedores	Presentación
Papaína (9001-73-4)	Látex de papaya	Sigma, Beta Pharma, MP Biomedicals, Sisco Research Laboratories, Pierce Biotechnology, Enzyme Development	Cristalizada, agarosa, polvo liofilizado, polvo bruto, suspensión acuosa tamponada
Quimopapaína (9001-09-6)	Látex de papaya	Sigma, 3B Scientific Corporation	Polvo soluble, polvo liofilizado
Bromelina (9001-00-7)	Tallo de ananá	Sigma, Pfaltz y Bauer, MP Biomedicals, Beta Pharma, Enzyme Development Corporation	Polvo liofilizado
Ficina (9001-33-6)	Higo	Sigma, Pfaltz y Bauer, Enzyme Development Corporation	Suspension salina, polvo liofilizado
Actinidina (39279-27-1)	Kiwi	Biochem Europe	Polvo
Cucumisina (82062-89-3)	Sarcocarpio del melón	Sigma	Polvo liofilizado

1.7 Fitoproteasas seleccionadas: bromelina y papaína

1.7.1 Características generales

Se conoce con el nombre genérico de bromelina a la principal endopeptidasa aislada y purificada a partir de diversas partes de la planta de ananá (*Ananas comosus*, figura 1.10), distinguiéndose a la *bromelina de tallo* (BR, EC 3.4.22.32) como la proteasa predominante (casi el 90%) en los extractos de tallos, y diferenciándose de la denominada *bromelina de fruto*. La BR se halla presente en el tallo del ananá junto a otras dos peptidasas menores, ananaína y comosaína (Harrach y col., 1998).



Figura 1.10: Fotografías de la planta de ananá y su fruto.

La secuencia aminoacídica completa de esta enzima (212 aminoácidos) ha sido deducida por Ritonja y colaboradores (1989) y corresponde a una única cadena polipeptídica glicosilada con un PM informado que varía entre 26000 y 37000 Da (Wharton, 1974; Suh y col., 1992) y un punto isoeléctrico (pI) de 9,55 (Murachi y Takahashi, 1970). Contiene siete residuos de cisteína (Napper y col., 1994; Harrach y col., 1998) y tres puentes disulfuro.

La BR presenta un rango de estabilidad de pH de entre 3,00 y 6,00 y de temperatura de hasta 60 °C. Puede conservarse perfectamente en forma de polvo en un recipiente bien cerrado a 8 °C durante 2 años sin pérdida notable de actividad.

Esta enzima se encuentra dentro de las denominadas proteasas sulfhidrúlicas o cisteín endopeptidasas cuya actividad depende del grupo tiol del residuo de cisteína localizado en el sitio activo de la enzima. Por ello, para expresar su máxima actividad la BR requiere la presencia de agentes reductores, tales como cisteína. El rango de pH de actividad óptimo está entre 4,00 y 7,00 y depende tanto de la naturaleza del sustrato empleado, tipo y concentración del buffer y de la presencia o no de agentes reductores (Rowan y Buttle, 1994).

Además de su elevada actividad sobre distintos sustratos proteicos, la BR actúa eficientemente sobre sustratos sintéticos que contengan uniones arginina-arginina (Arg-Arg) (Napper y col., 1994), mientras que la bromelina de fruto y la ananaína presentan mínima actividad frente a sustratos de este tipo (Hale y col., 2005).

Por otra parte, la bromelina del fruto (EC 3.4.22.33) constituye el 30-40% de las proteínas totales del fruto. Es una cadena polipeptídica simple, de aproximadamente 25000 Da (Rowan y col., 1990), cuyo pI es 4,60 (Ota y col., 1964). Un sustrato sintético apropiado para bromelina de fruto es Bz-Phe-Val-Arg-NHMec (Bz = benzoil, Mec = metilcumarina), que es pobremente hidrolizado por bromelina de tallo (Rowan y col., 1990). La bromelina de fruto tiene mayor actividad proteolítica que bromelina de tallo y, al igual que ésta, tienen un amplio pH óptimo frente a sustratos proteicos y sintéticos (Rowan y Buttle, 1994). Sin embargo, a diferencia de la de tallo, la bromelina de fruto no se halla disponible comercialmente debido a las grandes cantidades de desperdicios de fruto (ananá), valioso *per se*, generados para obtenerla (Caygill, 1979).

Carica papaya es el nombre científico de una planta perteneciente a la familia de las *Caricáceas*, cuyo fruto, la papaya o mamón (figura 1.11), produce un látex muy rico en cuatro cisteín endopeptidasas: la papaína (PAP, 3.4.22.2), la quimopapaína, la glicil-endopeptidasa y la caricaína. Dichas proteínas se sintetizan como precursores inactivos que se convierten en activos a los dos minutos de que la planta es herida y el látex secretado. Si bien la PAP es un componente minoritario del látex (\approx 5-8%), es la proteasa más estudiada ya que presenta variadas aplicaciones industriales (Azarkan y col., 2003). Aparentemente, el rol biológico de esta enzima en la planta está relacionado con la reparación y cicatrización frente al daño producido en el fruto por plagas, insectos y hongos (Barrett y col., 2012).

La PAP cristalina muestra un alto grado de estabilidad, mientras que en solución pierde del 1 al 2 % de su actividad por día, debido probablemente a fenómenos de autólisis y/u oxidación. Su pH óptimo de actividad está entre 3,00 y 9,00, dependiendo del tipo de sustrato utilizado (Edwin y Jagannadham, 2000; Ghosh, 2005). Resiste altas temperaturas (3 horas a 100 °C) y muestra una gran estabilidad en el rango de pH de 4,00 a 9,00 (Cohen y col., 1986). Tiene un pI de 8,75 y un PM de 23400 Da (Mitchel y col., 1970) resultado de la presencia de 212 aminoácidos que conforman una sola cadena polipeptídica estabilizada por tres puentes disulfuro (Edwin y Jagannadham, 2000).

En cuanto al mecanismo catalítico de acción, al igual que BR, la PAP es una tiolprotesa, requiriendo la presencia de un grupo sulfhidrilo libre para evidenciar su actividad enzimática. En la PAP, dicho grupo es aportado por un residuo de cisteína y, frecuentemente, se encuentra bloqueado formando una unión disulfuro. Para lograr su

activación debe adicionarse algún agente reductor tal como cisteína, sulfuro, sulfito o cianuro (Cooper y col., 2005).



Figura 1.11: Fotografías de la planta de papaya y su fruto.

1.7.2 Principales aplicaciones

La BR es una proteasa de gran importancia, principalmente en la industria alimenticia. La *Food and Drug Administration (FDA)* ha categorizado a la BR como aditivo alimentario y la ha enmarcado dentro de las sustancias consideradas como seguras, encontrándose disponible comercialmente al público en general en tiendas naturistas y farmacias de los EE.UU. y Europa (Ley y col., 2011).

Se la utiliza como ablandador de carnes, para la producción de hidrolizados proteicos, en la clarificación de cerveza y como suplemento dietario (Tochi y col., 2008). También se la emplea como ingrediente activo en la industria cosmética (Aehle, 2007), en la industria textil para mejorar las propiedades de teñido de las fibras proteicas (Koh y col., 2006) y para el tratamiento del ablandamiento y suavizado de cueros y pieles (Walsh, 2002). Vale aclarar que los residuos de tallos de ananá, como producto derivado del procesamiento de BR, pueden ser usados como aditivo en alimentos animales y como medio para el cultivo de plantas tales como orquídeas y plantas de té. El citrato de calcio, producto derivado de la refinación del ácido cítrico, también es un producto derivado en el procesamiento de BR. Por lo tanto, la producción industrial de esta enzima tiene un elevado valor aditivo

En el campo de la medicina se la utiliza como terapia enzimática en pacientes oncológicos debido a que presenta efectiva actividad anti-tumoral favoreciendo la producción de citoquinas que actúan sobre los tumores regulando su crecimiento y, por

lo tanto, controlando la metástasis (Gerard, 1972; Kalra y col., 2008; Chobotova y col., 2010). También se la utiliza para remover tejido muerto o dañado luego de algún tipo de quemadura, mejorar la absorción de fármacos, en particular de antibióticos (Maurer, 2001), disminuir la hinchazón (inflamación), especialmente después de una cirugía o lesión (Pizzorno y Murray, 1999), prevenir la acumulación de agua en el pulmón y retardar la coagulación. La BR se ha utilizado con éxito como enzima digestiva para muchos trastornos intestinales ya que puede ser absorbida por el intestino sin degradación y sin perder su actividad biológica (Castell y col., 1997; Chobotova y col., 2010).

Por su parte, la PAP también es usada como ablandador de carnes y en la clarificación de cervezas y otras bebidas (aproximadamente el 95% de las enzimas utilizadas en el ablandamiento de carnes son proteasas vegetales, papaína y bromelina) (Khanna y Panda, 2007). Es también un buen agente digestivo, empleándose en el tratamiento de la dispepsia y otros trastornos intestinales (Huet y col., 2006). Es de gran utilidad para suavizar lanas, así como en el curtido de las pieles. En la industria dietética se utiliza en la producción de alimentos especiales para bebés, ya que mejoran la capacidad de asimilación de los alimentos al degradar los compuestos de alto peso molecular a cadenas más cortas. Esta proteína tiene también importantes aplicaciones en medicina: se la utiliza en el tratamiento de la difteria, úlceras sifilíticas, eczemas, psoriasis y herpes. Además, es requerida en áreas como la farmacéutica y la cosmética donde se utiliza en la fabricación de cremas desmanchadoras de la piel. En forma de gel se la utiliza en odontología para la eliminación de caries y en procedimientos de excavación de la dentina (Beeley y col., 2000; Lopes y col., 2007; Piva y col., 2008). Se han reportado usos referidos al tratamiento de lesiones deportivas y alergias (Deitrick, 1965).

1.7.3 Condiciones para la producción en Argentina

El crecimiento del negocio relacionado con las fitoproteasas ha sido de tal magnitud que, en los últimos años, el mercado mundial se calcula en unos 150 millones de dólares anuales, de los cuales más del 50% pertenece a industrias de la carne, curtido del cuero, láctea, cervecera y de panificación, todas muy desarrolladas en nuestro país y, particularmente, en nuestra región. Estas industrias deben importar casi la totalidad de las enzimas utilizadas, a altos costos, siendo sus proveedores empresas estadounidenses

o europeas que compran la materia prima desde los países productores, purifican las enzimas y las redistribuyen.

En nuestro país, a pesar de la gran variedad de zonas fitogeográficas existentes, al presente son escasos los antecedentes sobre el aislamiento de estas enzimas provenientes de plantas autóctonas (Buttazzoni de Cozzarin y Caffini, 1982). La posibilidad de sustituir algunas enzimas, que actualmente importa la industria, se vería favorecida por el desarrollo métodos económicos y técnicamente viables de aislamiento y purificación de fitoproteasas y por la potenciación de los proyectos de producción de las respectivas materias primas.

En este último aspecto debe puntualizarse que el ananá es un cultivo tropical de América del Sur que, después de la Conquista, se expandió fuertemente por Europa y Asia. Los principales países productores son Tailandia (12%), Filipinas (11%), Brasil (10%), China (9%) e India (8%). En Argentina, el volumen de producción actual es bajo, destacándose las provincias de Misiones y Formosa con un total de 12000 toneladas en el año 2014 (el 0,02 % de la producción mundial), destinadas mayormente al mercado de la fruta fresca. En general, es un cultivo que no demanda mano de obra considerable, lo que permite que sea muy buena alternativa para complementar con otros cultivos, sobre todo para quien se dedica a la horticultura comercial. En el caso de las provincias de Misiones y Formosa se ha desarrollado un proyecto de asociativismo entre pequeños productores e instituciones científicas, como ser el INTA y las universidades, que a través del desarrollo de la biotecnología y micropropagación de las plantas de ananá, pretende acelerar el proceso productivo y obtener productos de excelencia.

La *Carica papaya*, por su parte, es una planta tropical originaria de la región centroamericana. Si bien puede encontrarse ampliamente distribuida a lo largo de las regiones centro y norte de nuestro país, la superficie destinada al cultivo de papaya en el ámbito nacional se concentra en las provincias de Jujuy, Salta, Formosa y Misiones. Particularmente en Formosa y Misiones, la producción de papaya ha crecido notoriamente, en el marco de un Plan de Cultivos Tropicales logrando pasar de 1000 toneladas en 1950 a las 6800 actuales. Esta expansión se debió a varios motivos, entre los cuales cabe resaltar que constituye un muy buen cultivo para combinar con cítricos, ananá u otros que se desarrollan en la provincia (diversificación productiva) y que es una planta de rápido crecimiento y producción (a los diez meses desde la plantación es posible lograr la primera cosecha). En Santa Fe, crecen espontáneamente variantes

silvestres en los suelos arcillosos y arenosos del norte, asociadas a los bosques xerófilos. Hasta hace poco, la provincia era considerada una zona marginal para la producción de esta planta, sin embargo, investigaciones realizadas por científicos de la Universidad Nacional del Litoral (Céccoli y col., 2013), que evaluaron el crecimiento y parámetros de productividad de híbridos precoces de papaya, mostraron muy buenos rindes en campos e invernaderos del centro de la provincia, concluyendo que el cultivo de esta planta resulta viable para fines comerciales. Aunque esto estuvo enfocado principalmente a la obtención del cultivo para la preparación de dulces y mermeladas, abre una posibilidad de desarrollo biotecnológico en la región en la obtención de PAP.

1.7.4 Métodos de aislamiento

Los procedimientos convencionales empleados para la recuperación de BR y PAP a partir de sus fuentes naturales comprenden una serie de pasos u operaciones unitarias que por lo general resultan tediosas, de elevado costo y tiempo de implementación, algunas de las cuales incluso, presentan dificultad para ser adaptadas a macro escala. Entre estas técnicas pueden citarse, la extracción con agentes reductores y quelantes, precipitación con sales, extracción con disolventes orgánicos, complementados con procesos de centrifugación, ultrafiltración y secado, e incluso con el empleo de numerosas técnicas cromatográficas.

Con el objetivo de optimizar la recuperación de estas proteasas mediante el empleo de técnicas más sencillas y menos costosas, es que en las últimas décadas se han desarrollado novedosas estrategias de purificación. Particularmente, técnicas de centrifugación, precipitación con sales, diálisis y cromatografía de intercambio iónico han permitido la recuperación de BR de tallo y fruto (Doko y col., 1991; Devakate y col., 2009; Gautam y col., 2010). En cuanto al empleo de técnicas basadas en la extracción líquido-líquido, los SBAs PEG/MgSO₄ y PEG/K₂HPO₄ han permitido recuperar BR de cáscara y de fruto, respectivamente, con rendimientos cercanos al 100% y factores de purificación (FP) de 2,00-4,00 (Babu y col., 2008; Ketnawa y col., 2009; Ketnawa y col., 2010). Alternativamente, los SBAs formados por copolímeros en bloque también fueron empleados para la extracción de BR de fruto con un rendimiento cercano al 80%, aunque bajo FP (1,25) (Rabelo y col., 2004).

Por su parte, la PAP ha sido recuperada del látex mediante procedimientos de precipitación, diálisis y cromatografías, obteniéndose valores de purificación poco satisfactorios (Kimmel, 1954; Monti y col., 2000). En el caso de las técnicas

cromatográficas, el requerimiento de un procesamiento previo de las muestras es inevitable a fin de evitar el deterioro de las columnas (Azarkan y col., 2003). En cuanto al empleo de SBAs, los sistemas PEG/(NH₄)₂SO₄ han permitido recuperarla con rendimientos próximos al 88% (Nitsawang y col., 2006).

A la fecha, se halla aún pendiente la utilización de SBAs que, manteniendo buenos valores de rendimiento y FP, tengan menor impacto sobre el medioambiente. En este sentido, el empleo de sales biodegradables y la incorporación de interacciones de afinidad, con el agregado de macroligandos poliméricos a los SBAs, que aumenten la selectividad de los sistemas y permitan el reciclado del polímero, se vislumbra como una herramienta superadora para la recuperación de las fitoproteasas BR y PAP.



2.
OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

A partir del marco introductorio planteado, puede destacarse:

- la significativa demanda de las fitoproteasas bromelina y papaína en una amplia gama de industrias locales y nacionales y la necesidad de importarlas a elevados costos;
- la posibilidad cierta de intensificar la producción de sus fuentes naturales: ananá (*Anana comosus*) y papaya (*Carica papaya*) a través de diferentes proyectos de diversificación productiva y promoción de cultivos tropicales;
- la necesidad de desarrollar procesos alternativos de recuperación de enzimas en general y de estas fitoproteasas en particular que sean sustentables, sencillos, que integren procesos y reduzcan costos operativos;
- el parcial conocimiento de los mecanismos de reparto de proteínas en sistemas bifásicos acuosos.

En razón de estas cuestiones y problemáticas, se propuso como **objetivo general** de este trabajo de tesis

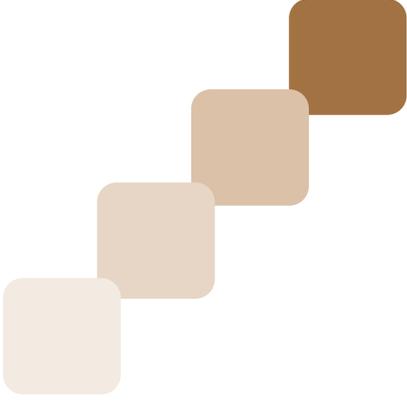
*“la recuperación de bromelina y papaína a partir de tallo de ananá (*Anana comosus*) y látex de papaya (*Carica papaya*) respectivamente, mediante dos metodologías de bajo impacto: extracción líquido-líquido con sistemas bifásicos acuosos preformados y reparto de afinidad usando alginato como macroligando”*

Para lograr dicho objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

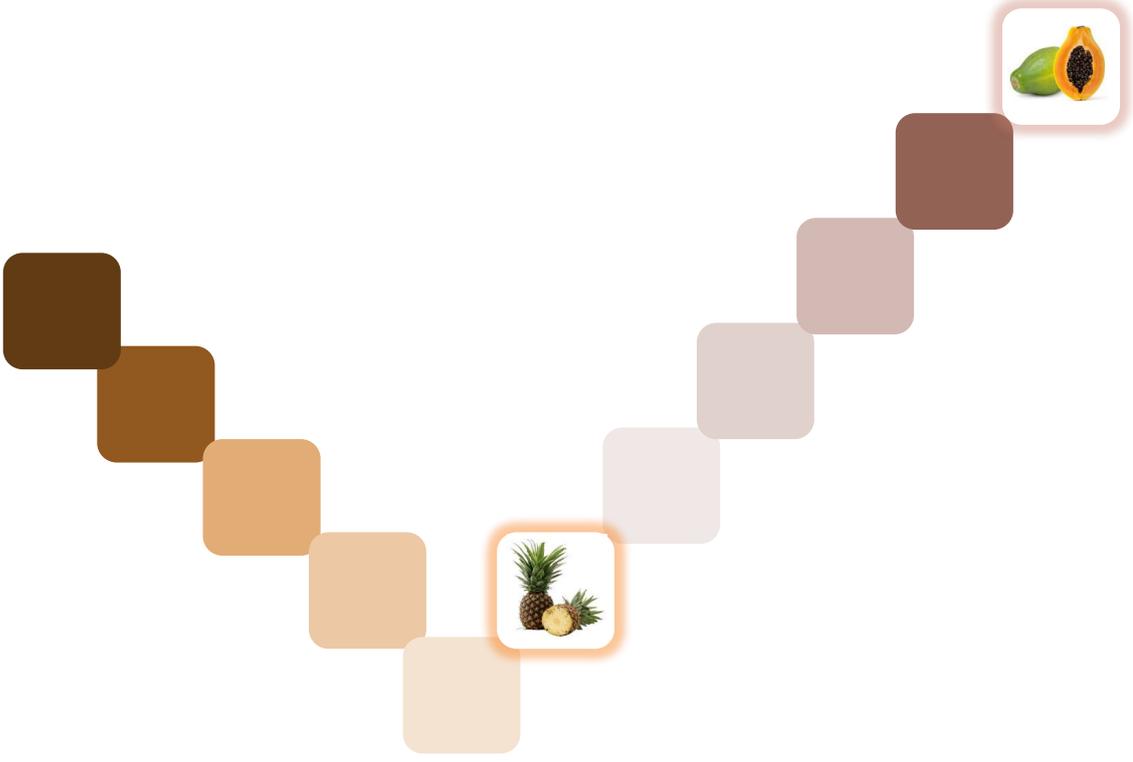
- Describir la interacción de las proteínas de interés, bromelina y papaína, con el polietilenglicol, componente polimérico de los sistemas bifásicos acuosos y el alginato sódico, posible macroligando, pretendiendo avanzar en la caracterización e identificación de las fuerzas intermoleculares involucradas en la interacción y evaluar posibles alteraciones, por parte de los polímeros, sobre la funcionalidad proteica.

- Estudiar el comportamiento de reparto de las enzimas de interés en sistemas bifásicos acuosos formados por polietilenglicol y la sal biodegradable citrato de sodio, con el objeto de contribuir a la comprensión del mecanismo de reparto de las fitoproteasas en los sistemas seleccionados y optimizar las condiciones de extracción de bromelina y papaína a partir de sus fuentes naturales.

- *Emplear el alginato como macroligando de afinidad en el reparto de bromelina y papaína y definir las condiciones experimentales adecuadas de gelificación/disolución del polímero, de modo de diseñar una estrategia combinada para la recuperación ambas fitoproteasas.*



**3.
MATERIALES
Y
MÉTODOS**



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

a) Polímeros

- *Alginato de sodio (NaALG)*: se empleó la sal sódica de ácido algínico (de algas marrones), de baja viscosidad, adquirida en Sigma-Aldrich (A2158). La solución madre fue preparada al 2 %P/P por pesada directa de la droga sólida y posterior disolución en agua destilada o *buffer* según corresponda.

- *Polietilenglicoles (PEGs)*: se emplearon polímeros de calidad analítica de pesos moleculares (PM) promedio: 600, 1000, 2000, 4600 y 8000 (PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4600, PEG8000) adquiridos en Sigma-Aldrich. Las soluciones madre de estos polímeros al 30 %P/P fueron preparadas por pesada directa de la droga sólida y disolución en agua destilada o *buffer* según corresponda.

b) Soluciones reguladoras de pH o buffers

Todos los *buffers* se prepararon a partir de la especie ácida (o básica) y se llevaron a un pH próximo al pKa (con álcali o ácido) de modo de lograr una proporción ácido (o base)/base (o ácido) conjugada que le confiera capacidad reguladora de pH a la solución resultante.

- *Acetato (Ac)*: empleado a dos concentraciones, 30 y 100 mM, preparado a partir de la cantidad adecuada de ácido acético glacial y llevado a pH (4,60 o 5,00, según su aplicación) mediante el agregado de NaOH. Fue adicionado con 100 mM de KCl y 1mM de cisteína en el caso de utilizarse para medidas de actividad de BR.

- *Citrato de sodio (NaCit)*: empleado a dos concentraciones, 50 mM y 25 %P/P ($\approx 1,3$ M), fue preparado por pesada directa de una cantidad adecuada de ácido cítrico anhidro de calidad analítica (Cicarelli), ajustándose al valor de pH requerido (5,20) mediante el agregado de NaOH.

- *Fosfato (Pi)*: 50 mM pH 6,00, empleado como medio de conservación de PAP y para determinaciones en general; y 500 mM pH 7,00, utilizado para medidas de actividad de PAP. Ambos fueron preparados por pesada directa de fosfato monobásico de sodio (H_2NaPO_4) de calidad analítica (Cicarelli) y llevados a pH con NaOH.

- *Tris[hidroximetil]aminometano (TRIS)*: 50 mM, utilizado para medida de actividad de PAP. Preparado por pesada directa de la droga sólida 2-amino-2-

(hidroximetil)-1,3-propanidol de Sigma-Aldrich (T1378) y posterior disolución en agua. Se ajustó al pH de 8,20 con HCl.

c) Enzimas

-*Bromelina de tallo (BR, PM = 28000 Da.)*: adquirida en Sigma-Aldrich (B4882) en forma de polvo liofilizado. Las soluciones madre de BR (100 mg/mL) fueron preparadas por disolución de la droga sólida en *buffer* Ac 100 mM pH 5,00 y posterior agregado de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) hasta una concentración final de 100 mM. La solución proteica fue sometida a centrifugación a 13000 x g durante 10 minutos a temperatura regulada de 20 °C ($\pm 0,1$ °C). El sobrenadante fue adicionado con KCl hasta una concentración final 0,3 M.

-*Papaína (PAP, PM = 26000 Da.)*: adquirida en Sigma-Aldrich (P3375) en forma de polvo liofilizado. Las soluciones madre de PAP (4,35 mM) se prepararon por pesada directa de la droga sólida y posterior disolución en *buffer* Pi 50 mM pH 6,00.

Las soluciones madre de BR y PAP fueron conservadas a -18 °C hasta su utilización, verificándose siempre la actividad enzimática y la ausencia turbidez y de partículas groseras en suspensión.

d) Extractos crudos

- *Extracto de tallo de ananá* (fuente natural de la BR): preparado a partir de frutos frescos adquiridos en el mercado local. En la figura 3.1 se detallan los pasos para la preparación del extracto. En primer lugar, el tallo fue apartado del fruto, eliminándose las hojas de la corona, luego lavado y cortado en pequeños trozos. Inmediatamente fue pesado, triturado con una procesadora eléctrica en *buffer* Ac 100 mM pH 5,00 en una proporción 1 g tallo/mL *buffer*. La suspensión obtenida fue filtrada en baño de hielo usando tamiz de malla gruesa, su filtrado fue dividido en alícuotas de 1 mL y conservado a -18°C hasta su empleo.



Figura 3.1: Preparación del extracto de tallo de ananá: (1) Separación del tallo del resto del ananá; (2) y (3) Corte del tallo en pequeños trozos; (4) Pesada; (5) y (6) Trituración con procesadora eléctrica en buffer Ac 100 mM pH 5,00; (7) Filtrado en tamiz; (8) Suspensión final, lista para dividir en alícuotas y conservar a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- *Látex de papaya* (fuente natural de la PAP): fue obtenido a partir de frutos inmaduros de *Carica papaya*. Luego de limpiar la superficie de los frutos, se le efectuaron cortes longitudinales de aproximadamente 2 a 3 milímetros de profundidad, según puede observarse en la figura 3.2. El látex exudado de las incisiones fue recolectado en frío, en un recipiente limpio y conservado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Antes de ser empleado, el látex fue pesado y disuelto en *buffer* Pi 50 mM pH 6,00 a una relación 100 mg/mL *buffer*.



Figura 3.2: Proceso de obtención del látex a partir de frutos inmaduros de papaya.

e) Sustratos sintéticos

- *N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA, PM = 434,88 Da)*: adquirido en Sigma-Aldrich. La solución madre fue preparada por pesada directa de la droga sólida y posterior disolución en dimetil sulfóxido (DMSO), conservándose a -18 °C hasta su empleo. Las soluciones de trabajo (0,98 mM) se prepararon por dilución de la solución madre en *buffer* Pi 500 mM pH 7,00 o *buffer* TRIS 50 mM pH 8,20 según su uso.

- *α-N-carbobenzoxi-L-lisin-p-nitrofenil éster (LNPE, PM = 437,87 Da)*: adquirido en Sigma-Aldrich. Las soluciones de trabajo (50 mM) debieron ser preparadas inmediatamente antes de su uso por pesada de la droga sólida y posterior disolución en una mezcla acetonitrilo/agua (1:4).

f) Otras soluciones de trabajo

- *Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)*: este reactivo, utilizado para la cuantificación de azúcares, se preparó por pesada directa del ácido (Sigma Aldrich), posterior disolución en agua destilada y agregado de NaOH y Sal Rochelle (Tartrato de Na y K, Anedra).

- *Acrilamida*: adquirida en BioRad® y empleada como solución acuosa a una concentración final 4M.

- *Cisteína (Cys)*: preparada por pesada directa de la droga sólida, adquirida en Sigma (C-7755), y posterior disolución en *buffer* Pi 50 mM pH 6,00.

- *Cloruro de calcio (CaCl₂) 1 M* y *Cloruro de sodio (NaCl) 4 M*: preparadas por pesada directa de la droga sólida (Cicarelli) y posterior disolución en agua destilada.

- *Fenol 5 %P/P*: fue preparada por pesada directa de la droga sólida (Cicarelli) y disolución en agua destilada.

3.2 Métodos

3.2.1 Espectroscopía de absorción

Se obtuvieron los espectros de absorción de BR y PAP entre 260-320 nm en medio *buffer* Pi 50 mM pH 6,00 y en medios conteniendo polietilenglicoles (PEGs) de diferentes PMs al 5 y 10 %P/P y en NaALG al 0,05, 0,10 y 0,20 %P/P para BR y 0,0015 y 0,0030 %P/P para PAP. La concentración final de ambas proteasas fue de 10 μ M excepto para la mezcla PAP + NaALG donde se empleó PAP 20 μ M. Los espectros de absorción fueron obtenidos empleando un espectrofotómetro Jasco V-550 con un ancho de banda de 1,0 nm y una velocidad de barrido de 100 nm/min. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico termostatzada en $(20,0 \pm 0,1)$ °C.

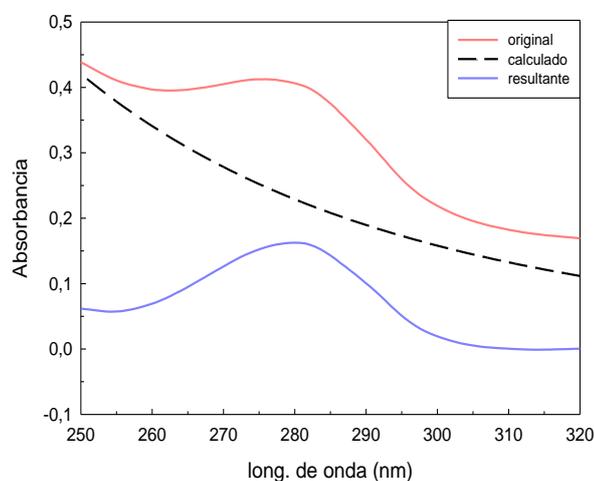


Figura 3.3: Espectros de absorción UV-Vis sin corrección (original) y corregido (resultante) y dependencia de la turbidez (calculado) respecto a la longitud de onda.

En los casos donde los espectros evidenciaban una marcada afectación por turbidez (ver ejemplo figura 3.3), se realizó una corrección según lo propuesto por Camerini-Otero y Day (1978). Para esto, se graficó el logaritmo de la absorbancia (Abs) vs. logaritmo de la longitud de onda (λ) para la porción del espectro correspondiente a altas λ (400-700 nm) donde no absorbe la muestra. Los valores de absorbancia medidos, correspondientes sólo a turbidez, se ajustaron a la recta representada por la siguiente ecuación:

$$\log \text{Abs} = m \log \lambda + h \quad (3.1)$$

A partir de la misma se obtuvieron los valores de m (pendiente) y h (ordenada al origen) que se emplearon para estimar la componente de la absorbancia, debida a turbidez, en el rango de longitudes de onda donde sí absorbía la muestra. Luego, por substracción de esta componente (calculada) se obtuvo el espectro corregido (figura 3.3).

3.2.2 Espectroscopía de fluorescencia

Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia nativa de BR y PAP bajo diferentes condiciones según el efecto evaluado en cada caso. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman Series 2, usando cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico termostatzada a $(20,0 \pm 0,1)$ °C, velocidad de barrido 100 nm/min y ancho de ranura de 4,0 nm. Todos los espectros se hicieron en tres ciclos repetitivos y se corrigieron debidamente por la contribución del *buffer*.

- Efecto de la presencia de polímeros

Se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia de las proteasas (10 μ M) en el rango 300-500 nm, excitando a 280 y 290 nm, en *buffer* Pi 50 mM pH 6,00 y en medios conteniendo PEGs de diferentes PMs al 10 %P/P y NaALG 0,01 y 0,05 %P/P para BR y 0,0015 y 0,0030 %P/P para PAP. Se analizaron en cada caso los valores de la máxima intensidad de la señal fluorescente (I_f) y la posición del pico emisivo (λ_{max}).

- Efecto de la temperatura y tiempo de incubación en presencia de polímeros

Para el análisis de estabilidad por medidas de fluorescencia se analizaron los espectros obtenidos excitando a 280 nm. Se procedió a la incubación de las proteasas con PEGs y NaALG en medio *buffer* Pi 50 mM pH 6,00 en proporciones idénticas a las descritas en el punto anterior. Las temperaturas de incubación empleadas fueron entre 20 y 60 °C para BR y entre 20 y 80 °C para PAP y los tiempos de incubación ensayados fueron 0, 1, 2 y 3 horas. Se determinó λ_{max} de BR y PAP y se representó la intensidad de fluorescencia relativa porcentual ($I_{f,R}$ (%)) vs. el efecto analizado en cada caso. Para el cálculo de $I_{f,R}$ (%) se tomó como 100 % a la intensidad de fluorescencia inicial (tiempo cero) medida en λ_{max} a 20°C y en ausencia de polímero.

3.2.3 Cálculo de las propiedades superficiales de bromelina y papaína

A partir de las estructuras tridimensionales de ambas fitoproteasas se calculó el área superficial accesible para cada aminoácido i , ASA_i , y el área superficial accesible total de cada proteína, ASA_{total} , aplicando el programa de computación SURFACE

RACER (Tsodikov, 2002) basado en el algoritmo de Shrake y Rupley (1973). La hidrofobicidad superficial de cada proteína (HS_{prot}) fue calculada aplicando la siguiente expresión propuesta por Berggren (2002):

$$HS_{\text{prot}} = \sum_{i \in A} r_i HS_i \quad (3.2)$$

que se basa en suponer que cada aminoácido superficial contribuye a las propiedades superficiales totales de la proteína en forma proporcional a su abundancia. En dicha ecuación, HS_i es la hidrofobicidad de cada aminoácido i , A es la colección de los 20 aminoácidos posibles y r_i la fracción de área expuesta por cada tipo de aminoácido en la proteína.

La hidrofobicidad de cada aminoácido (HS_i) fue tomada de la escala de Cowan-Whittaker (1989), que establece un valor de -1 para los aminoácidos más hidrofílicos y +1 para los más hidrofóbicos. La fracción de área expuesta por los aminoácidos del tipo i (r_i) se determinó con la ecuación:

$$r_i = \frac{\sum_{i=1}^{n_i} ASA_i}{ASA_{\text{total}}} \quad (3.3)$$

3.2.4 Extinción de la fluorescencia nativa

La accesibilidad de los grupos fluoróforos (principalmente Trp) de BR y PAP, en ausencia y presencia de los polímeros, fue evaluada midiendo la extinción de la fluorescencia de los mismos utilizando acrilamida como extintor. Esta molécula fue seleccionada por su capacidad de penetrar en el interior de la proteína y extinguir la fluorescencia de Trp internos. Para este ensayo, soluciones 20 μM de las proteasas en *buffer* Pi 50 mM pH 6,00 fueron tituladas espectrofluorométricamente con pequeñas alícuotas (10 μL) de acrilamida 4 M hasta una concentración final en cubeta de 0,35 M. Todas las titulaciones se llevaron a cabo en ausencia de polímero y en presencia de PEGs de distintos PMs 5 y 10 %P/P y de NaALG 0,20 %P/P. La I_f fue medida a 340 nm, siendo la excitación a 280 nm. Luego, los valores de fluorescencia en ausencia y presencia del extintor (I_{f0} e I_f , respectivamente) fueron representados bajo la forma (I_{f0}/I_f) vs. $C_{\text{acrilamida}}$ (concentración de acrilamida) y ajustados utilizando la ecuación de Stern-Volmer modificada:

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = (1 + K_{SV} C_Q) e^{(C_Q V)} \quad (3.4)$$

donde V' es una constante que depende el volumen de la esfera de acción (V) y representa la componente estática de la extinción, C_Q es la concentración de moléculas de extintor (acrilamida) y K_{SV} es la constante de Stern-Volmer o constante colisional (componente dinámica). Esta última se define como el producto entre la constante bimolecular de extinción, k_q (constante cinética correspondiente a la colisión entre el extintor y el fluoróforo) y el tiempo de vida del fluoróforo en ausencia del extintor, τ ($K_{SV} = k_q \times \tau$). Los valores de V' y K_{SV} , obtenidos a partir del ajuste, fueron representados en las distintas condiciones ensayadas.

La ecuación 3.4 se deriva a partir del llamado modelo de "esfera de acción" (Geddes, 2001), el cual contempla una componente estática y otra dinámica en el proceso de extinción. La primera está dada por la extinción instantánea de la fluorescencia del fluoróforo, producida por las moléculas de extintor próximas, ubicadas dentro del volumen de la esfera de acción definida alrededor del fluoróforo. La segunda componente está mediada por el proceso difusivo del extintor.

3.2.5 Espectroscopía de dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular (DC), basada en la absorción diferencial de la luz polarizada circularmente por los distintos cromóforos proteicos, fue aplicada sobre soluciones de ambas fitoproteasas en ausencia y presencia de los diferentes polímeros. El equipo empleado para las determinaciones fue un espectropolarímetro JASCO 810, con velocidad de barrido de 100 nm/min y 10 acumulaciones de todos los espectros. Se termostató a $(20,0 \pm 0,1)$ °C.

Los resultados se expresaron a través de la elipticidad molar residual, $[\theta]$, calculada con la siguiente expresión:

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs}}{10nbC} \quad (3.5)$$

donde θ_{obs} es la elipticidad medida en miligrados; n , el número de aminoácidos de cada molécula de enzima; b , el paso óptico de la cubeta (en cm) y C , la concentración molar de la proteína.

Las medidas fueron realizadas en dos rangos del espectro, UV-lejano y UV-cercano, con el fin de obtener información de la estructura secundaria y terciaria, respectivamente.

- *UV-lejano*: Se obtuvieron los espectros de DC en el rango 195-250 nm para BR y PAP (10 μ M) en ausencia y presencia de PEGs de diferentes PMs al 10 %P/P y de NaALG 0,05 %P/P. Se utilizó cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico.

La composición de estructura secundaria de las proteínas fue estimada a partir del análisis de los espectros utilizando el *software* informático CDPro, desarrollado por Sreerama y disponible en internet (Sreerama, 2016), que ejecuta los programas SELCON3, CDSSTR y CONTIN. El mismo se basa en algoritmos matemáticos y emplea una base de datos de proteínas de referencia con estructura cristalográfica conocida. Debe puntualizarse que en muchas oportunidades los distintos programas no logran resolver de manera correcta la estructura secundaria de las proteínas y conducen a resultados dispares. En los casos donde SELCON3, CDSSTR y CONTIN convergieron a resultados similares, se presumió una resolución satisfactoria y se informó como composición de estructura secundaria la media de todas las estimaciones.

- *UV-cercano*: Las determinaciones fueron realizadas en el rango 260-350 nm utilizando BR y PAP (20 μ M) en ausencia y presencia de los distintos PEGs al 10 %P/P y NaALG 0,10 %P/P. Se empleó cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

3.2.6 Viscosimetría

El comportamiento hidrodinámico del NaALG bajo diferentes condiciones fue evaluado determinando su viscosidad intrínseca $[\eta]$. Para esto se prepararon soluciones de NaALG (0,02-0,10 %P/P) en medio acuoso y en NaCl 0,10 M. Las medidas de viscosidad se llevaron a cabo midiendo los tiempos de escurrimiento del solvente (agua o solución de NaCl) (t_{sv}) y de las soluciones de NaALG (t_{sl}) empleando un ViscoClock SI Analytics adaptado a un viscosímetro Ubbelohde. La viscosidad relativa (η_{rel}) y la viscosidad específica (η_{esp}) fueron calculadas de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\eta_{rel} = \frac{t_{sl}}{t_{sv}} \quad (3.6)$$

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \quad (3.7)$$

Luego, el valor de $[\eta]$ definida como:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow \infty} \frac{\eta_{\text{esp}}}{C} \quad (3.8)$$

donde C es la concentración de la solución del polímero expresada en g/dL, se obtuvo a partir de la ordenada al origen de la recta obtenida al graficar η_{esp}/C (viscosidad reducida) vs. C . En soluciones diluidas, la viscosidad reducida η_{esp}/C está relacionada con la $[\eta]$ a través de la expresión propuesta por Huggins:

$$\frac{\eta_{\text{esp}}}{C} = [\eta] + k_H [\eta]^2 C \quad (3.9)$$

donde k_H es la constante de Huggins.

El peso molecular promedio en viscosidad (PM_{visc}) del NaALG fue estimado aplicando la ecuación de Mark-Houwink:

$$PM_{\text{visc}} = \frac{[\eta]^a}{K} \quad (3.10)$$

considerando $K = 5,1 \times 10^{-5}$ dL/g y $a = 1$ según lo reportado para NaALGs de baja viscosidad en el medio salino utilizado (Vold y col., 2006).

Siguiendo este mismo procedimiento se determinó la $[\eta]$ del NaALG en ausencia y presencia de BR y PAP 0,40 %P/P en *buffer* NaCit 25 %P/P pH 5,20 con el fin de analizar posibles cambios en el comportamiento hidrodinámico del NaALG inducidos por las enzimas. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura constante a $(25,00 \pm 0,05)$ °C.

3.2.7 Dispersión dinámica de la luz

La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés, *Dynamic Light Scattering*) se basa en medidas de la luz dispersada por partículas en solución cuya intensidad fluctúa en el tiempo siguiendo perfiles que dependen del tamaño de la partícula. El procedimiento llevado a cabo se representa esquemáticamente en la figura 3.4. El equipo empleado fue un analizador de partículas HORIBA SZ-100, que trabaja con luz láser de $\lambda = 633$ nm. Se fijó un ángulo de detección (θ) 90° y una temperatura

de trabajo de $(25,0 \pm 0,1)$ °C. Los experimentos tuvieron una duración de 120 segundos y se realizaron por triplicado con un tiempo de retardo de 0 segundo. En cuanto a las soluciones de las proteasas, estas fueron centrifugadas y filtradas utilizando un filtro de tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$ de diámetro. Las concentraciones empleadas en cada caso se resumen en la tabla 3.1. Se tomó como índice de refracción de las soluciones proteicas y NaALG los valores 1,330 y 1,630 cP, respectivamente.

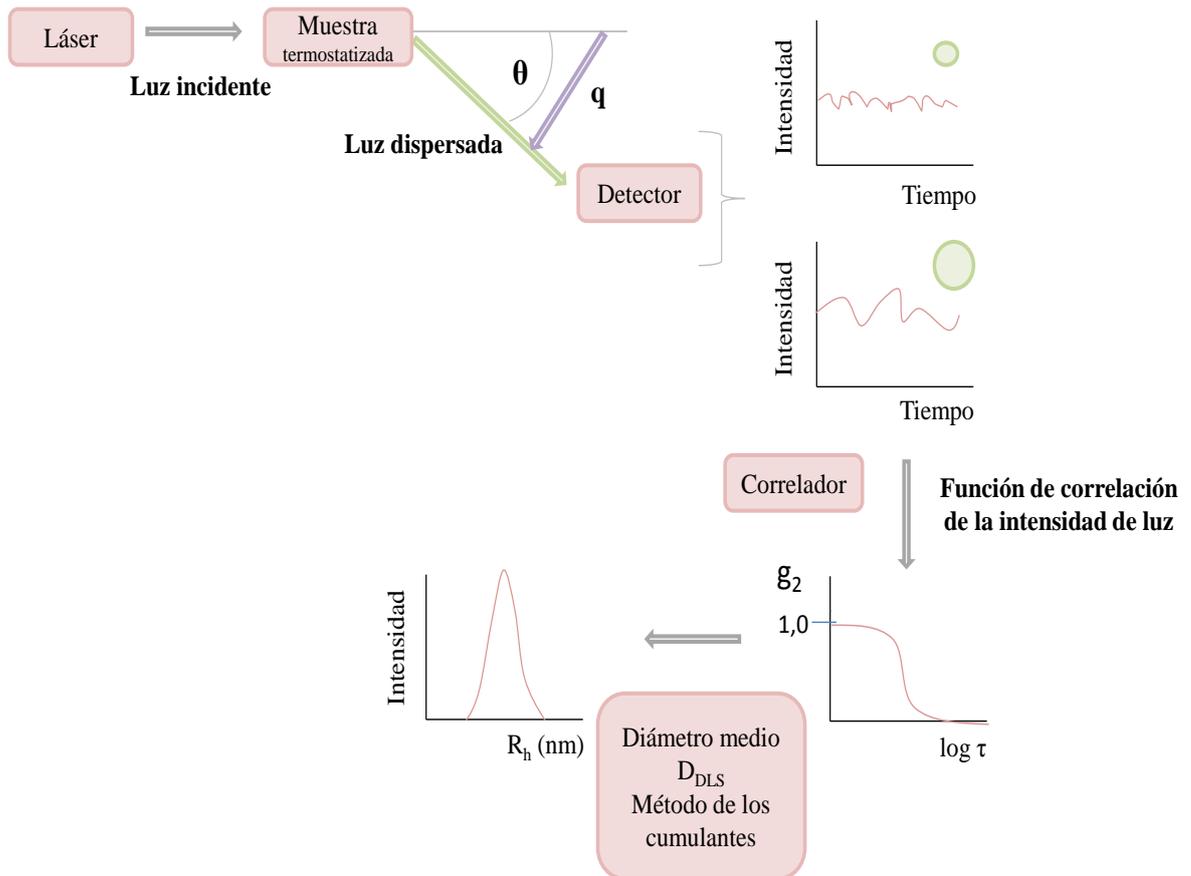


Figura 3.4: Esquema básico del funcionamiento y procesamiento de datos de un equipo para medir DLS. θ es el ángulo al cual se mide la intensidad de la luz dispersada y q la magnitud del vector de dispersión.

La comparación de las señales obtenidas a tiempos t y $t+\tau$ fueron ajustadas con la siguiente función de correlación (g_2):

$$g_2(q, \tau) = A (1 + B |g_1(q, \tau)|^2) \quad (3.11)$$

donde A es un término relacionado con la línea base del equipo, B es una constante que define la intersección de la curva de correlación con el eje de las ordenadas, τ es el

tiempo de decaimiento, g_1 es la suma de todos los decaimientos exponenciales contenidos en la correlación y q es el vector dispersión de luz que responde a la siguiente expresión:

$$q = \frac{4 \pi i \text{sen}(\theta/2)}{\lambda} \quad (3.12)$$

A partir de la función de correlación y aplicando el algoritmo de los cumulantes se obtuvo la función de distribución en intensidad de luz en función del radio hidrodinámico medio (R_h) de las partículas en las diferentes muestras ensayadas.

Tabla 3.1: Concentraciones de BR, PAP, NaALG y mezclas de ambos biopolímeros en buffer NaCit 50 mM pH 5,20 empleadas en DLS.

Sistema	BR (mM)	PAP (mM)	NaALG (%P/P)
1	0,5	--	--
2	--	0,5	--
3	--	--	0,1
4	0,05	--	0,1
5	--	0,005	0,1

3.2.8 Calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC, del inglés, *Isothermal Titration Calorimetry*) permite determinar directamente los valores de las funciones termodinámicas (ΔH° , ΔS° , ΔG°) asociadas a una dada reacción por medidas del calor producido o consumido, a presión constante, cuando se mezclan cantidades precisas de los reactivos en un calorímetro similar al representado en la figura 3.5 A. Uno de los reactivos es colocado en una celda de muestra y el otro (titulante) es agregado de a pequeñas cantidades mediante un inyector. Luego de cada inyección, se produce una variación de calor que se traduce en una señal o pico (figura 3.5 B), cuya integración, mediante *software* apropiado, permite obtener el calor intercambiado (ΔH°). En la titulación de una macromolécula con su ligando, la magnitud del calor por mol de titulante ($\Delta H^\circ/n_{\text{titulante}}$) va disminuyendo al aumentar la relación molar (RM) ligando/macromolécula ($n_{\text{titulante}}/n_{\text{macromolécula}}$), aproximándose a cero en la condición de saturación (figura 3.5 C). El ajuste de los valores $\Delta H^\circ/n_{\text{titulante}}$ vs. RM permite luego,

determinar el modelo de la fijación y estimar los parámetros que lo caracterizan, la constante de fijación, K y la estequiometría, n .

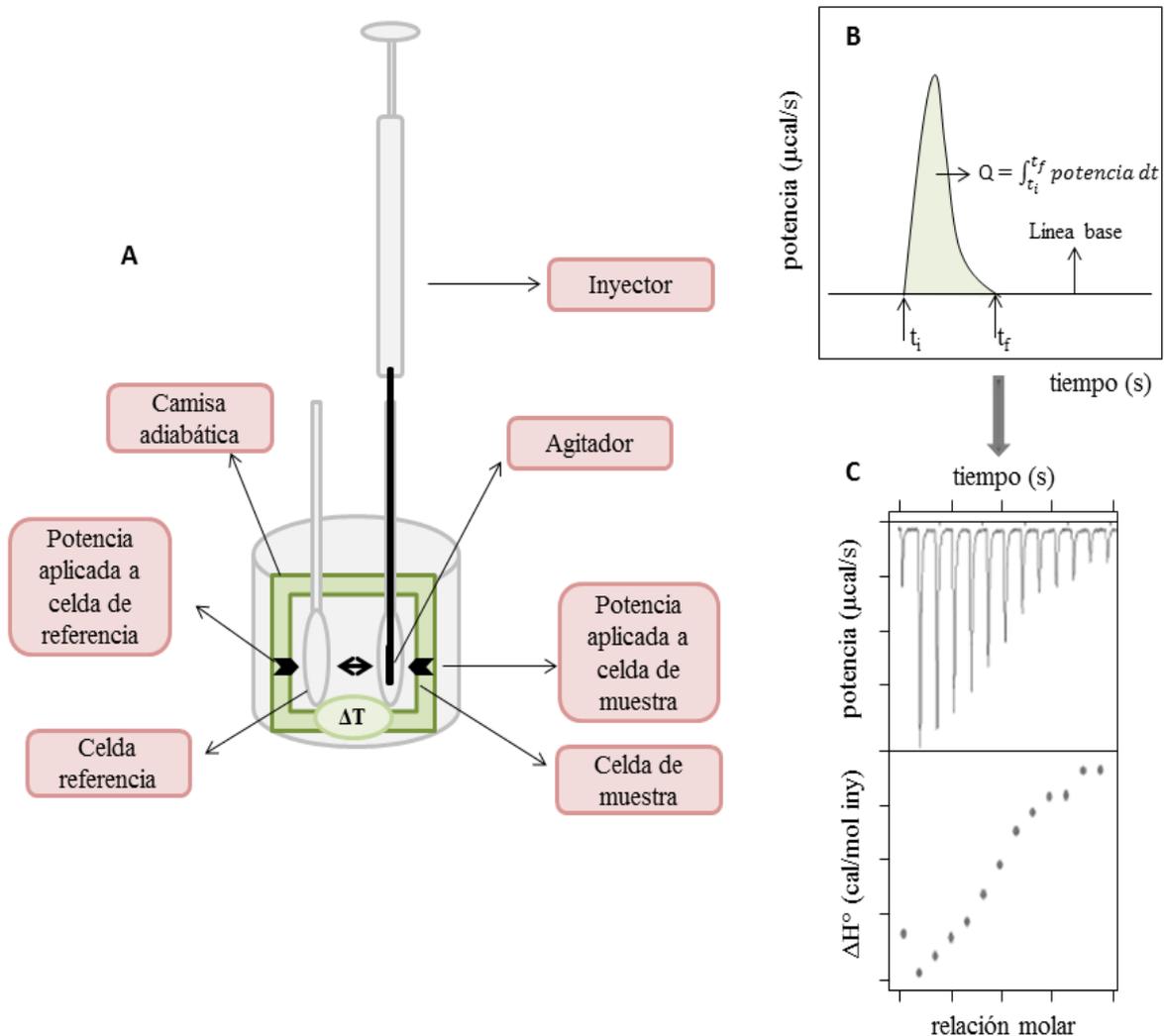


Figura 3.5: (A) Esquema básico de un calorímetro MicroCal VP-ITC. (B) Señal característica de respuesta a una inyección de titulante. t_i : tiempo inicial de la inyección y t_f : tiempo final de la compensación de potencia. (C) Señal obtenida luego de sucesivas inyecciones (panel superior) y ΔH° vs. relación molar (panel inferior).

En nuestro caso, los parámetros de la interacción proteína + NaALG fueron determinados a través de titulaciones calorimétricas de una solución (1,35 mL) de NaALG 0,50 %P/P en *buffer* NaCit 50 mM pH 5,20, colocada en la celda de muestra, con soluciones de ambas proteasas (BR 0,075 mM y PAP 0,200 mM). Las experiencias fueron llevadas a cabo en un calorímetro VP-ITC (MicroCal Inc., USA). El equipo se termostató a $(25,0 \pm 0,1)$ °C durante toda la experiencia y la velocidad de agitación fue de 394 rpm. Se realizaron 14 agregados de 5 μL (duración 10 segundos) y 19 agregados de 10 μL (duración 20 s) cada 10 minutos para la titulación con BR. Para el caso de

PAP se realizaron 14 agregados de 3 μL (duración 6 s) y 15 agregados de 15 μL (duración 30 s) cada 10 minutos. Para cada medida fueron determinados y sustraídos los calores correspondientes a la dilución del NaALG y la disolución de la proteína, realizando sendas titulaciones de NaALG con solución *buffer* y de *buffer* con solución proteica.

Las curvas ΔH° vs. relación molar ($\text{RM} = n_{\text{prot total}}/n_{\text{NaALG}}$) fueron ajustadas a diferentes modelos de fijación, encontrándose como el más satisfactorio a aquel representado por dos etapas de unión secuenciales:

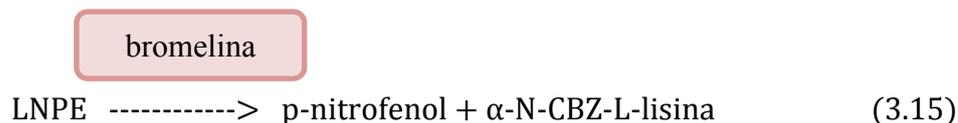
$$r = \frac{K_1 C_{\text{prot}} + 2 K_1 K_2 C_{\text{prot}}^2}{1 + K_1 C_{\text{prot}} + K_1 K_2 C_{\text{prot}}^2} \quad (3.13)$$

siendo r el parámetro de unión ($r = n_{\text{prot unida}}/n_{\text{NaALG}}$), K_1 y K_2 las constantes de afinidad correspondientes a la primera y segunda etapa del proceso de fijación y C_{prot} la concentración de proteína libre (no unida al NaALG). Una vez determinados estos valores, se determinaron los respectivos ΔG° y ΔS° a través de las siguientes expresiones:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad \Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ}{T} \quad (3.14)$$

3.2.9 Medidas de actividad enzimática de las proteasas

Para la determinación de BR se utilizó el método espectrofotométrico basado en la capacidad que tiene dicha enzima de hidrolizar el sustrato α -N-CBZ-L-lisin-p-nitrofenil éster (LNPE) (Silverstein, 1974) de acuerdo a:



donde *CBZ* = carbobenzoxi.

La reacción fue monitoreada espectrofotométricamente a 340 nm (absortividad molar $6320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a intervalos de 10 segundos durante 5 minutos, obteniéndose la actividad a través de la pendiente del tramo inicial (lineal) de la gráfica absorbancia vs.

tiempo. La concentración final de sustrato empleada fue 1,8 mM. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en *buffer* Ac 30 mM pH 4,60, KCl 100 mM, cisteína 1 mM y las medidas llevadas a cabo a 25 °C.

La actividad enzimática de la enzima PAP fue determinada a través del método de Gildberg y Overbo modificado (1990) el cual se basa en la capacidad que presentan ciertas endopeptidasas de hidrolizar el sustrato cromogénico α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida hidrocloreuro (BAPNA), de acuerdo a:

papaína



El seguimiento de la reacción se realizó a través de medidas de absorbancia del producto de la reacción, p-nitroanilina (color amarillo), que absorbe a 400 nm (absortividad molar $10500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a intervalos de 10 segundos durante 5 minutos. La reacción se llevó a cabo utilizando dos medios según el caso: i) *buffer* Pi 500 mM pH 7,00 o ii) *buffer* TRIS 50 mM 8,20, ambos con una concentración final de sustrato de 0,98 mM y cisteína 100 mM. La temperatura se mantuvo constante en 25 °C durante la reacción.

3.2.10 Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas totales fue estimada mediante el método de Warburg y Christian (1941) que consiste en la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm, picos correspondientes a la absorción de ácidos nucleicos y aminoácidos aromáticos de las proteínas, respectivamente. La concentración proteica y de ácidos nucleicos de las muestras analizadas, expresadas en $\mu\text{g/mL}$, fueron obtenidas directamente del espectrofotómetro de doble haz JASCO V-550 que cuenta con una aplicación a tal fin. Todas las determinaciones fueron corregidas, contemplando el valor de absorbancia debido a turbidez.

3.2.11 Cuantificación de alginato de sodio

Para la determinación de NaALG se utilizó el método del fenol-ácido sulfúrico propuesto por Dubois y colaboradores (1956). Es un método muy sensible (10-100 $\mu\text{g/mL}$) basado en la hidrólisis del NaALG en ácido sulfúrico concentrado, produciendo

monosacáridos. Estos son deshidratados dando intermediarios que, en presencia de fenol, forman productos coloreados con un máximo de absorbancia a 480-490 nm. Se obtuvieron diferentes curvas de calibración utilizando soluciones de concentración conocida de NaALG (0-0,0145 %P/P) en diferentes medios: -agua, -soluciones de PEG 2 %P/P de diferente PM y -soluciones de NaCit 12,5 %P/P pH 5,20. Se evaluó el efecto de estos medios en la linealidad y la sensibilidad del método para su aplicación luego en la determinación de coeficiente de reparto de NaALG (K_{rNaALG}) en los SBAs.

3.2.12 Cuantificación de azúcares reductores

Para la determinación de azúcares presentes en el extracto de tallo de ananá y en el látex de papaya se empleó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) que se basa en la reducción que sufre este ácido (de color amarillo) por la glucosa u otros azúcares reductores (AR) (Miller, 1959). El producto formado, el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color naranja), absorbe en el rango 540-570 en relación directa al contenido de azúcares presentes. Se realizaron curvas de calibración utilizando glucosa como patrón (0-20 mM) disuelta en diferentes medios: -*buffer* NaCit 50 mM pH 5,20 y -fase superior e inferior de un SBA PEG8000/NaCit, composición correspondiente a la segunda línea de unión. Estas dos últimas curvas se realizaron para evaluar la potencial interferencia de los componentes de fase (PEG y NaCit a altas concentraciones) en el método aplicado.

3.2.13 Preparación de los sistemas bifásicos acuosos

Se prepararon sistemas madre PEG/NaCit (masa final 100 g) por pesada directa de cantidades apropiadas de soluciones de PEG 30 %P/P de diversos PMs (PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4600 y PEG8000), NaCit 25 %P/P pH 5,20 y agua de acuerdo a las composiciones totales iniciales indicadas en la tabla 3.2. La selección de los SBAs ensayados se realizó a partir de las curvas binodiales PEG/NaCit pH 5,20, temperatura 20 °C, obtenidas previamente en nuestro laboratorio (Tubío y col., 2006). Para cada PEG, se consideraron dos composiciones totales iniciales, una correspondiente a la línea de unión 1 (LU1), próxima al punto crítico, y otra a la línea de unión 2 (LU2), más alejada. En la tabla 3.2 se muestran también las composiciones de equilibrio de las respectivas fases superior e inferior (nodos) de cada sistema.

Tabla 3.2: Concentraciones de equilibrio de los componentes de fase y longitudes de línea de unión para los SBAs PEG/NaCit y PEG+NaALG/NaCit pH 5,20. Temperatura 20 °C.

PM PEG	LU	Composiciones (%P/P)						LLU (%P/P)
		Total		Fase Inferior		Fase Superior		
		PEG	NaCit	PEG	NaCit	PEG	NaCit	
600	1	18,55	15,26	2,89	23,56	37,03	5,47	38,64
	2	21,00	16,20	0,77	27,89	42,65	3,69	48,37
1000	1	15,00	13,20	11,23	14,92	20,09	10,88	9,74
	2	15,92	13,97	5,10	19,01	28,87	7,47	26,42
2000	1	13,25	11,20	2,13	16,28	26,26	5,25	26,53
	2	13,75	14,40	0,13	21,59	36,78	2,24	41,44
4600	1	11,39	9,02	2,01	12,80	18,05	6,33	17,29
	2	11,70	9,65	0,88	14,18	23,92	4,53	24,98
8000	1	10,82	8,83	1,76	11,66	17,38	6,02	16,92
	2	11,69	9,52	0,62	14,64	21,13	5,24	24,42

En la preparación de los sistemas PEG+NaALG/NaCit se procedió de forma similar a lo descrito, adicionándose NaALG por pesada directa de la droga sólida según la concentración final requerida y ajustando la cantidad de agua agregada.

Una vez obtenidos los sistemas madre (con y sin NaALG) y luego de incubar 24 horas a 20 °C, las fases fueron separadas y posteriormente utilizadas para reconstituir SBAs más pequeños formados por 1 g de cada fase.

3.2.14 Determinación del coeficiente de reparto de bromelina y papaína

Sobre los diferentes SBAs (masa final 2 g) se sembraron alícuotas de soluciones madre de BR y PAP comerciales (4350 µM) lo suficientemente pequeñas (no más del 20% de la masa total del SBA) como para no afectar las concentraciones de equilibrio de fases. Cada sistema se mezcló por inversión, se dejó reposar 2 horas en baño termostático a (20,0 ± 0,2) °C y se centrifugó a baja velocidad (2000 rpm) durante 5 minutos. Luego, se separaron las fases y se tomaron cantidades apropiadas

para evaluar la actividad enzimática en cada una de ellas. El coeficiente de reparto (Kr) de BR y PAP se calculó como:

$$K_{r_{BR/PAP}} = \frac{Act_{BR/PAP(FS)}}{Act_{BR/PAP(FI)}} \quad (3.17)$$

siendo $Act_{BR/PAP(FS)}$ y $Act_{BR/PAP(FI)}$ los valores de actividad enzimática en fase superior (FS) y fase inferior (FI), los cuales guardan proporcionalidad con la concentración proteica. Se realizaron controles de las enzimas en ambas fases para corregir el efecto del medio sobre la actividad. En todos los casos se trabajó por triplicado y se informó el promedio de dichas mediciones con sus respectivos desvíos estándares.

3.2.15 Caracterización termodinámica del equilibrio de reparto de bromelina y papaína

Luego de determinar los Krs de BR y PAP a diferentes temperaturas en el rango 15-35 °C y aplicar la versión integrada de la ecuación de van't Hoff.

$$\ln Kr = -\frac{\Delta H^{\circ}}{RT} + cte \quad (3.18)$$

se estimaron los valores de ΔH° del equilibrio de reparto a partir de la pendiente del gráfico $\ln Kr_{(T)}$ vs. $1/T$. La variación de energía libre estándar (ΔG°) fue determinada a partir de la expresión:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln Kr \quad (3.19)$$

y luego, la variación de entropía (ΔS°) con:

$$\Delta S^{\circ} = \frac{(\Delta H^{\circ} - \Delta G^{\circ})}{T} \quad (3.20)$$

Todos los parámetros termodinámicos fueron calculados a partir de los valores promedios de Kr.

3.2.16 Determinación del coeficiente de reparto de alginato de sodio

De manera similar a lo planteado en la sección 3.2.14 para las proteasas, se ensayó el reparto del NaALG. En este caso se sembraron pequeñas alícuotas de soluciones de NaALG 2,00 %P/P hasta una concentración final total de este polímero entre 0,10 %P/P en sistemas PEG/NaCit LU2. Se calculó $K_{r_{NaALG}}$ como:

$$K_{r_{NaALG}} = \frac{C_{NaALG(FS)}}{C_{NaALG(FI)}} \quad (3.21)$$

siendo $C_{NaALG(FS)}$ y $C_{NaALG(FI)}$ las concentraciones de NaALG en cada fase, determinadas por el método descrito precedentemente (sección 3.2.11) y corregidas considerando el efecto de los componentes de fase en las medidas.

3.2.17 Caracterización de los sistemas bifásicos acuosos polietilenglicol+alginato/citrato: obtención del diagrama binodial

Se obtuvieron las curvas binodiales de los sistemas PEG8000/NaCit mediante titulación turbidimétrica (Hatti-Kaul, 2000). Para ello, una solución de PEG8000 30 %P/P fue titulada con pequeñas cantidades conocidas (aproximadamente 0,01-0,05 g) de NaCit 25 %P/P pH 5,20. La aparición de turbidez se tomó como el indicio de la separación de fases, considerándose las concentraciones de PEG y sal en dicha condición como las coordenadas de un punto de la curva binodial. Posteriores agregados de agua hasta desaparición de turbidez seguidos de nuevos agregados de sal permitieron completar la curva. Adicionalmente, se realizó el procedimiento inverso, titulado la solución de NaCit con solución de PEG8000 y superponiendo estos resultados con los de la titulación previa. La temperatura fue mantenida constante en $(20,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$.

Para determinar la curva binodial del sistema PEG8000+NaALG/NaCit, se trabajó de forma similar a la descrita pero adicionando NaALG hasta una concentración final 0,1 %P/P a las soluciones de PEG8000 30 %P/P y de NaCit 25 %P/P pH 5,20 usadas en la titulación.

En ambos casos (con y sin NaALG) el ajuste de los datos experimentales obtenidos se realizó con distintas expresiones empleadas en la literatura en la descripción de la curva binodial, las mismas se presentan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Ecuaciones empleadas para ajuste de datos experimentales de curvas binodiales PEG/NaCit y PEG+NaALG/NaCit 0,10 %P/P.

Ecuación (*)	Nombre	Referencia
$C_{PEG} = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{C_{NaCit} - x_0}{b}\right)}} \quad (3.22)$	Sigmoidea	(Tubío y col., 2006)
$C_{PEG} = e^{(a + b C_{NaCit}^{0,5} + c C_{NaCit}^3)} \quad (3.23)$	Mistry	(Mistry y col., 1996)
$C_{NaCit} = a + (\ln(C_{PEG} + c) + b) \quad (3.24)$	González-Tello	(González-Tello y col., 1996)
$C_{NaCit} = \frac{1}{a + b C_{PEG}^{0,5} + c C_{PEG}} \quad (3.25)$	Graber	(Graber y col., 2000)

(*) C_{PEG} y C_{NaCit} son las concentraciones de polímero y sal respectivamente y a , b , c , x_0 y y_0 son los parámetros de ajuste de cada ecuación.

Luego, se prepararon SBAs PEG8000/NaCit con 3 composiciones totales de PEG y NaCit diferentes (con y sin NaALG 0,10 % P/P) y se determinaron sus nodos mediante la metodología propuesta por Merchuk y colaboradores (1998). La misma se basa en la aplicación de la regla de la palanca y requiere del conocimiento de la ecuación de la curva binodial (aquella correspondiente al mejor ajuste), la composición total (en PEG y NaCit) y el cociente de volúmenes de fase ($V_{(FS)}/V_{(FI)}$) de los sistemas cuyos nodos se quieren determinar.

Una vez obtenidas las composiciones de los nodos, la longitud de la línea de unión (LLU) se calculó mediante la siguiente expresión pitagórica:

$$LLU = \sqrt{(C_{PEG, FS} - C_{PEG, FI})^2 + (C_{NaCit, FS} + C_{NaCit, FI})^2} \quad (3.26)$$

3.2.18 Efecto de la presencia de polímeros sobre la actividad de bromelina y papaína

Se estudió el efecto de la presencia de los polímeros PEG y NaALG sobre la actividad de las proteasas.

Por un lado, para el estudio del efecto del PEG sobre la actividad enzimática, soluciones de BR y PAP 10 μ M se incubaron en medios conteniendo soluciones de PEG al 10 % P/P en medio *buffer* Pi 50 mM pH 6,00, a una temperatura de 20 °C. Este ensayo

se llevó a cabo para distintos tiempos (0, 1, 2 y 3 horas) y temperaturas de incubación. Las temperaturas seleccionadas estuvieron entre 20 y 60 °C para BR y entre 20 y 80 °C para PAP. Además, a modo comparativo, se determinó en paralelo la actividad de BR y PAP en buffer Pi 50 mM pH 6,00.

Cuando se trabajó con NaALG, las proteasas comerciales (500 µM) fueron incubadas en FS del sistema PEG8000/NaCit LU2 en ausencia y presencia de distintas concentraciones del polímero (0,60 y 1,00 %P/P) a 20 °C a fin de poder evaluar posibles interferencias del ligando de afinidad en la actividad de BR y PAP. A modo comparativo, también se determinó en paralelo la actividad de cada proteasa en su *buffer* de conservación (Ac 100 mM pH 5,00 para BR y Pi 50 mM pH 6,00 para PAP). En el caso del ensayo realizado con la enzima PAP y NaALG, la actividad fue medida en los dos medios de reacción indicados en la sección 3.2.9.

Los resultados de ambos ensayos se expresaron a través de la actividad residual porcentual, siendo ésta el porcentaje de la actividad medida en cada condición ensayada, respecto del valor correspondiente a tiempo 0, 20 °C y en ausencia de polímero.

3.2.19 Efecto de la presencia de sales sobre la actividad enzimática de bromelina y papaina

Se estudió el efecto de las sales CaCl₂ y NaCl sobre la actividad de las fitoproteasas (500 µM). Para ello se procedió a incubarlas frente a distintas concentraciones de las sales (40, 80 y 100 mM de CaCl₂ y 250, 500 y 1000 mM de NaCl) en medio *buffer* NaCit 50 mM pH 5,20. Al mismo tiempo se determinó actividad de las proteasas en sus medios de conservación. Los resultados se expresaron a través de la actividad residual porcentual, definida precedentemente, luego de distintos tiempos de incubación (0, 1, 2 y 3 horas).

3.2.20 Determinación de la concentración óptima de CaCl₂ para la formación del gel de alginato

Este estudio se llevó a cabo por titulación turbidimétrica a 20 °C de soluciones de NaALG de distinta concentración (0,20, 0,30, 0,60 y 1,00 %P/P) con una solución de CaCl₂ 1 M, ambas preparadas en medio *buffer* NaCit 50 mM pH 5,20. Trabajando con agitación permanente, luego de cada agregado de 10 µL de la solución de CaCl₂ se tomó una fracción de la mezcla, se midió su absorbancia a 400 nm y luego se devolvió al

sistema para proseguir con un nuevo agregado de sal. Los resultados se representaron en una gráfica de ABS_{400} vs. C_{CaCl_2} (concentración de la sal agregada).

3.2.21 Cinética de formación del gel de alginato

Se prepararon soluciones de distintas concentraciones de NaALG (0,20, 0,60 y 1,00 %P/P) en *buffer* NaCit 50 mM pH 5,20 sobre las cuales se agregó $CaCl_2$ 80 mM registrándose los valores de absorbancia a 400 nm a través del tiempo durante 25 minutos a una temperatura de 20 °C. Los resultados fueron representados en una gráfica de ABS_{400} vs. tiempo, a partir de la cual se determinó el tiempo requerido para la máxima formación del gel de NaALG.

3.2.22 Redisolución de los geles de alginato

Sobre soluciones de NaALG 0,20 y 0,60 %P/P en medio *buffer* NaCit 50 mM pH 5,20 se agregó cantidad suficiente de $CaCl_2$ hasta una concentración final de 80 mM y se incubó a 8°C durante 30 min para la completa formación de los geles de NaALG. Una vez obtenidos, los geles se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 20 °C y se descartó el sobrenadante. Se estudió la redisolución de los mismos incubándolos, con agitación ON a 8 °C en medios con i) distintas soluciones acuosas de NaCl (0, 25, 50, 100, 250 y 500 mM) y ii) mezclas NaCl:NaCit en diferentes proporciones (1:10; 1:2,5; 2,5:1 y 10:1). Se observó y semicuantificó la redisolución lograda en cada condición, empleándose las siguientes categorías: NR, no redisolución; R+, redisolución mínima; R++, redisolución media y R+++, redisolución completa.

También se evaluó el tiempo requerido para redissolver los geles de NaALG, obtenidos a partir de $CaCl_2$ y NaALG 0,20 y 0,60 %P/P, utilizando soluciones de NaCit de diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75, 100, 250, 500 y 1000 mM). Se observó y semicuantificó el proceso de redisolución según lo descrito precedentemente.

3.2.23 Determinación de las condiciones óptimas de gelificación del alginato en fase superior del sistema polietilenglicol 8000/citrato

Se obtuvieron geles de NaALG a partir de diferentes soluciones de NaALG (0,20, 0,30, 0,60 y 1,00 %P/P) en dos medios: i) *FS del SBA PEG8000/NaCit LU2* ($C_{PEG8000} = 24,19$ %P/P, $C_{NaCit} = 4,63$ %P/P) y ii) *FS PEG8000/NaCit LU2 diluida al quinto* ($C_{PEG8000} = 4,84$ %P/P, $C_{NaCit} = 0,93$ %P/P), ambos conteniendo alternativamente BR o PAP (500 μ M). Se observó y semicuantificó la cantidad de gel formado según:

mínima, +; media, ++ y máxima, +++). Se determinó la actividad enzimática en el sobrenadante (SN) del gel y en la solución obtenida al redisolverlo (RD) en NaCit 1 M. Se expresaron los resultados a través de la Actividad recuperada en SN y RD, relativa a la inicial de la solución (100% de actividad), previo a la gelificación, vs. la concentración de NaALG empleada.

3.2.24 Extracción de bromelina y papaína con sistemas polietilenglicol/citrato a partir de los extractos crudos

Se estudió el reparto de las proteasas presentes en extractos de tallo de ananá y en el látex de papaya en SBAs PEG/NaCit LU2 a 20 °C. De la misma manera que lo realizado con las proteasas comerciales, sobre sistemas de 2 gramos finales se sembraron 150 µL de los extractos crudos y se procedió según lo explicado en la sección 3.2.14, determinándose el K_r de BR y PAP por medidas de actividad enzimática (ver sección 3.2.9). Además se procedió a dosar proteínas totales (ver sección 3.2.10) y azúcares reductores (sección 3.2.12) en FS y FI, calculándose luego los valores de R% y FP según se explica en sección posterior y el coeficiente de reparto de azúcares reductores (K_{rAR}).

3.2.25 Recuperación de bromelina y papaína a partir de extractos crudos mediante reparto de afinidad empleando alginato de sodio como macroligando

En base a los resultados precedentes se diseñó y llevó a cabo la siguiente estrategia extractiva conformada por los siguientes pasos:

- Paso 1 (reparto de afinidad/separación de fases): se llevó a cabo en el sistema PEG8000+NaALG/NaCit LU2, siendo la concentración final de NaALG 0,10 %P/P para BR y 0,30 %P/P para PAP, temperatura 20 °C. Se sembraron 150 µL de los respectivos extractos crudos (extracto de tallo de ananá y látex). Luego de 2 horas de incubación, se midieron los respectivos volúmenes y se separaron las fases (FS_{pas01} y FI_{pas01}).

- Paso 2 (dilución de fase/precipitación de afinidad): se tomó la fase polimérica anterior (FS) y se agregó NaALG al 2 %P/P y agua csp alcanzar una concentración final de NaALG de 1,00 %P/P y diluir la fase al quinto. Sobre dicha solución en agitación constante a 3000 rpm se agregó lentamente CaCl₂ hasta una concentración final de 80mM. Luego de incubar durante 30 minutos a 8 °C para una completa formación del

gel, se centrifugó 10 min a 4000 rpm a 20 °C. Se separó el sobrenadante (SN_{paso2}) del gel y se determinó su volumen.

- Paso 3 (redisolución del gel): se agregó 1,75 mL de NaCit 25 %P/P pH 5,20 (preparado en *buffer* NaCit 50mM pH 5,20) sobre el gel y se agitó durante 10 minutos a 8 °C, para lograr redisolución completa. Se midió el volumen de la solución (RD_{paso3}) obtenida.

Se determinó la actividad enzimática y la concentración de proteínas totales en las soluciones: FS_{paso1}, SN_{paso2} y RD_{paso3} de acuerdo a lo descrito en las secciones 3.2.9 y 3.2.10. Los rendimientos porcentuales (R (%)) y factores de purificación (FP) logrados en cada muestra analizada se calcularon de acuerdo a lo detallado en siguiente sección.

3.2.26 Cálculo de rendimiento y factor de purificación

Se calcularon los valores de rendimiento porcentual (R(%)) de las enzimas en cada muestra analizada (fase, SN, etc.) según se indica a continuación:

$$R_{\text{muestra}}(\%) = \frac{\text{Act}_{\text{muestra}} \times V_{\text{muestra}}}{\text{Act}_{\text{extracto}} \times V_{\text{extracto}}} \times 100 \quad (3.27)$$

donde Act_{muestra} y V_{muestra} son la actividad y el volumen de la muestra para la cual se calcula el rendimiento y Act_{extracto} y V_{extracto}, son la actividad y volumen del extracto sembrado (extracto de tallo de ananá o látex) en el SBA.

Para el cálculo del factor de purificación (FP_{muestra}) se empleó la siguiente expresión:

$$FP_{\text{muestra}} = \frac{\text{Act esp}_{\text{muestra}}}{\text{Act esp}_{\text{extracto}}} = \frac{\text{Act}_{\text{muestra}} / C_{PT_{\text{muestra}}}}{\text{Act}_{\text{extracto}} / C_{PT_{\text{extracto}}}} \quad (3.28)$$

siendo Act esp_{muestra} y Act esp_{extracto} las actividades específicas en la muestra analizada y en el extracto de partida, respectivamente, las cuales se determinaron como el cociente entre actividad y concentración de proteínas totales (C_{PT}) en cada caso.

3.2.27 Evaluación de la estabilidad de papaína recuperada en la precipitación de afinidad

Se liofilizaron muestras de látex (sin tratamiento) y del gel obtenido en la precipitación de afinidad (paso 2, sección 3.2.25) que contiene la PAP purificada. Para ello se empleó un liofilizador L101 Liotop. Ambos liofilizados se conservaron a -18 °C durante diferentes períodos (0, 1, 7, 15 y 30 días) al cabo de los cuales se procedió a su redisolución en *buffer* NaCit 1 M pH 5,20 y a la determinación de la actividad enzimática. Se calculó en cada caso la actividad residual, refiriendo el valor medido luego de la incubación por un cierto lapso de tiempo a aquel obtenido el día 0 (sin incubación).

3.2.28 Manejo de los datos experimentales

Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado o triplicado según el caso y el análisis de los datos experimentales se realizó utilizando el programa Sigma Plot versión 10.0 para Windows, que emplea el algoritmo Marquardt-Levenberg (Marquardt, 1963).

Los datos experimentales de calorimetría de titulación isotérmica fueron ajustados empleando el programa informático ORIGIN 7.0.

4. RESULTADOS



4. INTERACCIONES POLÍMEROS-FITOPROTEASAS

❖ **Ideas previas. Interrogantes**

El conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína, a través de estudios cristalográficos, permite vincular muchas de sus propiedades en términos de su estructura. Dado que la actividad biológica se pone de manifiesto cuando la macromolécula está en solución, resolver su estructura por difracción de rayos X puede resultar insuficiente para explicar y comprender su funcionalidad. Sería interesante entonces poder caracterizar el comportamiento de la biomolécula en solución con el fin de monitorear eventuales cambios que ésta pueda sufrir debido a modificaciones en su entorno o a interacciones con los componentes del medio. Analizar cómo dichos cambios pueden o no repercutir sobre la actividad enzimática juega un rol fundamental a la hora de evaluar la aplicabilidad de los diferentes métodos empleados durante el proceso de purificación o una vez finalizado éste, en la etapa de conservación de la molécula blanco. Diferentes técnicas espectroscópicas, calorimétricas o de base hidrodinámica permiten una buena descripción de los sistemas macromoleculares, sin el elevado grado de resolución de las técnicas cristalográficas, pero permitiendo precisar algunos aspectos particulares de la ubicación e interacciones de ciertos grupos específicos en la proteína.

El reparto de afinidad con macroligandos supone el contacto de la proteína de interés con el polímero de fase y con aquel que se utiliza como ligando de afinidad. En nuestro trabajo, los polímeros formadores de sistemas bifásicos son polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares y el rol de macroligando lo cumpliría el alginato sódico.

En este marco, y considerando que las proteínas que se pretenden recuperar por esta metodología son bromelina y papaína, se plantearon los siguientes interrogantes: *¿Qué efecto tiene el polietilenglicol, considerado en la literatura como un polímero inerte, sobre la estructura de las proteínas bajo estudio? El eventual efecto de este polímero, ¿depende de su tamaño? El alginato sódico, polímero con alta densidad de carga eléctrica negativa a pHs superiores a 3,50, ¿interaccionará con las proteínas de interés? En virtud de la similitud de peso molecular, punto isoeléctrico y secuencia aminoacídica de bromelina y papaína, el comportamiento de estas fitoproteasas frente a los polímeros mencionados ¿será el mismo?*

Para el abordaje de estas cuestiones se llevaron a cabo diferentes técnicas cuyos resultados, interpretación y discusión parcial se presentarán a continuación en sucesivos apartados, precedidos por una descripción introductoria de los alcances y aplicaciones de cada técnica.

Al final del capítulo, y a modo de integración, se ensayarán respuestas a los interrogantes planteados.

4.1 Técnicas espectroscópicas

4.1.1 Espectroscopía UV-Visible

El espectro de absorción de una proteína en presencia de un polímero puede reflejar el efecto de éste sobre el entorno de los triptófanos (Trp), tirosinas (Tyr) y fenilalaninas (Phe), aminoácidos responsables de la banda de absorción proteica en el rango 270-300 nm (Banwell y McCash, 1972). Los momentos de transición de estos cromóforos determinan sus bandas absorbivas y dependen fuertemente del entorno, siendo afectados por la polaridad del solvente, cercanía de cargas o dipolos o formación de puentes de hidrógeno. Estas interacciones pueden conducir a corrimientos de los picos de absorción y/o modificaciones en la magnitud de la absorción.

El efecto que producen los diferentes polietilenglicoles (PEGs) sobre el comportamiento absorbivo de la bromelina (BR) puede apreciarse en la figura 4.1 A. Podemos ver que la presencia de los diferentes PEGs 10 %P/P genera pequeñas perturbaciones en los espectros de absorción de esta fitoproteasa. Aquellos polímeros de menor tamaño (PEG600 y PEG1000) no afectan la posición del pico absorbivo mientras que el PEG2000, PEG4600 y PEG8000, polímeros de mayor carácter hidrofóbico que los anteriores, inducen leves corrimientos en la posición del máximo de absorción hacia el rojo (efecto batocrómico). Este efecto es compatible con una disminución de la polaridad en el entorno de residuos aminoacídicos responsables de la señal absorbiva y pone en evidencia cierto grado de exposición de los mencionados cromóforos en BR (Banwell y McCash, 1972). En presencia de soluciones de PEG al 5 %P/P no fueron observados cambios significativos en los espectros (datos no mostrados). Las pequeñas modificaciones observadas en la magnitud de la absorción (altura de los picos), relacionadas con el módulo del momento dipolar de transición podrían deberse, entre otras causas, a cambios conformacionales en la proteína inducidos por el polímero, que resultan en un mayor/menor grado de exposición de Trp o Tyr (Pace y Scholtz, 1997).

Cuando analizamos los espectros de papaína (PAP) en presencia de los distintos PEGs (figura 4.1 B) vemos que no se observan modificaciones significativas ni en los valores del máximo de absorción ni en la posición de la banda. Esto indicaría que estos polímeros no alteran de manera considerable el entorno de los cromóforos, probablemente debido a un menor grado de exposición de los mismos al solvente en la PAP respecto de BR.

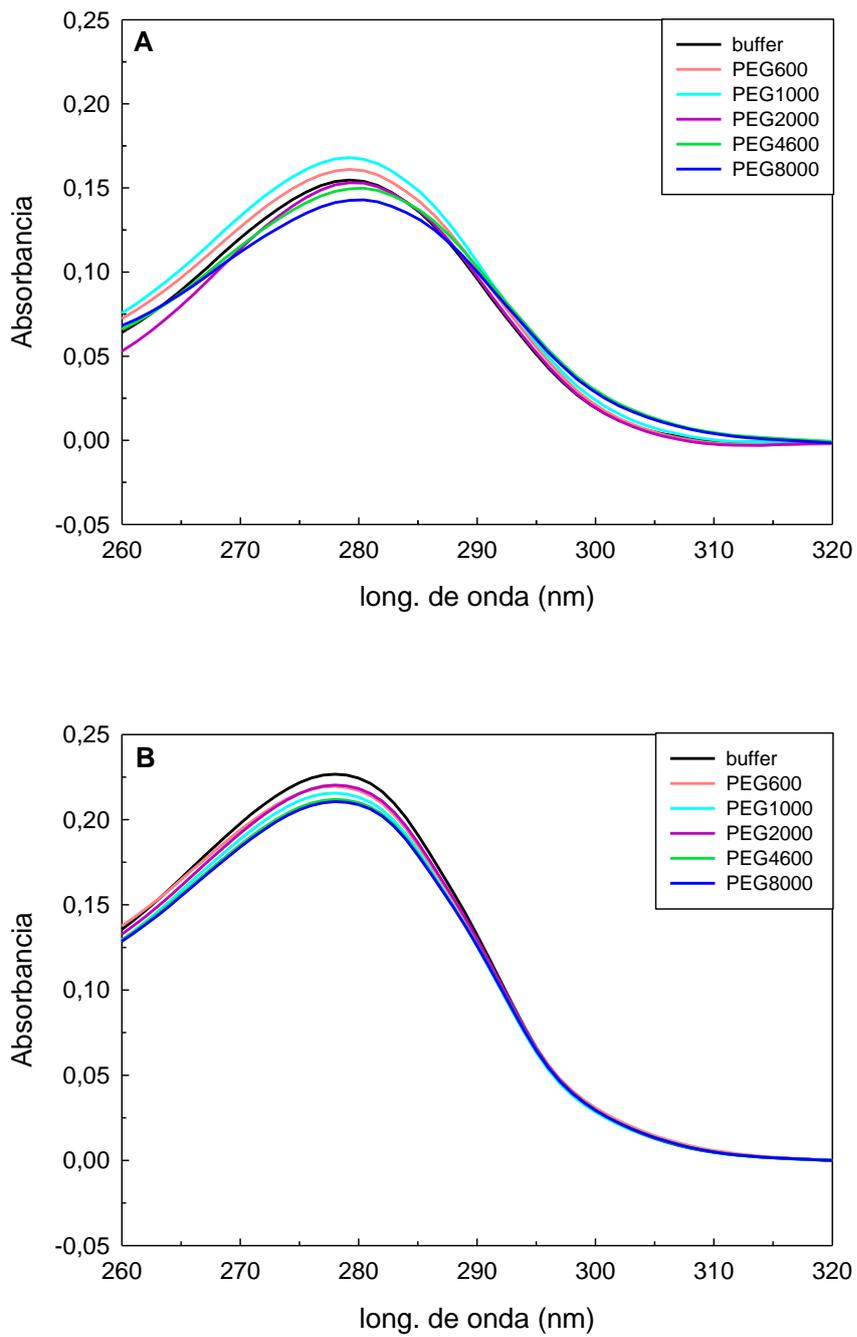


Figura 4.1: Efecto de la presencia de PEGs 10 %P/P sobre el espectro de absorción de (A) BR y (B) PAP 10µM en buffer Pi 50 mM pH 6,00. Temperatura 20 °C.

Cuando se evaluó el efecto de la presencia del NaALG sobre los espectros de absorción de BR debieron modificarse las relaciones proteína/polímero utilizadas anteriormente ya que para concentraciones de NaALG superiores a 0,5 %P/P se observó aparición de franca turbidez y formación de un precipitado blanco. Si bien este efecto dejó de apreciarse visualmente a partir de concentraciones de NaALG inferiores a 0,1 %P/P, el patrón de absorción obtenido en el rango 400-700 nm (ver espectro en el ángulo superior de la figura 4.2 A) evidenció la existencia de dispersión de luz tipo Rayleigh, debida a la presencia de pequeños agregados proteína-proteína y/o proteína-polímero. Luego de restar esta contribución a las medidas de absorbancia (ver apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos) se obtuvieron los correspondientes espectros corregidos que se muestran en la figura 4.2 A en donde puede verse que no se observan cambios en la posición de la banda en presencia del polímero con respecto al *buffer* pero sí incrementos en la magnitud de la absorción que se hacen más notorios a medida que aumenta la concentración de NaALG en la muestra. Esto podría deberse a una sustracción insuficiente del efecto de dispersión de luz o bien a una modificación de la absorptividad de los cromóforos proteicos como consecuencia de la interacción polímero-proteína y/o proteína-proteína.

La figura 4.2 B muestra el efecto ejercido por el NaALG sobre el espectro de absorción de PAP. En este caso fue necesario reducir aún más la concentración del polímero e incrementar la concentración proteica para evitar la aparición de turbidez. Esto puede tomarse como un indicio de una fuerte interacción de esta proteína con el polímero o de una mayor tendencia a agregarse en presencia del mismo. Puede verse que el NaALG para la menor concentración empleada (0,0015 %P/P) produce un leve efecto sobre el espectro de la PAP (corregido), mientras que al duplicar la concentración de este polímero (0,0030 %P/P) se observa un drástico corrimiento al rojo del pico de absorción junto con una significativa disminución de la absorbancia. Este comportamiento podría ser consecuencia de interacciones PAP-PAP o PAP-NaALG que modifican la polaridad y exposición de los residuos aminoacídicos responsables de la absorción en la proteína.

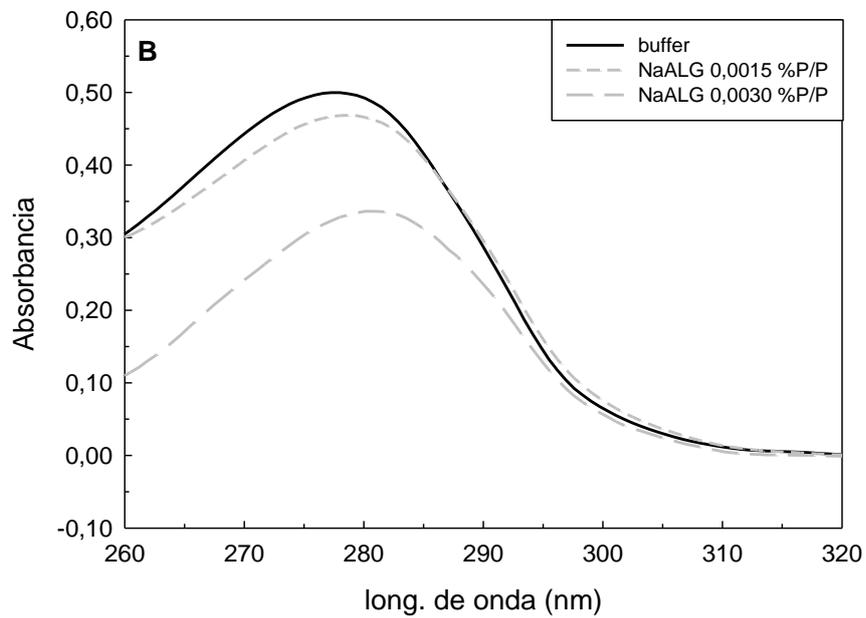
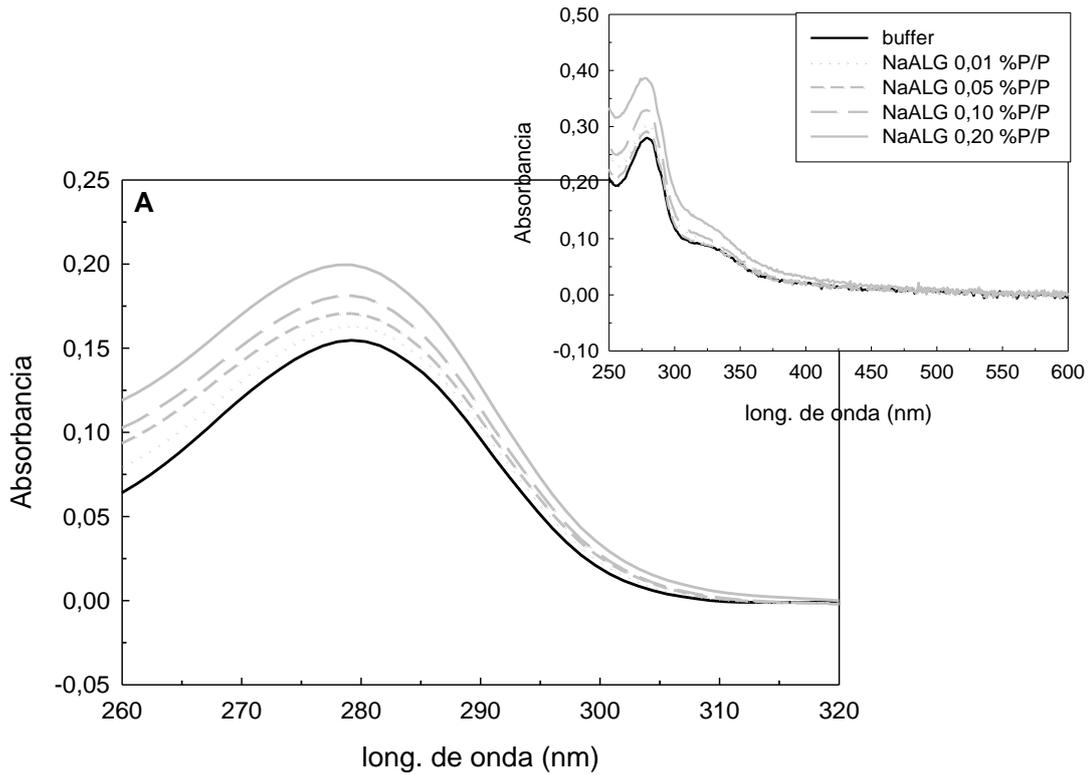


Figura 4.2: Efecto de la presencia de NaALG sobre el espectro de absorción de (A) BR 10 μ M y (B) PAP 20 μ M en buffer Pi 50 mM pH 6,00 Temperatura 20 $^{\circ}$ C.

4.1.2 Fluorescencia nativa

La señal fluorescente intrínseca de las proteínas es muy sensible al contenido y ubicación de Trp y Tyr, aminoácidos signados como sus principales fluoróforos (Burstein y col., 1973). Las interacciones proteicas con componentes del medio y los cambios de polaridad en el microentorno de los mencionados aminoácidos pueden modificar la longitud de onda del máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) y la intensidad de la fluorescencia emitida, extinguiéndola o exaltándola (Lakowicz, 2013).

En la figura 4.3 A y B se observan los espectros de emisión de fluorescencia de BR y PAP, respectivamente, en ausencia y presencia de soluciones de PEGs de diferentes PMs. Para el análisis, se debe tener presente que la señal obtenida al excitar a 280 nm proviene mayoritariamente de la emisión directa de los restos de Tyr o Trp o bien de la emisión indirecta de estos últimos vía transferencia de energía, ya que el pico emisivo de Tyr, próximo a 300 nm, coincide con el pico absorbivo de Trp (280 nm). Por otro lado, los espectros de emisión obtenidos al excitar a 290 nm reflejan sólo la emisión de los Trp y consecuentemente presentan una menor intensidad que los anteriores.

El espectro de emisión de BR (figura 4.3 A), en ausencia de polímero y excitando a 290 nm, permite apreciar un pico emisivo a 332 nm y un pequeño hombro alrededor de 320 nm, que sugeriría la presencia de diferentes poblaciones de Trp con diverso grado de exposición en la molécula. Los Trp superficiales se encuentran en un entorno más polar y por lo tanto sus $\lambda_{\text{máx}}$ están más corridas hacia el rojo del espectro (Duy y Fitter, 2006; Lakowicz, 2013). En el caso de PAP, en ausencia de PEG y excitando a 290 nm, se aprecia un único pico emisivo alrededor de 338 nm sugiriendo una población de Trp con grado de exposición semejante.

La tabla 4.1 muestra el área superficial accesible (ASA) para diferentes aminoácidos presentes en las proteasas BR y PAP. Esta información fue obtenida mediante el procedimiento descrito en la sección 3.2.3 basado en la conformación proteica obtenida a partir de un banco de datos público. El cálculo del área expuesta por estos residuos en la molécula de BR muestra que, efectivamente, de la totalidad de Trp presentes (5), aquellos en las posiciones 8 y 27 están prácticamente ocultos en la molécula, con muy baja área superficial accesible, mientras que los restantes (^{67}Trp , ^{176}Trp y ^{180}Trp) están significativamente más expuestos. Esto corroboraría la presencia de dos poblaciones de Trp evidenciada en los espectros de fluorescencia para esta enzima. En cambio, para el caso de PAP, vemos que dichos residuos aminoacídicos

presentan valores de ASA más parecidos entre sí, justificando el único pico de emisión de fluorescencia observado.

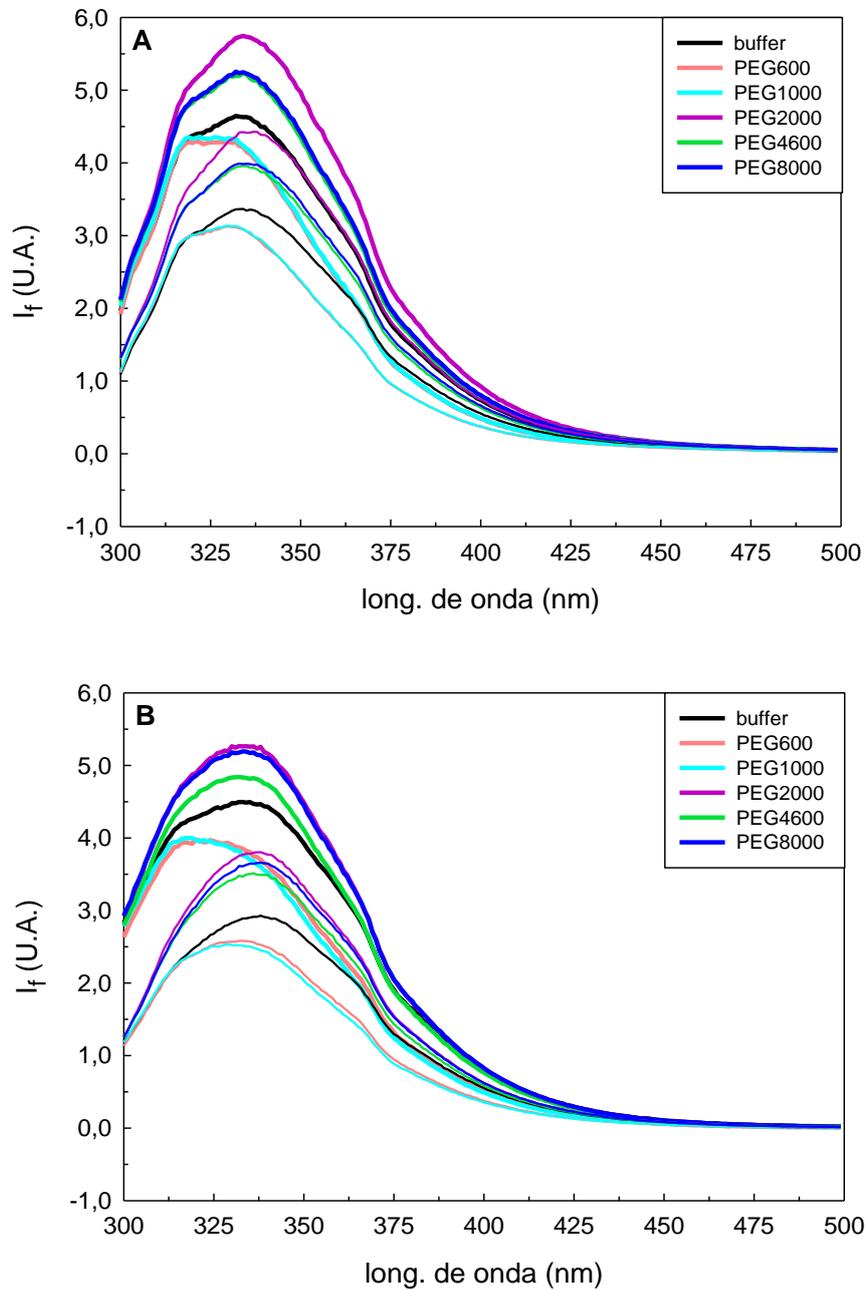


Figura 4.3: Efecto de la presencia de PEGs 10 %P/P sobre el espectro de emisión de fluorescencia de (A) BR y (B) PAP 10 μ M en buffer Pi 50 mM pH 6,00.
 $\lambda_{exc1} = 280$ nm (trazo grueso), $\lambda_{exc2} = 290$ nm (trazo fino).
 Temperatura: 20 °C.

Tabla 4.1: Área superficial accesible de triptófanos, lisinas, histidinas, argininas y tirosinas calculadas para BR y PAP con el programa SURFACE RACER.

Aminoácido	ASA (Å ²)			
	Bromelina		Papaína	
Trp	353,75	(5)	194,60	(5)
	⁸ Trp	15,56	⁷ Trp	23,63
	²⁷ Trp	1,55	²⁶ Trp	12,11
	⁶⁷ Trp	139,73	⁶⁹ Trp	82,96
	¹⁷⁶ Trp	111,99	¹⁷⁷ Trp	59,05
	¹⁸⁰ Trp	84,92	¹⁸¹ Trp	16,85
<i>Lys</i>	2057,25	(15)	742,21	(10)
<i>His</i>	46,5	(1)	26,75	(2)
<i>Arg</i>	595,99	(6)	1288,85	(12)
<i>Tyr</i>	968,99	(14)	1251,69	(19)
<i>ASA_{total}</i> (Å ²)	10858,03		9116,21	

Cuando se excita a 280 nm, ambas proteínas muestran el hombro a bajas longitudes de onda, inclusive PAP que no lo mostraba excitando a 290 m. Esto sería adjudicable a la emisión directa de Tyr, presentes en un número significativo en estas proteínas (ver Tabla 4.1).

Analizando el efecto de los PEGs sobre la fluorescencia vemos que ambas enzimas exhiben patrones similares, observándose corrimientos opuestos según se trate de PEGs de menor o mayor tamaño. Ya sea excitando a 280 o 290 nm, los PEGs de mayor PM (PEG2000, PEG4600, PEG8000) produjeron una exaltación de la señal, efecto ya reportado para otras proteínas (Muhammad y col., 2013), que estaría relacionado con el mayor carácter hidrofóbico ya mencionado que presentan los polímeros de mayor PM en relación a los de menor PM. En cambio, en presencia de PEG600 y PEG1000, se produjo una disminución de la señal fluorescente, principalmente del pico emisivo de 332 nm. Esto sugeriría que los Trp más expuestos estarían siendo los más afectados por la presencia de dichos polímeros, que al ser pequeños, tienen mayores posibilidades de interactuar con residuos aminoacídicos de la superficie proteica mediante la formación de puentes de hidrógeno e interacciones

hidrofóbicas (Chen y Tianqing, 2008). Este comportamiento diferencial en relación a los PEGs de alto PM podría atribuirse a que éstos últimos tienen menor capacidad de interactuar posiblemente por cuestiones estéricas, excluyéndose de la superficie proteica.

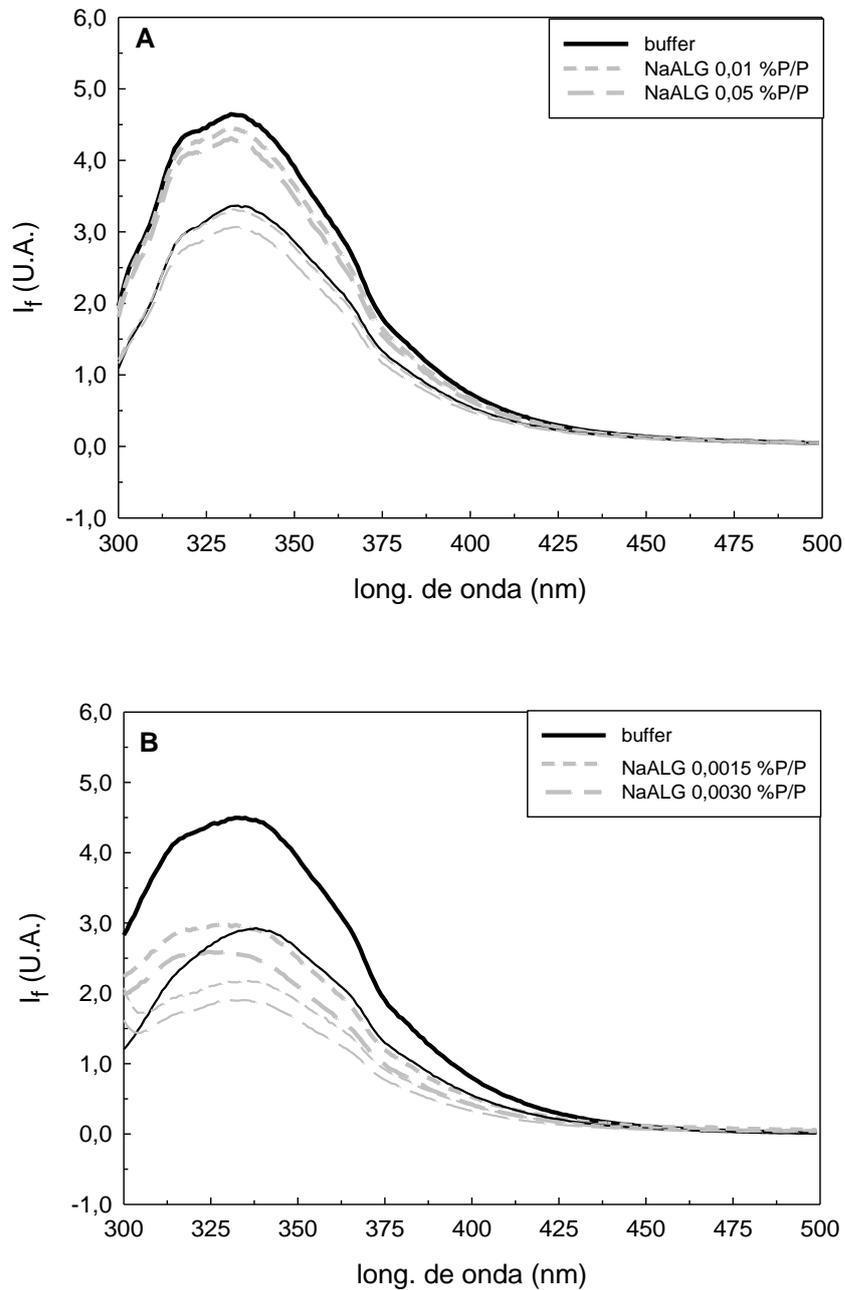


Figura 4.4: Efecto de la presencia de NaALG sobre el espectro de emisión fluorescencia de (A) BR y (B) PAP 10 μ M en buffer Pi 50 mM pH 6,00.

$\lambda_{exc1} = 280$ nm (trazo grueso), $\lambda_{exc2} = 290$ nm (trazo fino).

Temperatura: 20 °C.

La presencia de NaALG, excitando tanto a 280 como a 290 nm, produjo en ambas fitoproteasas un efecto similar: disminución de la señal emitida y leve corrimiento del pico emisivo hacia menores longitudes de onda. Este comportamiento, representado en la figura 4.4, sería similar al ocasionado por los PEGs de menor tamaño, pudiéndose adjudicar a una interacción del NaALG con la superficie proteica, a un efecto de dispersión de luz o a ambas causas. Claramente, la disminución de la altura del pico emisivo fue más significativa para la PAP, a pesar que en este caso la concentración ensayada de NaALG fue inferior a la utilizada para BR.

4.1.3 Extinción de la fluorescencia nativa

La accesibilidad de los Trp proteicos y el efecto que los polímeros PEG y NaALG tienen sobre la mencionada propiedad fue evaluada extinguiendo la fluorescencia nativa de BR y PAP en ausencia y presencia de dichos polímeros. En la figura 4.5 se representa el recíproco del decrecimiento fraccional de la intensidad de fluorescencia nativa, I_{f0}/I_f , versus la concentración del extinguidor acrilamida ($C_{acrilamida}$) para la enzima BR.

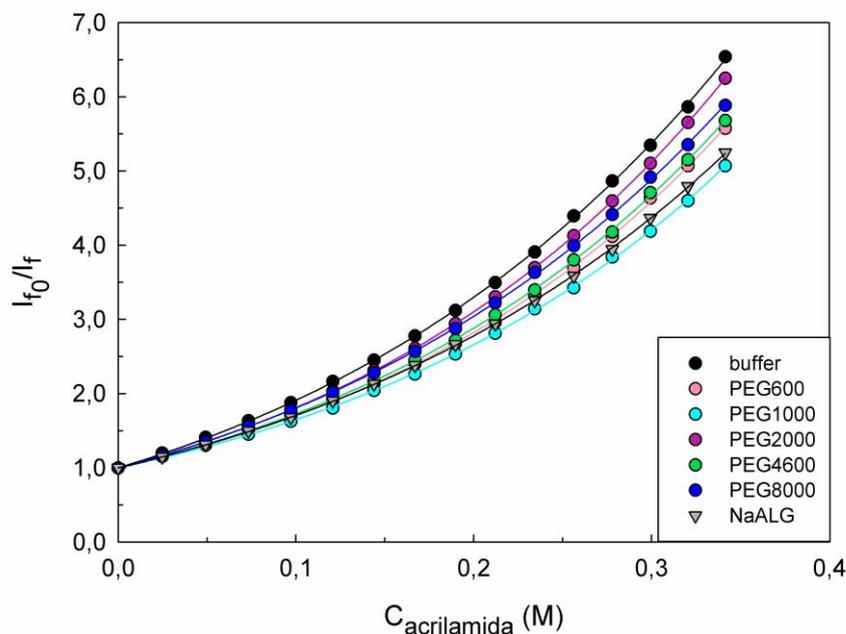


Figura 4.5: Efecto de la presencia de PEGs 10 %P/P y NaALG 0,20 %P/P sobre la extinción de fluorescencia nativa de BR 10 μ M por acrilamida en buffer Pi 50 mM pH 6,00.

$\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 340 \text{ nm}$. Temperatura: 20 °C.

Puede observarse que los gráficos obtenidos resultaron ser curvos y convexos (desde el eje de las abscisas) en todos los medios ensayados, siendo este comportamiento compatible con la coexistencia de extinción estática y dinámica de la fluorescencia (Geddes, 2001). Similares resultados se obtuvieron para la PAP (datos no mostrados).

El ajuste de los datos mediante la ecuación de Stern-Volmer modificada (ecuación 3.4) permitió obtener los valores de las constantes colisional y estática, K_{sv} y V' respectivamente, del proceso de extinción. La figura 4.6 muestra el efecto de la presencia de PEGs de diferentes tamaños en los valores de K_{sv} para BR y PAP.

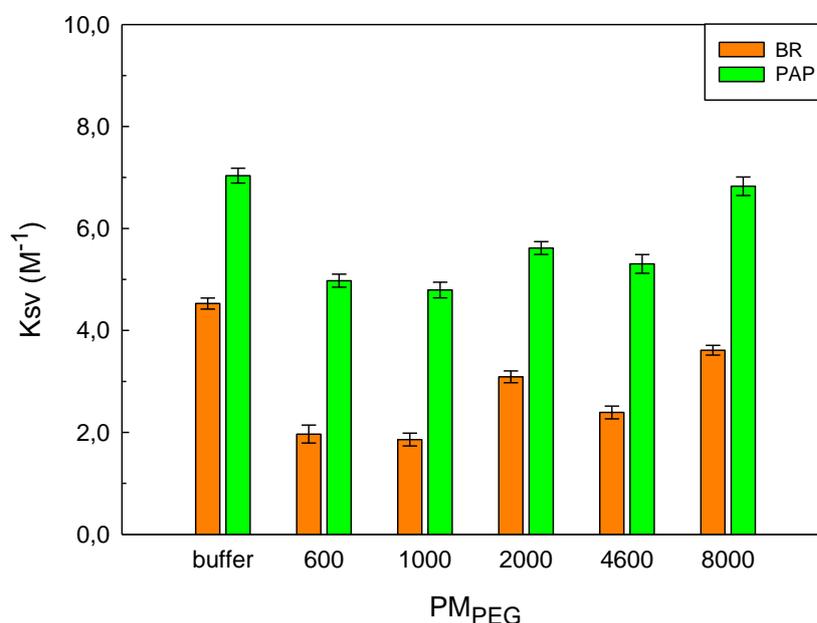


Figura 4.6: Efecto de la presencia de PEGs 10 %P/P sobre el valor de K_{sv} para BR y PAP 10 μ M en buffer Pi 50 mM pH 6,00. Temperatura: 20 °C.

En ausencia de polímero, los valores hallados de K_{sv} para BR y PAP, 4,528 y 7,036 M^{-1} respectivamente, son relativamente bajos (Eftink y Ghiron, 1981) e indican que los Trp, responsables de la fluorescencia nativa de ambas proteínas, no se encuentran totalmente accesibles al extintor (acrilamida), tal como se mencionó en la sección anterior. Los valores de K_{sv} en presencia de polímero resultaron menores, indicando que en presencia de PEG los Trp se encontrarían menos accesibles al extintor. El efecto del tamaño del polímero sobre K_{sv} para BR y PAP muestra un patrón de comportamiento definido. En principio, una leve disminución de la constante colisional para los PEGs de menor PM seguida de un progresivo incremento al ensayar los PEGs

de PMs mayores. Esto puede explicarse considerando la capacidad del polímero de unirse preferencialmente a la superficie de las proteínas (Albee y col., 1997), reportada para los PEGs de menor PM y la habilidad de excluirse, por un mecanismo estérico inespecífico, para aquellos de mayor PM (Timasheff, 1993). En virtud de esto, la disminución de K_{sv} observada para PEG600 y PEG1000, sería consecuencia de la unión de estos polímeros a la proteína y una consecuente reducción de la accesibilidad a los Trp susceptibles de ser alcanzados y extinguidos por la acrilamida. Luego, a medida que el tamaño del PEG se incrementa, esta situación se revierte debido a que estos polímeros se excluyen de la superficie proteica facilitando la colisión entre fluoróforo y extintor, alcanzándose valores de K_{sv} similares a los obtenidos en ausencia del polímero.

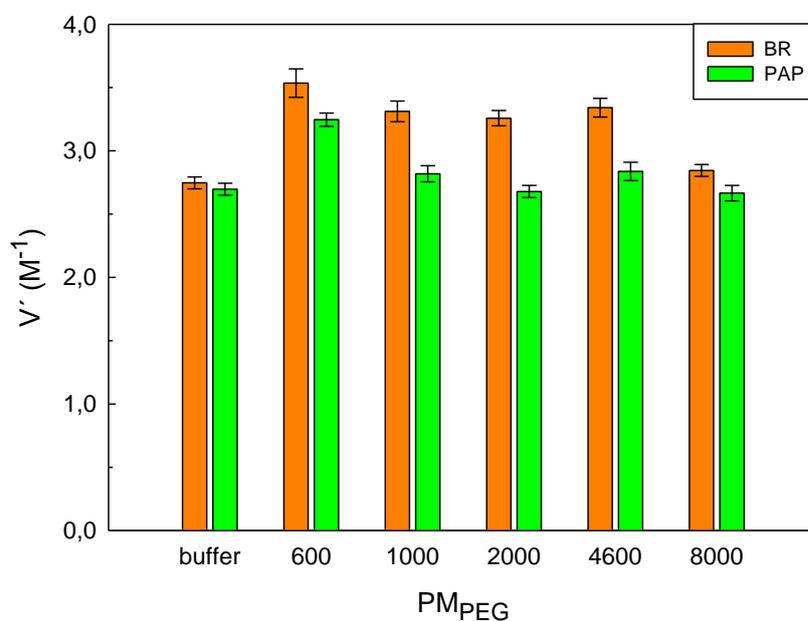


Figura 4.7: Efecto de la presencia de PEGs 10 %P/P sobre el valor de V' para BR y PAP 10 μ M en buffer Pi 50 mM pH 6,00. Temperatura: 20 °C.

Otro de los parámetros analizados fue el valor de V' o constante estática de extinción, en ausencia y presencia de los distintos PEGs. Tal como fue expresado en la sección 3.2.4, el valor de V' está relacionado con el volumen de una esfera virtual definida alrededor del fluoróforo, donde se produce una extinción instantánea de la fluorescencia. En la figura 4.7 se muestra el efecto de la presencia de polímeros en los valores de V' para ambas fitoproteasas. Para BR, se observa que dicho valor aumenta en presencia de los diferentes PEGs, adoptando el máximo valor para el PEG600 y luego

decreciendo hasta valores semejantes a los obtenidos en ausencia del polímero. Para PAP, sólo el PEG600 induce un incremento significativo en el valor de V' . Este comportamiento indica un favorecimiento del proceso de extinción estático en presencia de los polímeros más pequeños y estaría vinculado a la capacidad extintora del propio polímero, observada aún en ausencia de acrilamida, o bien, a la existencia de algún mecanismo molecular por el cual estos polímeros facilitan el proceso de extinción.

El análisis de extinción de la fluorescencia nativa de ambas proteasas también se llevó a cabo en presencia de NaALG. La figura 4.8 A y B muestra el efecto de dicho polímero sobre los valores de K_{sv} y V' , respectivamente, para BR y PAP. En la figura 4.8 A se observa una disminución en el valor de K_{sv} para ambas enzimas cuando éstas se hallan en presencia del polímero, lo que estaría evidenciando que el NaALG ejercería un efecto similar al que ejercen los PEGs de menor tamaño, dificultando la accesibilidad de los residuos susceptibles de ser extinguidos. En la figura 4.8 B, donde se analiza el parámetro V' , puede verse que el valor de V' aumenta levemente en presencia del polímero, mientras que en el caso de PAP se observa una disminución de dicho valor. Este último patrón, diferente al observado en presencia de los PEGs, podría estar vinculado al carácter de polímero eléctricamente cargado del NaALG que por algún mecanismo desfavorecería la extinción instantánea de los Trp por acrilamida.

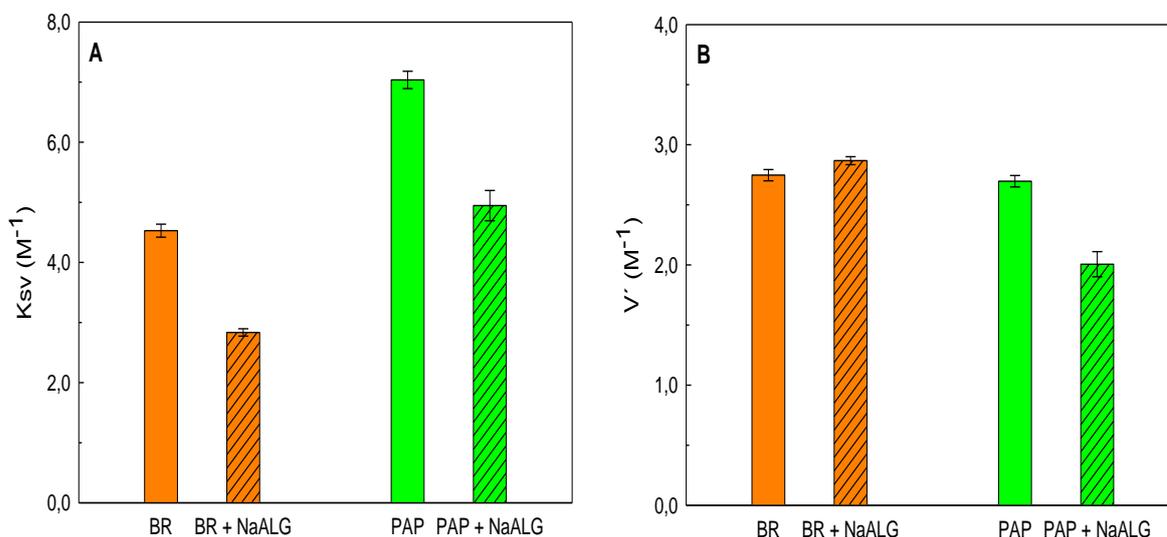


Figura 4.8: Efecto de la presencia de NaALG sobre los valores de (A) K_{sv} y (B) V' de BR y PAP $10\mu M$ en buffer Pi 50 mM pH $6,00$.

C_{NaALG} para BR = $0,01\text{ \%P/P}$, C_{NaALG} para PAP = $0,0015\text{ \%P/P}$.

Temperatura: $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.4 Dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular (DC) es ampliamente utilizada como herramienta biofísica para la determinación de estructuras proteicas en solución. Como es sabido, la secuencia aminoacídica de una proteína contiene la información requerida para determinar el plegamiento de la misma, dando lugar finalmente a la forma nativa. Sin embargo, esta conformación puede verse afectada en solución por la presencia de diversos factores tales como pH, solventes, agentes desnaturizantes, etc. En este apartado nos proponemos analizar de qué manera la presencia de los polímeros PEG y NaALG, empleados durante el desarrollo de esta tesis, podrían afectar el plegamiento de las fitoproteasas BR y PAP.

La figura 4.9 A y B muestra los espectros de DC en el UV-lejano para BR y PAP, respectivamente, en *buffer* y en presencia de los diferentes polímeros. En ambas gráficas se evidencian dos mínimos posicionados alrededor de 207 nm y 222 nm. Estas bandas, características de proteínas tipo $\alpha+\beta$ (Cohen y col., 1986; Ritonja y col., 1989) pueden observarse en todos los espectros, demostrando que ambas proteínas retienen mayoritariamente su estructura secundaria incluso en presencia de PEG y NaALG. Sólo el espectro de PAP en presencia de NaALG y PEG600 mostró una distorsión más notoria.

Se estimó el contenido de las diferentes estructuras secundarias canónicas a partir de la deconvolución de los espectros obtenidos según lo descrito en la sección 3.2.5. Los resultados obtenidos para las diferentes condiciones ensayadas se muestran en la tabla 4.2.

En medio *buffer*, los contenidos porcentuales de hélice α y lámina β , hallados para BR como para PAP son comparables con los reportados previamente en la literatura (Arroyo-Reyna y col., 1994) y compatibles con los correspondientes a proteínas de la familia $\alpha+\beta$. Podemos resaltar el notorio efecto que ejerce el NaALG sobre la PAP, disminuyéndole considerablemente el porcentaje de hélice α y aumentándole el de lámina β (semejante al efecto del PEG600) posiblemente debido a la presencia de algún tipo de interacción enzima-polímero. Esta conversión entre diferentes estructuras secundarias de una dada proteína ha sido observada en interacciones enzima-sustrato peptídico (Reed y Kinzel, 1984) y en transiciones estructurales de proteínas priones recombinantes (Hope y col., 1996).

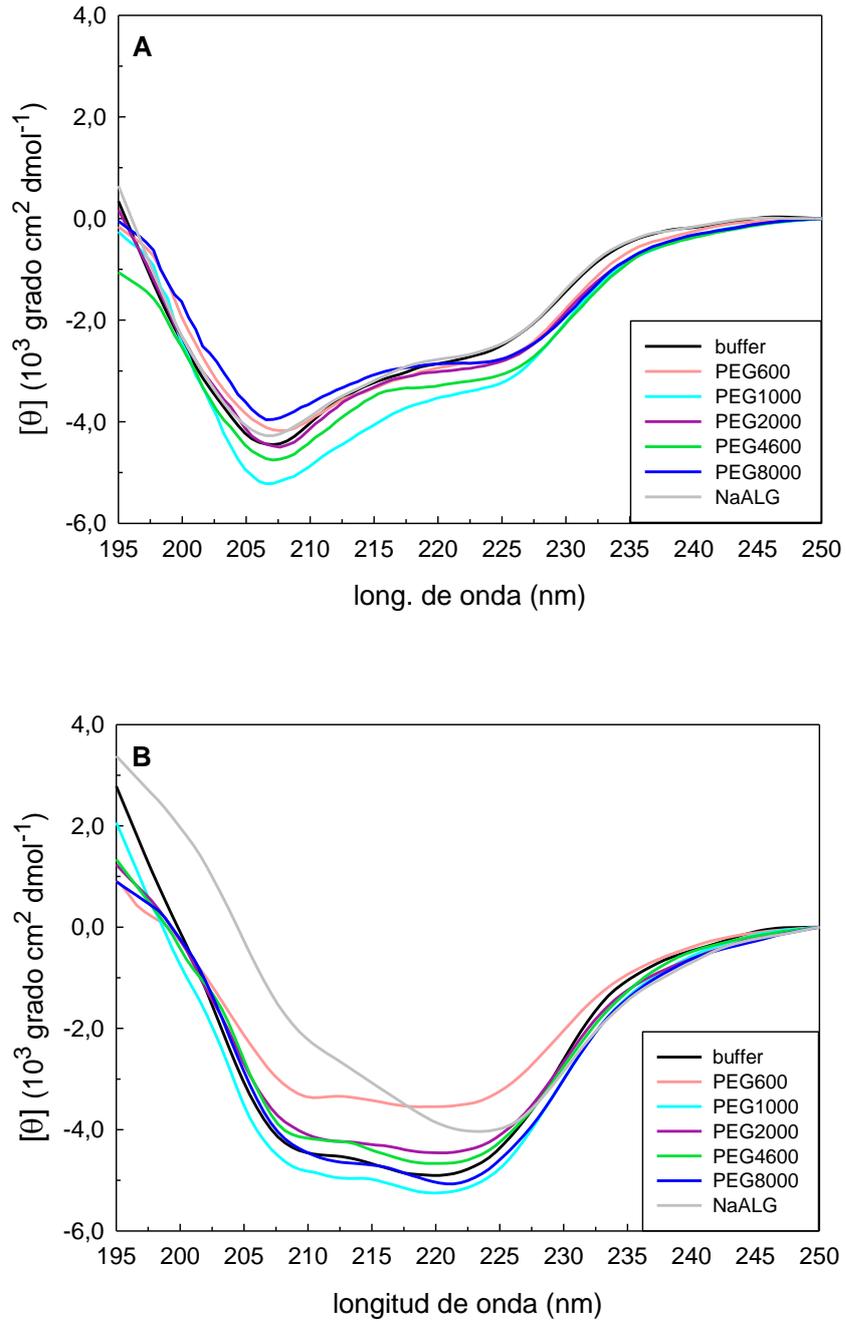


Figura 4.9: Efecto de la presencia de PEGs 10 %P/P y NaALG 0,05 %P/P sobre los espectros de DC en el UV-lejano de (A) BR y (B) PAP 10 μ M en buffer Pi 50 mM pH 6,00. Temperatura: 20 °C.

Tabla 4.2: Composiciones porcentuales de estructura secundaria de BR y PAP estimadas a través de la resolución de sus espectros de DC en UV-lejano en ausencia y presencia de PEGs y NaALG.

Bromelina				
	<i>Hélice α (%)</i>	<i>Lámina β (%)</i>	<i>Giro (%)</i>	<i>Ovillo estadístico (%)</i>
buffer	22,92	22,03	21,62	33,73
<i>PEG600</i>	19,20	23,63	22,32	34,85
<i>PEG1000</i>	24,65	18,89	22,72	33,74
<i>PEG2000</i>	22,37	22,01	22,42	33,20
<i>PEG4600</i>	23,49	19,82	22,55	34,14
<i>PEG8000</i>	19,04	23,58	23,04	34,34
<i>NaALG</i>	21,88	21,44	21,69	35,98
Papaína				
	<i>Hélice α (%)</i>	<i>Lámina β (%)</i>	<i>Giro (%)</i>	<i>Ovillo estadístico (%)</i>
buffer	26,20	20,09	20,22	33,49
<i>PEG600</i>	17,27	25,73	23,02	34,02
<i>PEG1000</i>	24,14	20,34	21,50	34,10
<i>PEG2000</i>	24,52	20,50	21,58	34,40
<i>PEG4600</i>	24,12	20,22	21,16	34,50
<i>PEG8000</i>	24,97	20,12	21,69	33,61
<i>NaALG</i>	14,60	26,17	22,98	36,16

La figura 4.10 A y B muestra los espectros de DC de BR y PAP, respectivamente, en el rango 260-350 nm (UV-cercano). El perfil de los espectros en esta región depende del número y tipo de aminoácidos aromáticos presentes en la proteína, de su movilidad, entorno (puentes de hidrógeno, grupos polares, etc.) y de su disposición espacial (Kelly y Price, 2000).

Para ambas proteínas, se observa un pico próximo a 295 nm, característico de los Trp y otro en la zona 270-280 nm, representativo de Phe y Tyr. En el caso de BR se observan mínimas modificaciones en presencia de los diferentes PEGs y de NaALG que sugieren pequeñas perturbaciones o microarreglos en los entornos de los mencionados aminoácidos, inducidas por la presencia de los polímeros. Para el caso de la PAP en presencia de PEG, no se observaron perturbaciones en los espectros obtenidos. En

cambio, con NaALG, se apreciaron perturbaciones notorias en la magnitud de la señal compatibles con modificaciones (fortalecimiento o debilitamiento) de las interacciones terciarias en diferentes regiones de la proteína, inducidas por la presencia del NaALG (Kelly y col., 2005).

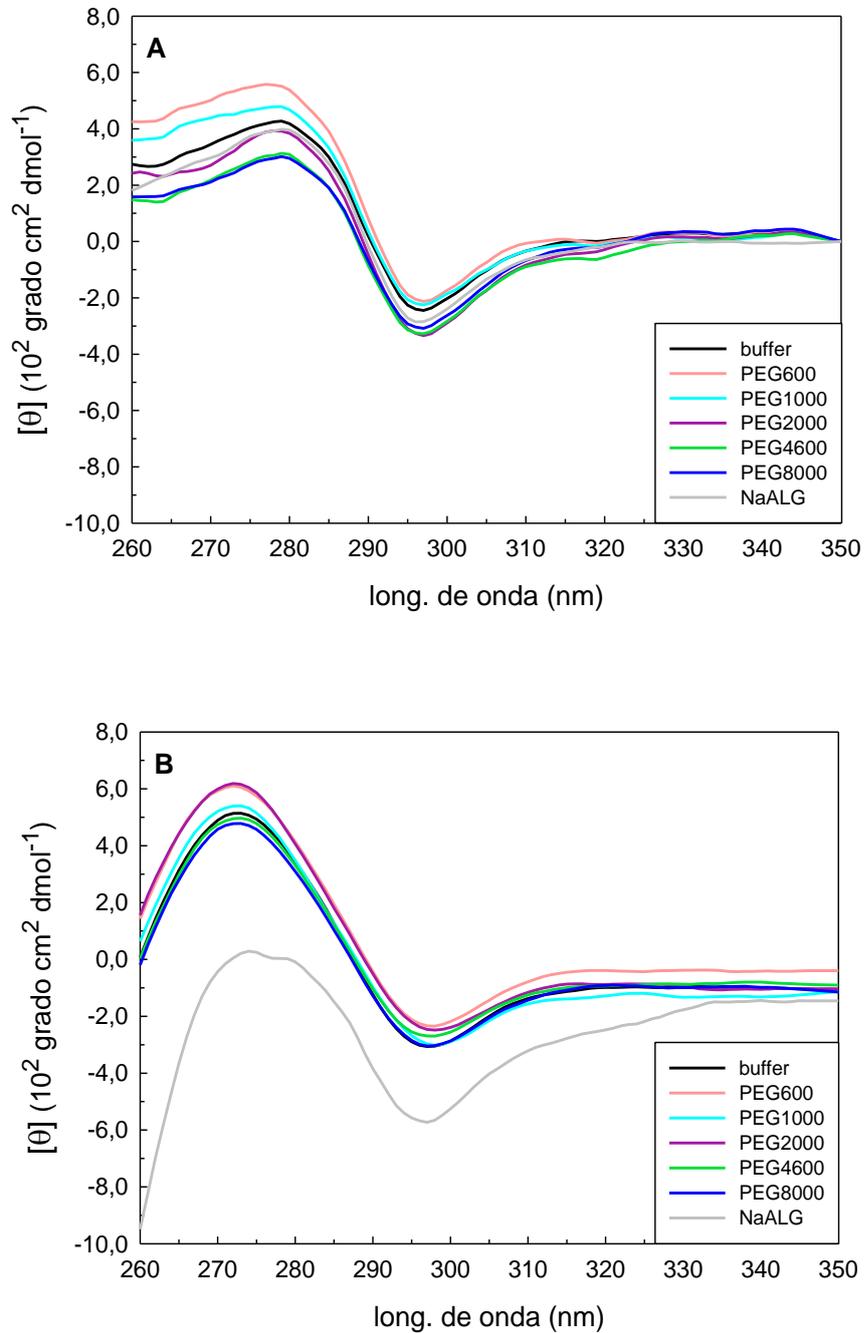


Figura 4.10: Efecto de la presencia de PEG 10 %P/P y NaALG 0,10 %P/P sobre los espectros de DC en el UV-cercano de (A) BR y (B) PAP 20 μ M en buffer Pi 50 mM pH 6,00. Temperatura: 20 °C.

4.2 Propiedades hidrodinámicas

4.2.1 Medidas de viscosidad

El NaALG es un polímero de cadena flexible que puede adquirir una alta densidad de carga negativa por protólisis de los grupos carboxílicos de los ácidos manurónicos y gulurónicos presentes en su estructura. Dada esta propiedad y la consecuente repulsión de cargas intra-cadenas, sus moléculas presentan en solución una conformación predominantemente extendida y parcialmente rígida (Vold y col., 2006). Las medidas de viscosidad en medio acuoso reflejaron esta condición, observándose un comportamiento característico que se conoce como “*efecto polielectrolito*” y que puede verse representado en la figura 4.11 A, en donde es notable una caída no lineal de la viscosidad reducida ($\eta_{\text{esp}}/C_{\text{NaALG}}$) con la concentración del polímero. La curvatura de la gráfica a bajas concentraciones del polímero sería producto de la adsorción de las moléculas de NaALG a las paredes del capilar y el consecuente cambio en la concentración efectiva del polímero (Zhong y col., 2010).

La disolución del NaALG en un medio salino de fuerza iónica moderada (NaCl 0,1 M) atenúa las fuerzas repulsivas por apantallamiento y permite al polímero adoptar conformaciones más plegadas, tipo ovillo estadístico, y aproximarse al cumplimiento de la ecuación de Mark-Houwink (ecuación 3.10). Los resultados del comportamiento viscoso del NaALG bajo esta condición se muestran en la figura 4.11 B. Pueden apreciarse dos modificaciones notorias respecto del gráfico anterior, por un lado una linealización y, por otro, una reversión de la tendencia, es decir un incremento de la viscosidad reducida con la concentración. Este perfil, típico de los polímeros de cadena flexible neutros, permitió determinar la viscosidad intrínseca ($[\eta]$) del polímero y la constante de Huggins (k_H) según lo descrito en el apartado 3.2.6 (ver recuadro interior de figura 4.11 B).

Es importante señalar que el valor obtenido de PM_{visc} , calculado con la ecuación 3.10, fue de 66862 y se halla dentro del rango de PMs esperable para nuestro polímero por ser de baja viscosidad (Fu y col., 2010). Los NaALG disponibles comercialmente, cuyos PMs van desde 2×10^5 hasta 1×10^6 , son clasificados de acuerdo a las viscosidades de sus soluciones (baja, media y alta), las que guardan una relación directa con el PM del polímero. En nuestro caso, hemos utilizado un NaALG de baja viscosidad, siendo razonable que su PM caiga en el extremo inferior del rango de PMs posibles para el polímero.

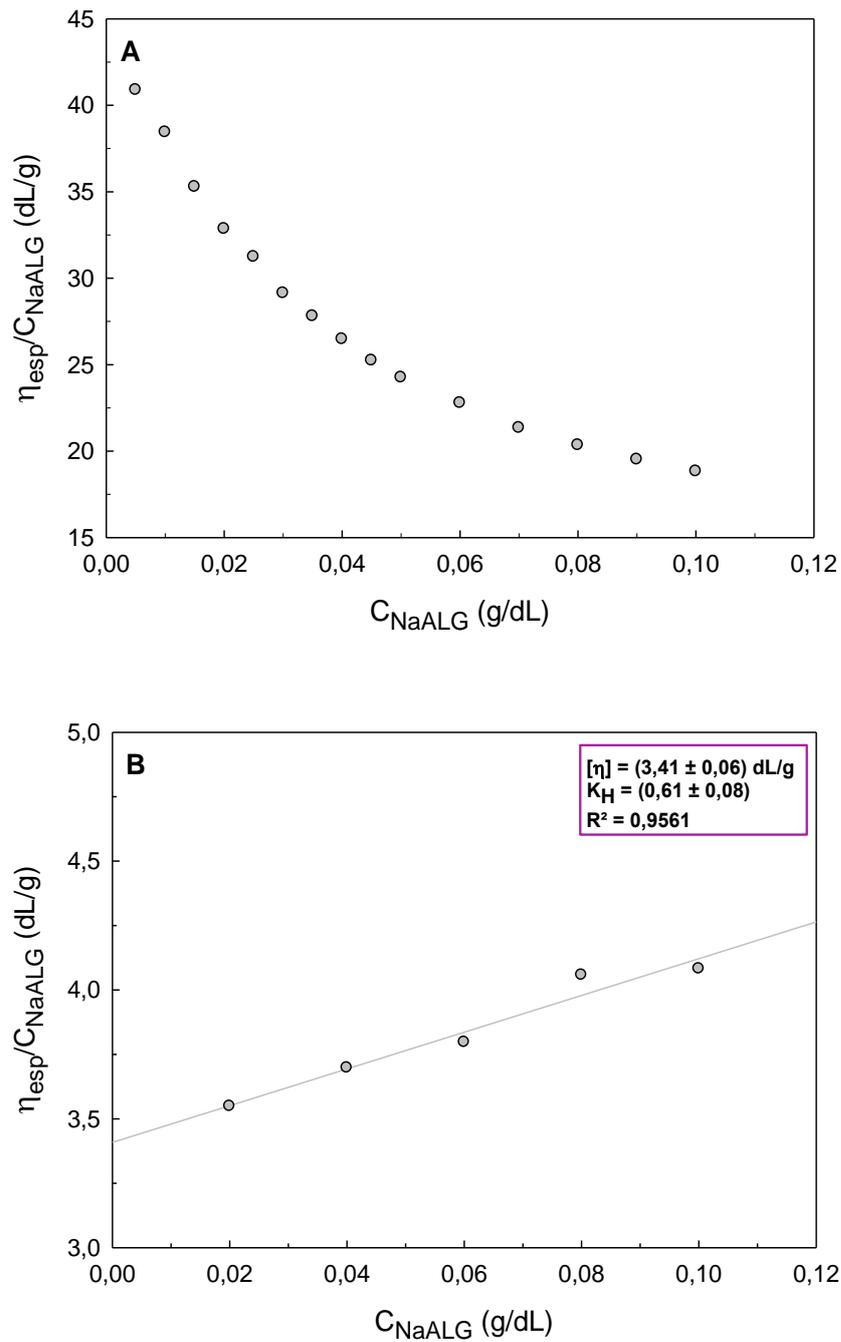


Figura 4.11: Comportamiento viscoso de NaALG disuelto en (A) agua y (B) NaCl 0,1 M. Temperatura: $(25,00 \pm 0,05) ^\circ\text{C}$.

Quando se estudió la viscosidad del NaALG en presencia de BR y PAP (0,15 mM) las medidas debieron llevarse a cabo en un medio *buffer* NaCit 50 mM pH 5,20 ya que en presencia de NaCl se observaba la formación de precipitado que impedía las medidas.

La figura 4.12 permite apreciar que tanto en ausencia como en presencia de las proteasas, la viscosidad reducida del NaALG se modificó linealmente con su concentración, permitiendo obtener los parámetros que se resumen en la tabla 4.3. Para el NaALG en ausencia de proteínas se observó un decaimiento lineal de $\eta_{\text{esp}}/C_{\text{NaALG}}$ con la concentración del polímero y se obtuvo un valor de $[\eta]$ de 6,06 dL/g, sensiblemente superior al obtenido para el polímero en medio NaCl (3,41 dL/g). Esto sugiere que en este medio el polímero adopta una conformación más extendida y rígida que la de un ovillo estadístico. En presencia de BR y PAP, pudo observarse una disminución del valor de $[\eta]$, compatible con un mayor plegamiento del polímero o disminución de su rigidez. Considerando que estas enzimas tienen pIs próximos a 9,00 y que están cargadas positivamente al pH de trabajo (5,20), puede pensarse que el cambio en el perfil de viscosidad es consecuencia de una interacción entre las proteasas y el polímero que involucraría la neutralización de las cargas del mismo, una disminución de las fuerzas repulsivas intra-cadena y una mayor tendencia de éste a adquirir configuraciones más plegadas. Debe notarse que el mayor efecto fue ocasionado por PAP, en cuya presencia además de la reducción del valor de $[\eta]$ pudo apreciarse una reversión en el signo de la k_H .

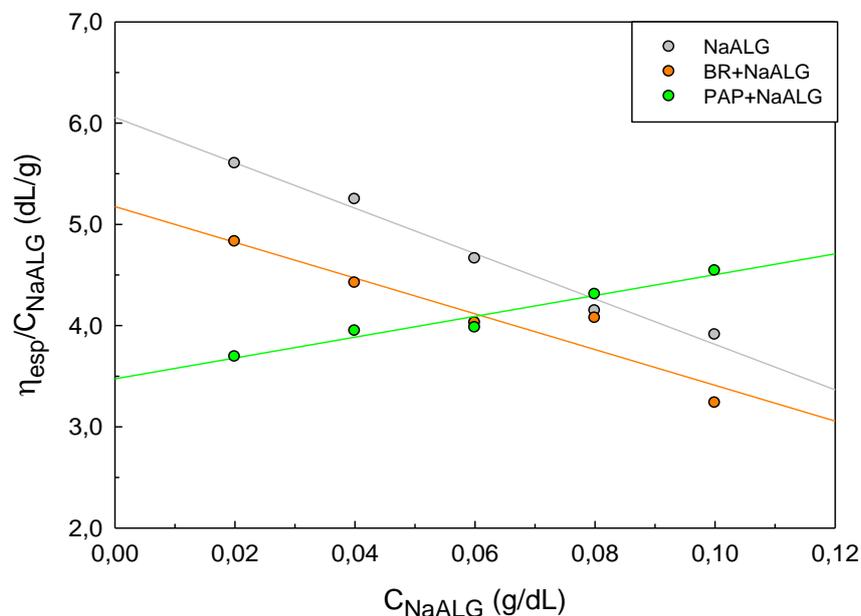


Figura 4.12: Comportamiento viscoso de soluciones de NaALG en buffer NaCit 50 mM pH 5,20 en ausencia y presencia de las proteasas (0,15 mM). Temperatura: (25,00 °C ± 0,05) °C.

Tabla 4.3: Modificaciones en los parámetros de viscosidad del NaALG por la presencia de BR y PAP.

Sistema ^(*)	K_H	$[\eta]$ (dL/g)	R^2 ^(**)
NaALG	$-0,61 \pm 0,05$	$6,06 \pm 0,13$	0,9840
BR + NaALG	$-0,66 \pm 0,15$	$5,18 \pm 0,27$	0,9007
PAP + NaALG	$0,85 \pm 0,12$	$3,47 \pm 0,10$	0,9592

^(*) preparado en buffer NaCit 50 mM pH 5,20.

^(**) coeficiente de determinación.

4.2.2 Dispersión dinámica de la luz

Los estudios de dispersión dinámica de la luz (DLS) nos permitieron analizar la formación de los complejos enzima-polímero en base a cambios en los valores de radio hidrodinámico (R_h) determinados para las partículas en solución. Estos datos complementaron a los obtenidos por medidas de viscosidad, aportando información adicional sobre la posible formación de complejos BR-NaALG y PAP-NaALG. Es importante destacar que para llevar a cabo estas medidas se trabajó con soluciones de enzima y polímero lo suficientemente diluidas y debidamente filtradas, a fin de asegurar sistemas transparentes, aptos para estas determinaciones.

En la figura 4.13 puede observarse el análisis de DLS correspondiente a la soluciones del polímero en ausencia y presencia de las proteasas. La imagen insertada en el margen superior derecho muestra la dependencia de la función correlación con el tiempo de retardo para los distintos sistemas. Pueden apreciarse valores de ordenadas al origen superiores a 0,9 en todos los casos lo que indica una relación señal/ruido óptima para la determinación. El punto en que la función de correlación empieza a caer proporciona información del diámetro promedio y el ángulo de caída permite determinar el índice de polidispersidad (IP) de las muestras. En estos casos se observaron valores de IP próximos a 0,4, indicativos de una dispersión de tamaños moderada.

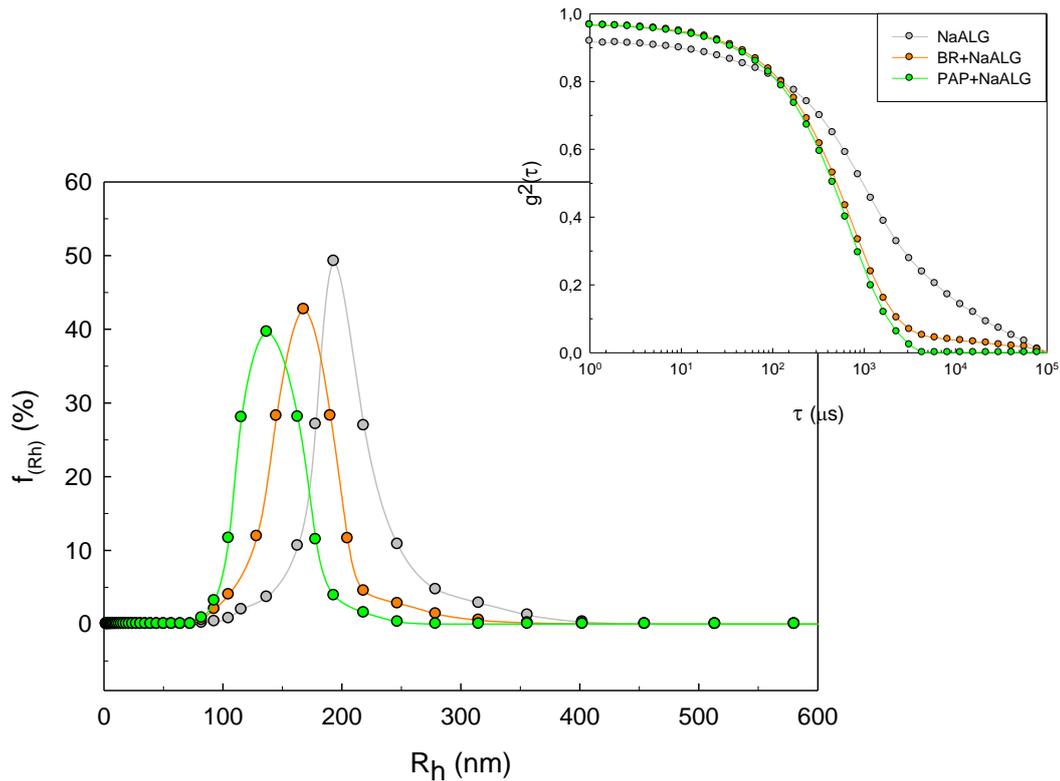


Figura 4.13: Distribución de tamaños en intensidad de luz dispersada ($f_{(R_h)}$) para NaALG 0,10 %P/P en ausencia y presencia de BR 50 μ M y PAP 5 μ M. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)$ °C.

La tabla (4.4) resume los resultados obtenidos en las condiciones mencionadas y, adicionalmente, aquellos obtenidos para las proteasas en solución en ausencia del polímero.

Tabla 4.4: Valores de radio hidrodinámico obtenidos por DLS.

Sistema ^(*)	R_h (nm)
BR	$4,13 \pm 0,90$
PAP	$3,49 \pm 0,78$
NaALG	$193,48 \pm 26,18$
BR-NaALG	$168,04 \pm 22,17$
PAP-NaALG	$137,20 \pm 30,71$

^(*) preparado en buffer NaCit 50 mM pH 5,20.

Debe señalarse que los R_h obtenidos para BR y PAP, 4,13 y 3,49 nm respectivamente, se encuentran dentro de los valores bibliografiados para estas

proteasas o proteínas globulares de PMs comparables (Ghosh, 2005). Para el caso del NaALG el valor de R_h obtenido fue de 193,48 nm. Los valores reportados para este polímero están en el orden de 138-600 nm dependiendo de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, etc.) y de su PM (Vold y col., 2006; Yang y col., 2009). Puede apreciarse que en presencia de BR y PAP los R_h resultaron ser menores al valor encontrado para el polímero solo. Esto sugiere una posible interacción de las enzimas con el polímero, a consecuencia de la cual, éste adoptaría estructuras menos extendidas y más compactas. Este efecto, más acentuado para PAP que para BR, está en concordancia con lo observado por medidas de viscosidad.

4.3 Técnicas calorimétricas

4.3.1 Calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica ampliamente usada en distintas áreas de investigación que permite obtener información de los parámetros de la interacción entre dos moléculas por medidas del calor producido o consumido, a presión constante, cuando se mezclan cantidades precisas de ambos reactivos. En este caso el empleo de esta técnica nos permitió un abordaje más preciso sobre las interacciones proteína-ligando, el cual puede analizarse en los siguientes gráficos.

En la figura 4.14 A y B se muestran las isotermas de titulación a 25 °C de NaALG (celda) con BR y PAP (inyector), respectivamente, en medio *buffer* NaCit 50 mM pH 5,20. Puede observarse que ambos sistemas presentaron un comportamiento semejante, con un perfil de saturación que muestra valores iniciales de ΔH negativos que reducen su magnitud conforme se adicionan las proteínas, llegando a alcanzar valores positivos para mayores proporciones proteína/alginateo.

Estos resultados descartan la existencia de sitios equivalentes e independientes, y suponen el cumplimiento de modelos de interacción proteína-polímero más complejos, cuya evaluación excede a los objetivos planteados. En este contexto, los datos experimentales de ambos sistemas fueron ajustados considerando la unión secuencial del NaALG a las proteínas en dos etapas. Las constantes de afinidad macroscópicas de cada una de ellas (K_1 y K_2), los cambios de entalpía (ΔH_1° y ΔH_2°) y los cambios de entropía (ΔS_1° y ΔS_2°) asociados a la unión, obtenidos en el ajuste, se resumen en la tabla 4.5.

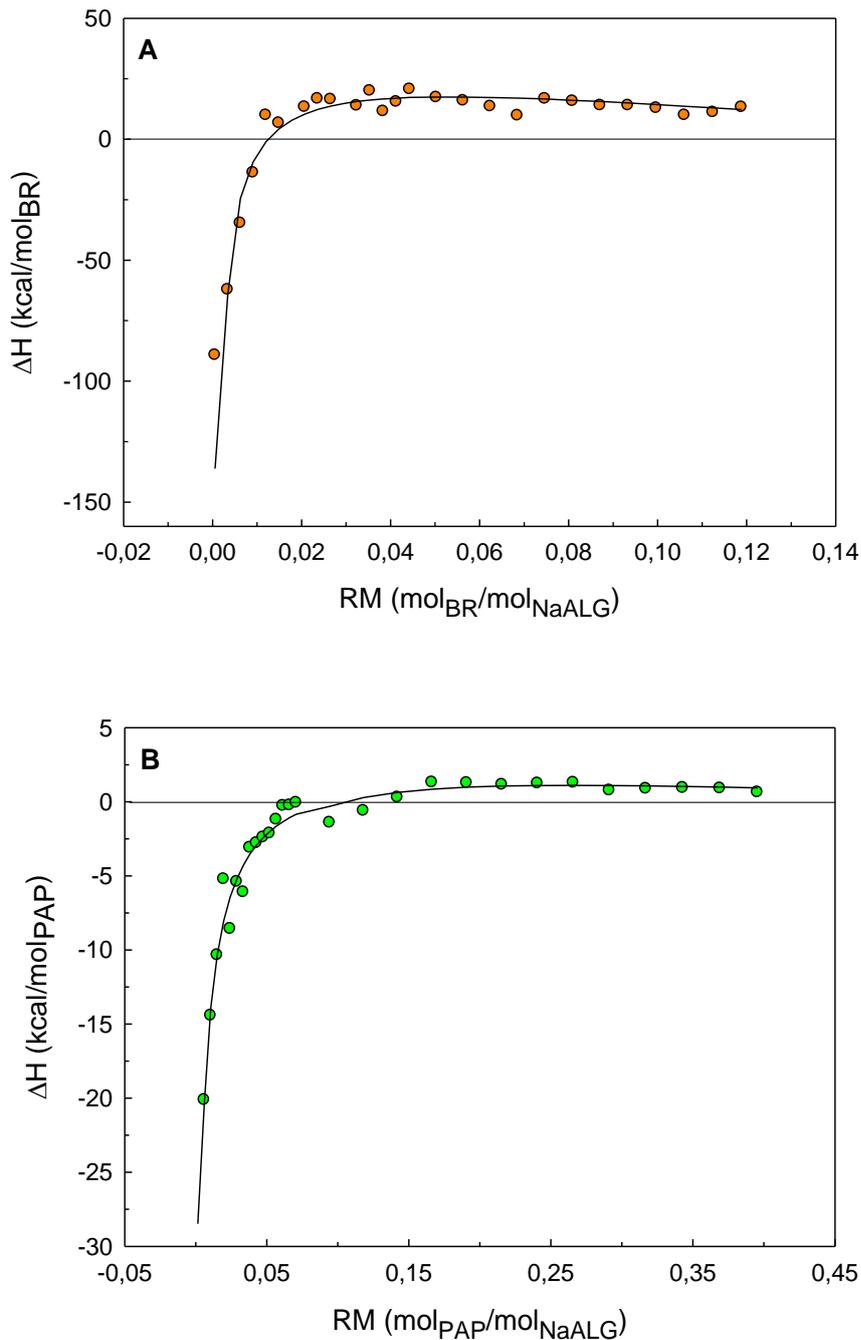


Figura 4.14: Titulación isotérmica de NaALG 0,5 %P/P con (A) BR 0,075 mM y (B) PAP 0,2 mM en buffer NaCit 50 mM pH 5,20. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)$ °C.

Analizando los resultados de la tabla, vemos que la constante de afinidad correspondiente a la primera etapa, K_1 , adopta valores moderados de alrededor de 10^3 - 10^4 M⁻¹ en ambos casos (BR y PAP) para luego aumentar drásticamente en la unión del segundo mol de enzima ($K_2 \gg \gg K_1$). Este resultado evidencia un efecto de cooperatividad positiva de la interacción entre las proteasas y el NaALG.

Por su parte, el análisis de los parámetros termodinámicos de interacción para la formación de ambos complejos indica que la unión de la primera molécula de enzima al NaALG se produce con liberación de calor al medio ($\Delta H_1^\circ < 0$) y disminución del desorden del sistema ($\Delta S_1^\circ < 0$). Esto permite afirmar que esta etapa, conducida entálpicamente, involucra la presencia de fuerzas electrostáticas en la interacción. Por el contrario, en la fijación del segundo mol de proteína, se observó un comportamiento opuesto: $\Delta H_2^\circ > 0$, $\Delta S_2^\circ > 0$ (entrópicamente conducido) sugiriendo una interacción de tipo hidrofóbico (Ghosh, 2005). Esta secuencia de etapas entálpica y entrópicamente conducidas nos permite postular un mecanismo de interacción por el cual los grupos carboxilos del NaALG cargados negativamente al pH de trabajo estarían interaccionando con las cargas opuestas presentes en las moléculas de BR y PAP (grupos protonados de lisinas e histidinas) en el primer paso de la interacción. Como consecuencia de esto, se expondrían porciones hidrofóbicas de las moléculas de NaALG que facilitaría, en un segundo paso, su interacción con los bolsillos hidrofóbicos presentes en las estructuras de las proteínas.

Tabla 4.5: Constantes de afinidad y funciones termodinámicas asociadas a la interacción de BR y PAP con NaALG en buffer NaCit 50mM pH 5,20.

	Parámetros	Sistema	
		BR-NaALG	PAP-NaALG
Etapa 1	$K_1 (M^{-1})$	$4,98 \times 10^3 \pm 1,10 \times 10^3$	$1,27 \times 10^4 \pm 7,00 \times 10^3$
	$\Delta H_1^\circ (cal/mol)$	$-5,32 \times 10^5 \pm 9,12 \times 10^4$	$-5,88 \times 10^4 \pm 1,73 \times 10^4$
	$\Delta S_1^\circ (cal/K mol)$	$-1,77 \times 10^3 \pm 2,32 \times 10^2$	-178 ± 17
	$\Delta G_1^\circ (cal/mol)$	-4274,5	-5729,3
Etapa 2	$K_2 (M^{-1})$	$4,68 \times 10^5 \pm 1,30 \times 10^4$	$1,23 \times 10^6 \pm 3,70 \times 10^5$
	$\Delta H_2^\circ (cal/mol)$	$6,72 \times 10^5 \pm 9,40 \times 10^4$	$8,18 \times 10^4 \pm 1,70 \times 10^4$
	$\Delta S_2^\circ (cal/K mol)$	$2,28 \times 10^3 \pm 2,23 \times 10^2$	302 ± 25
	$\Delta G_2^\circ (cal/mol)$	-7782,0	-8241,3

Es importante destacar que no pudo determinarse la estequiometría de los complejos BR-NaALG y PAP-NaALG debido a problemáticas experimentales vinculados a la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, la figura 4.14 indica que las

curvas alcanzan un valor de saturación (n_{enzima}/n_{NaALG}) fraccionario, lo cual estaría indicando que por cada molécula de enzima se unirían varias moléculas de NaALG. Esto coincide con el comportamiento ya reportado para otro tipo de interacciones proteína-polisacárido (Zhao y col., 2009).

4.4 Conclusiones parciales

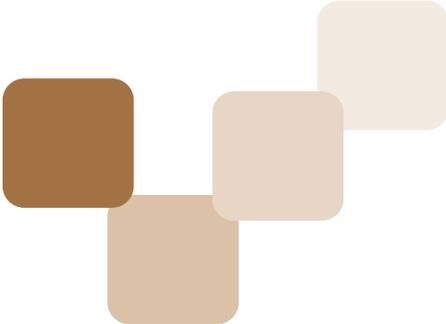
Un análisis integrador de los resultados obtenidos permite sacar las siguientes conclusiones y dar respuesta a los diferentes interrogantes planteados al inicio de este capítulo.

De acuerdo a las pruebas espectroscópicas y a los efectos que producen sobre la estructura de las fitoproteasas es posible separar a los polímeros ensayados en dos grupos principales: uno conformado por los polietilenglicoles de mayor peso molecular (PEG2000, PEG4600 y PEG8000) y otro constituido por aquellos más pequeños (PEG600 y PEG1000) y el alginato de sodio. En relación a los primeros, las perturbaciones observadas permiten pensar que éstos se excluyen preferencialmente de la superficie proteica por un mecanismo de tipo estérico ya reportado para otros sistemas proteína+PEG. Asimismo el carácter hidrofóbico de los polímeros de mayor longitud de cadena se traduce en la disminución de la polaridad del entorno de los restos aminoácidos responsables de la señal espectroscópica en cada caso. Este grupo de polímeros no provoca pérdidas significativas en el contenido de estructura secundaria de bromelina y papaína bajo las condiciones de concentración, temperatura y pH del medio evaluadas.

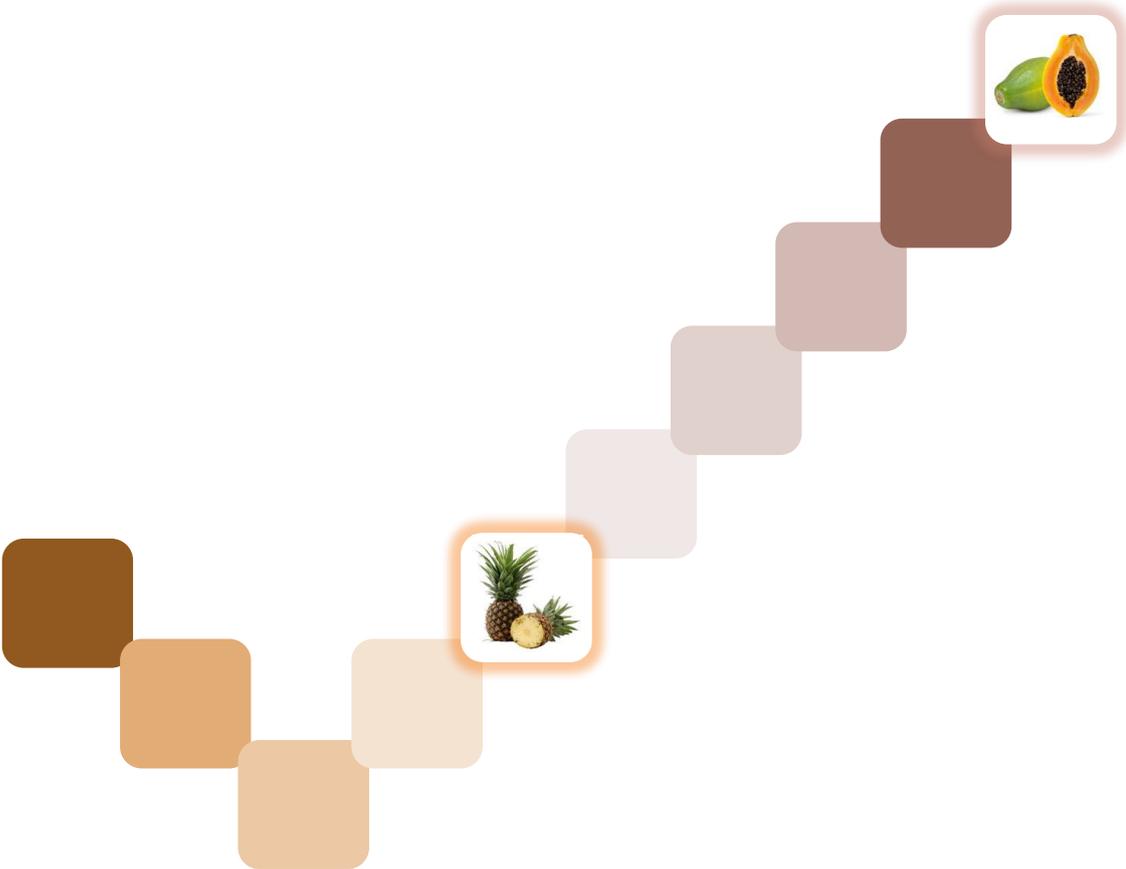
Por su parte, los PEGs más pequeños y el NaALG ocasionan modificaciones que sugieren su unión preferencial a las fitoproteasas. En el caso del PEG, este comportamiento, opuesto al indicado precedentemente, sería consecuencia de su menor tamaño, mayor carácter polar y capacidad de interactuar con la proteína mediante puentes hidrógenos e interacciones dipolo-dipolo. Para el NaALG, por tratarse de un polímero cargado eléctricamente, resulta probable que la unión preferencial proteína-polímero incluya fuerzas intermoleculares fuertes de tipo coulombico. La magnitud de las perturbaciones (cambios en K_{sv} , intensidad de la señal fluorescente, medidas de absorbancia, etc.) ocasionadas por los PEGs más livianos y por el NaALG fueron más marcadas para este último, aun trabajando a concentraciones de NaALG (0,0015-0,20 %P/P) 50-7000 veces inferiores a las de PEG (10 %P/P). Esto sugirió la existencia de

interacciones fuertes y específicas entre este polímero y ambas proteínas ensayadas. Las medidas calorimétricas aplicadas a los sistemas fitoproteasas+NaALG demostraron efectivamente una interacción de tipo cooperativa entre ambas biomoléculas, descrita por un proceso de dos etapas. La primera, entálpicamente conducida, involucra la presencia de fuerzas electrostáticas y la segunda, entrópicamente conducida, supone la presencia de interacciones de tipo hidrofóbico. Asimismo las medidas de las propiedades hidrodinámicas sugirieron que a consecuencia de estas interacciones se produce una pérdida de rigidez y mayor grado de compactación de la molécula de NaALG, producto de la neutralización de cargas del polímero por la unión a las proteínas.

Finalmente, al comparar el comportamiento de BR y PAP (proteínas con homología estructural y similitud de propiedades fisicoquímicas) no se observaron mayores diferencias entre ellas frente a todos los PEGs (de menor y mayor PM). En cambio, sí pudieron apreciarse perturbaciones y, presumiblemente, interacciones más significativas frente al NaALG para la PAP, siendo previsible que estas diferencias se reflejen luego en la eficiencia de sus estrategias separativas.



5. RESULTADOS



5. REPARTO DE LAS FITOPROTEASAS EN SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS POLIETILENGLICOL/CITRATO

❖ Ideas previas. Interrogantes

El estudio del reparto de biomoléculas en sistemas bifásicos acuosos puede llevarse a cabo siguiendo un enfoque exclusivamente “separativo o aplicado” en el que se trabaja con el material crudo que contiene la molécula de interés, se ensayan diversos factores que afectan significativamente el reparto y se optimizan los indicadores de desempeño del proceso extractivo. Otro enfoque, más amplio o abarcador, incluye una etapa previa de estudio del comportamiento de reparto de la molécula de interés pura (o con elevado grado de pureza) con la idea de preseleccionar los sistemas con mayor capacidad extractiva y luego en la siguiente etapa, con dichos sistemas y utilizando el material crudo (conteniendo la molécula de interés), optimizar las restantes variables del proceso. Este último enfoque fue el adoptado en nuestro trabajo ya que permite avanzar en el conocimiento del mecanismo que determina la distribución de una biomolécula entre dos fases acuosas y de la naturaleza de las fuerzas intermoleculares involucradas en el proceso de reparto.

En este marco, los principales interrogantes que se plantearon son:

¿Qué perfil de distribución tienen bromelina y papaína en sistemas bifásicos formados por citrato de sodio y polietilenglicoles de diferentes tamaños? ¿Siguen los mismos patrones ya observados para otras proteínas? ¿Hay diferencias entre ambas fitoproteasas? Desde el punto de vista termodinámico, ¿qué fuerzas gobiernan el reparto? ¿Es posible proponer algún mecanismo molecular para el mismo? ¿Pueden utilizarse estos sistemas en la recuperación eficiente de bromelina y papaína a partir de sus extractos crudos?

5.1 Evaluaciones previas al reparto

5.1.1 Efecto del tiempo de incubación proteína+polímero

En los procesos extractivos con sistemas bifásicos acuosos (SBAs) las moléculas de interés se hallan disueltas en medios poliméricos por al menos el lapso de tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de reparto. En virtud de lo visto en el Capítulo 4 sobre el efecto que ocasionan algunos de los polímeros ensayados sobre el comportamiento emisoro de BR y PAP, resulta importante evaluar si los mencionados efectos se mantendrán o acentuarán durante la incubación proteína+polímero (PEG) por diferentes intervalos de tiempo. Asimismo, y dado que la concentración de las enzimas en cada fase se determinará a partir de sus actividades enzimáticas (frente a sustratos específicos), será útil averiguar si dichas medidas se afectarán en los medios poliméricos luego del reparto.

En primer término, se analizaron los eventuales cambios en el tiempo de los espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de BR y PAP disueltas en medios regulados de pH (20 °C) en ausencia de polímeros (figura 5.1 A y B).

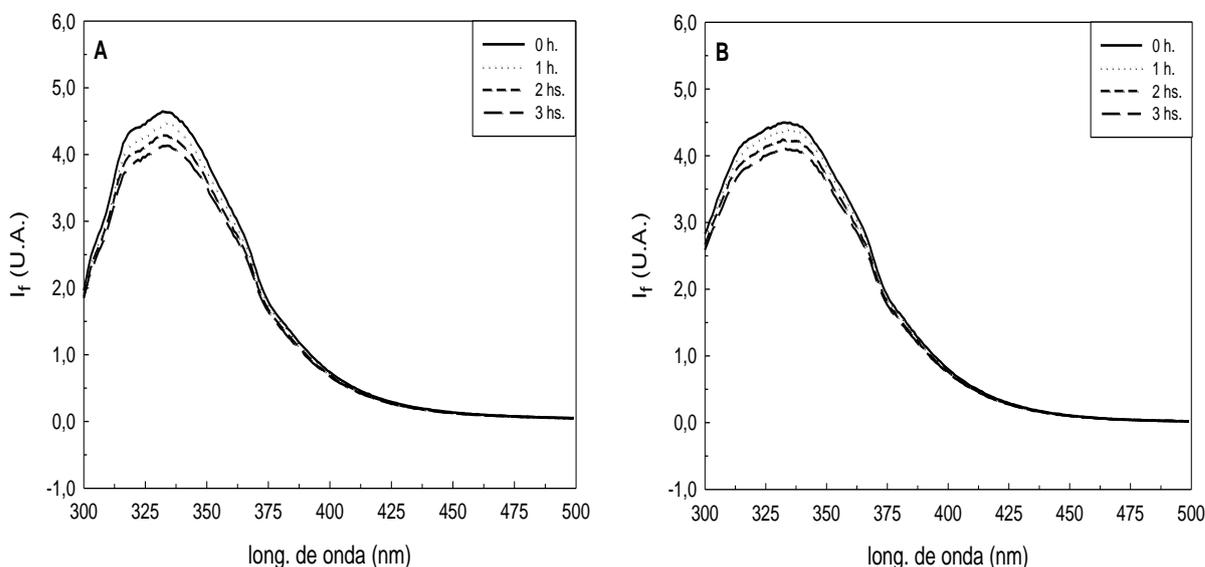


Figura 5.1: Efecto del tiempo de incubación sobre la fluorescencia nativa de (A) BR y (B) PAP 10 μM en buffer Pi 50 mM pH 6,00. $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$. Temperatura: 20 °C.

Ambas enzimas presentaron comportamientos similares. Puede apreciarse una leve y progresiva disminución en la I_f conforme se incrementa el tiempo de incubación desde 0 a 3 horas. Esto podría deberse a reacomodamientos conformacionales sufridos por las proteasas y el establecimiento de nuevos puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas entre restos aminoacídicos y su entorno polar o eventualmente a procesos de autodigestión, muy comunes en las proteasas.

Para analizar el efecto de la presencia de polímeros por diferentes lapsos de tiempo sobre los espectros de emisión, se seleccionaron sólo el PEG600 y el PEG8000 como representativos de los PEGs de menor y mayor tamaño, respectivamente. En ninguno de los casos estudiados se observaron modificaciones en la posición de los picos emisivos con el tiempo, pero sí en sus alturas. En la figura 5.2 se encuentran representados los valores de fluorescencia relativa porcentual ($I_{f,R}$ (%)) de dicho pico ($\lambda_{em} = 334$ nm), tomando como valor de referencia (100%) a aquel correspondiente a la emisión de la proteína a tiempo 0 y en ausencia de polímero.

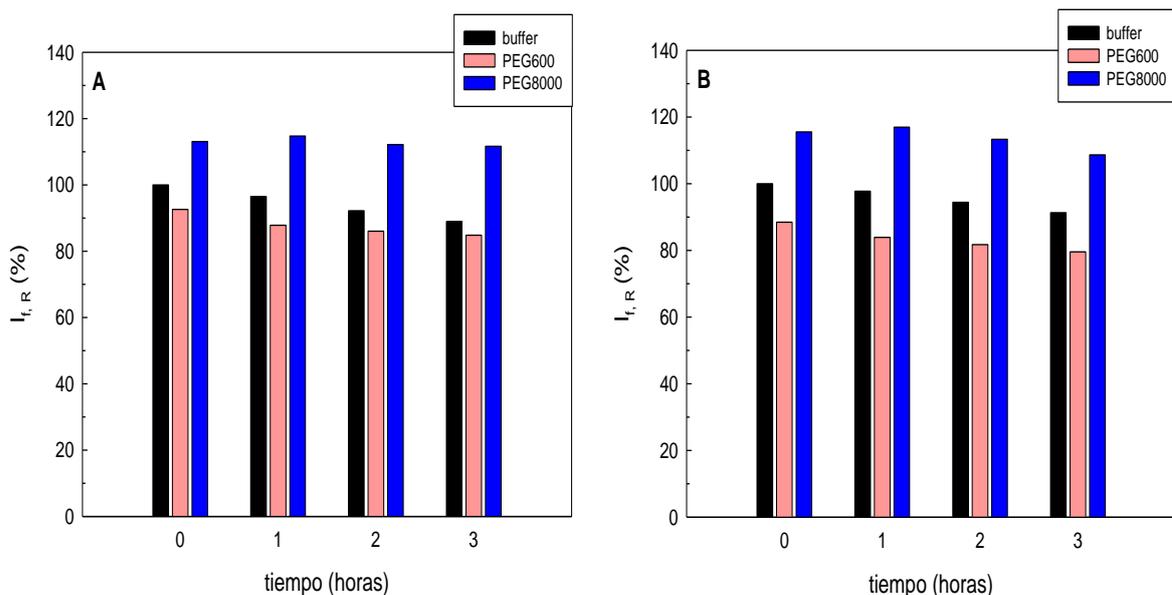


Figura 5.2: Efecto de la presencia de PEGs 10 %P/P sobre la fluorescencia nativa de (A) BR y (B) PAP 10 μ M en función del tiempo de incubación.

Buffer Pi 50 mM pH 6,00.

$\lambda_{exc} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 334$ nm. Temperatura: 20 °C.

Puede apreciarse claramente que el efecto que ejerce cualquiera de los polímeros ensayados prácticamente se mantiene en el tiempo, observándose una leve disminución de la señal a medida que aumenta el tiempo de incubación, efecto similar al obtenido en ausencia del polímero. Estas observaciones resultan de mucho valor si se

considera que en los procesos de purificación que se pretende desarrollar, los polímeros estarán en contacto con las enzimas durante períodos de tiempo comparables a los analizados.

El efecto del tiempo de incubación en ausencia y presencia de los polímeros sobre la actividad de las proteasas a 20 °C puede analizarse en la figura 5.3. Se consideró como 100% de actividad a aquella determinada a tiempo 0, a 20 °C en ausencia de polímero.

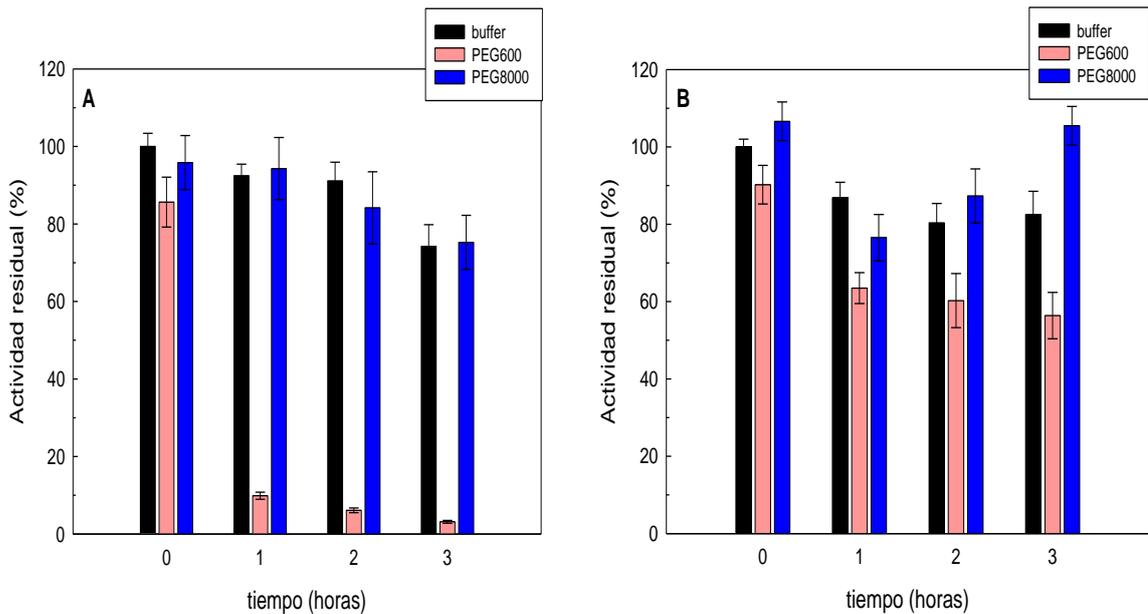


Figura 5.3: Efecto de la presencia de PEGs 10 %P/P sobre la actividad de (A) BR y (B) PAP 10 μ M en función del tiempo de incubación. Buffer Pi 50 mM pH 6,00. Temperatura: 20 °C.

En ausencia de polímeros (barras negras), puede observarse que ambas proteasas sufrieron una caída leve y gradual de la actividad, manteniendo luego de 3 horas de incubación alrededor del 80% de la actividad inicial. Estos resultados, en consonancia con los obtenidos precedentemente en el análisis de fluorescencia, sugieren nuevamente procesos de autodigestión o reacomodamientos conformacionales que afectarían al sitio activo de las proteasas.

Al analizar cómo es modificada la actividad en presencia de PEGs, vemos que en aquel sistema formado por PEG600 la actividad de las proteasas se vio disminuida significativamente al cabo de 3 horas de incubación. Este resultado también fue observado para PEG1000 (datos no mostrados). Cabe resaltar que para BR, la caída de actividad fue drástica a partir de la primera hora de incubación en adelante,

reduciéndose la actividad al 10% del valor inicial, mientras que para PAP la reducción alcanzó el 35%. Estos resultados deberán tenerse presente al momento de seleccionar los sistemas extractivos ya que sugieren que la interacción entre estos PEGs y las fitoproteasas (principalmente BR) afecta directa o indirectamente la reacción de catálisis. Además, para el cálculo del coeficiente de reparto deberán introducirse apropiados factores de corrección que los contemplen.

Cuando se trabajó en presencia de PEG8000, ambas proteasas retuvieron entre el 60-80% de actividad, siendo siempre más afectada BR que PAP. La BR retuvo mayoritariamente su funcionalidad (75%) y la PAP la conservó en su totalidad e inclusive logró incrementarla ligeramente luego de 3 horas de incubación. Esta menor afectación de la funcionalidad proteica, observada en presencia de los PEGs de mayor tamaño es coherente con un mecanismo de exclusión estérica (inespecífica) de estos polímeros y consecuente estabilización, previsto por la teoría de Timasheff, ya postulado en el capítulo precedente (Lee y Lee, 1981).

5.1.2 Efecto de temperatura de incubación proteína+polímero

En virtud de las aplicaciones industriales de estas fitoproteasas, será útil averiguar si la incubación con los polímeros de fase afecta su estabilidad térmica.

En la figura 5.4 A y B se representa el efecto de la temperatura sobre los espectros de emisión de fluorescencia de BR y PAP, respectivamente, en ausencia de polímeros. Puede verse que la BR no presentó cambios significativos en su fluorescencia nativa luego de incubaciones de 2 horas a 20 y 30 °C. A mayores temperaturas (40 y 50 °C), se observó una notoria extinción de la fluorescencia, probablemente debido a cambios conformacionales que exponen los residuos fluorescentes al medio solvente más polar. A 60 °C, por encima de la temperatura de desnaturalización (T_m) de la proteína ($T_{mBR} = 56$ °C), el espectro de emisión se modificó drásticamente evidenciando la pérdida de la estructura proteica debido al proceso de desnaturalización.

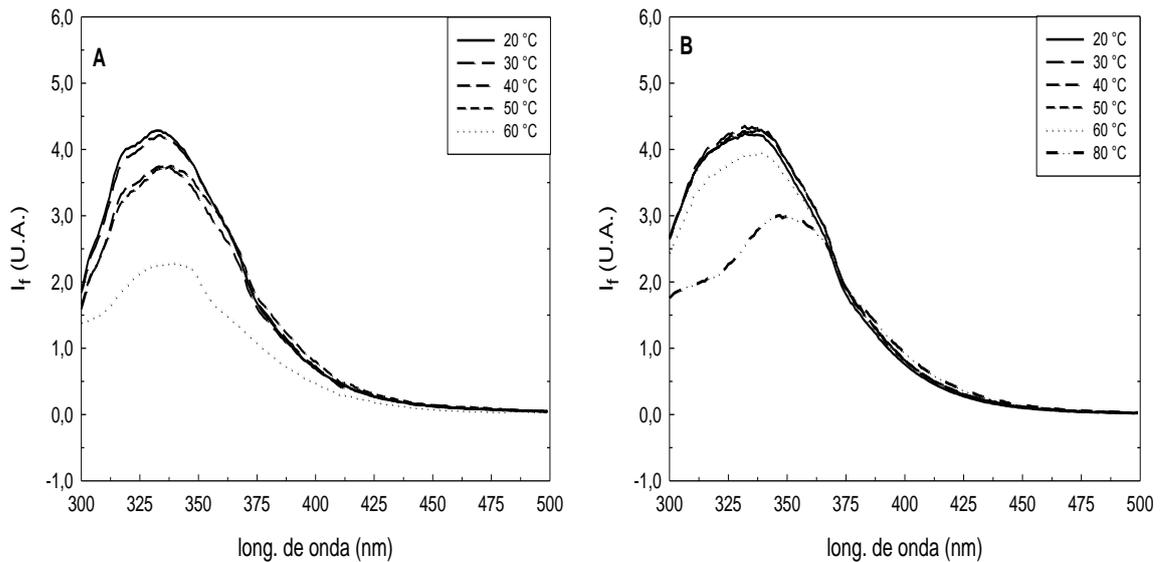


Figura 5.4: Efecto de la temperatura sobre la fluorescencia nativa de (A) BR y (B) PAP 10 μ M luego de 2 horas de incubación en buffer Pi 50 mM pH 6,00. $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Por su parte cuando se analizaron los espectros obtenidos para PAP en *buffer* (figura 5.4 B) no se observaron perturbaciones en los espectros sino hasta 60 °C donde se produjo una leve disminución en la intensidad de fluorescencia para luego a 80 °C ($T_{mPAP} = 83$ °C) presentar un drástico cambio y corrimiento del pico hacia mayores longitudes de onda.

El efecto de la presencia del polímero sobre la fluorescencia de las proteínas frente a incrementos de temperatura se analizó en la figura 5.5. En presencia de PEG600 pudo apreciarse un comportamiento similar al observado en ausencia de polímero. Luego de la disminución inicial en la fluorescencia (incubación de 2 horas a 20 °C), se produjo una caída gradual de la señal con la temperatura en concordancia con la ocurrida en ausencia del polímero y adjudicable a pequeños reajustes estructurales en la enzima.

En presencia de PEG8000, se observó la exaltación de la fluorescencia para ambas proteasas, efecto ya reportado previamente para este polímero, con valores de $I_{f,R}$ que se mantuvieron constantes incluso a altas temperaturas de trabajo. Cerca de las respectivas T_m de cada enzima, se observaron leves disminuciones en los valores de $I_{f,R}$, menos notorias que aquellas obtenidas en ausencia del polímero. Esta leve variabilidad de los valores de $I_{f,R}$ a temperaturas cercanas a las T_m , podría indicar un efecto estabilizador o protector de este polímero sobre la estructura proteica (Lee y Lee, 1981).

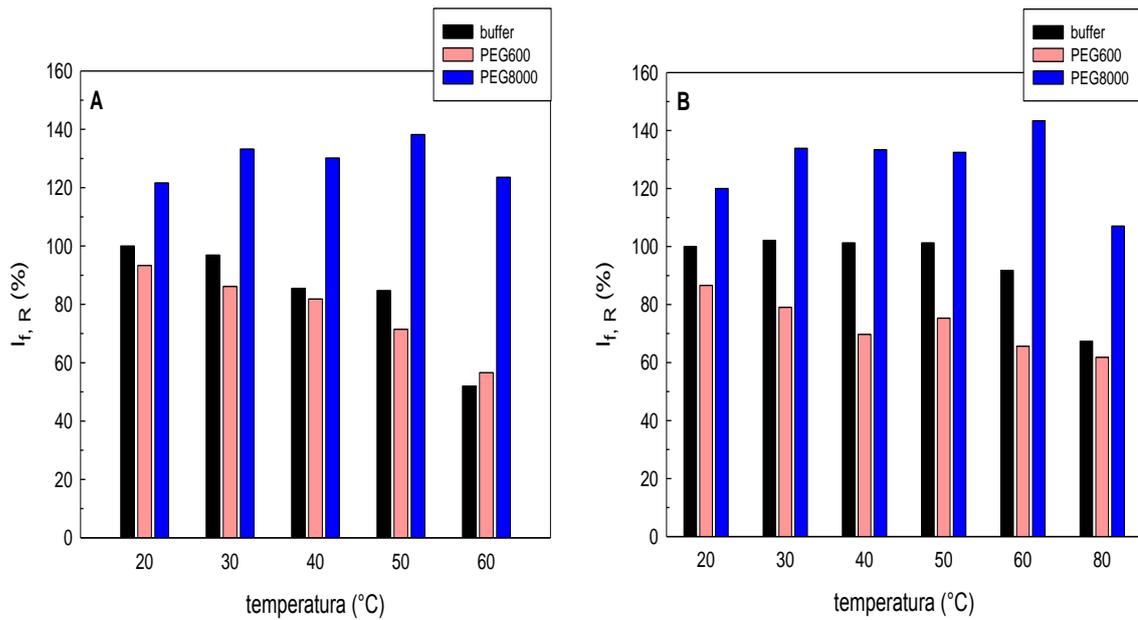


Figura 5.5: Efecto de la presencia de PEGs 10 %P/P frente a incrementos de la temperatura sobre la fluorescencia nativa de (A) BR y (B) PAP 10 μ M luego de 2 horas de incubación. Buffer Pi 50 mM pH 6,00. $\lambda_{exc} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 334$ nm.

El análisis de la estabilidad térmica de las proteasas por medidas de actividad se representa en la figura 5.6 A y B. En ella se muestran los valores de actividad enzimática residual de BR y PAP, respectivamente, luego de dos horas de incubación con PEG600 y PEG8000, tomando como 100% la actividad determinada en ausencia de polímeros a 20 °C.

Cuando analizamos los perfiles catalíticos en ausencia de polímero, observamos para BR una disminución significativa de la actividad a partir de los 40 °C, llegándose a valores del 20% de actividad residual por encima de la T_{mBR} . Para PAP también se observó una disminución de la actividad a medida que se aumentaba la temperatura de incubación, aunque el efecto observado fue más gradual que para BR, ya que en este caso la enzima retuvo una actividad residual del 70% incluso para la incubación a 80 °C. Esto indicaría una menor sensibilidad de PAP a cambios térmicos.

En presencia de PEG600, la actividad de BR y PAP se vio disminuida, observándose una caída drástica en el caso de BR incluso a 20°C, resultado que está en consistencia con lo observado en la incubación a través del tiempo. En PEG8000, para BR se observó una afectación menor de su actividad, cayendo bruscamente luego de la T_m . En este mismo polímero, la PAP mostró un patrón de comportamiento similar al observado en ausencia de polímero.

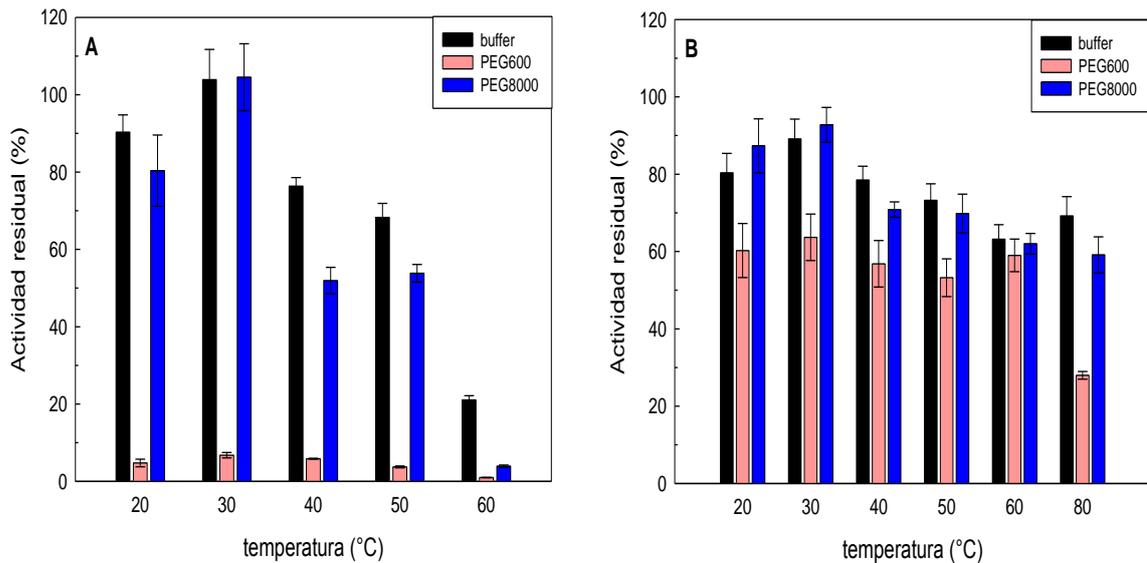


Figura 5.6: Efecto de la presencia de PEG 10 %P/P sobre la actividad de (A) BR y (B) PAP 10 μ M en función de la temperatura luego de 2 horas de incubación. Buffer Pi 50 mM pH 6,00.

Los resultados obtenidos muestran la inconveniencia de recuperar estas enzimas en fases conformadas por PEGs de bajo PM por los efectos de caída drástica de actividad que se da en su presencia luego de períodos prologados de incubación. Estas restricciones deberán tenerse presente al momento de fijar los criterios de optimización de los procesos extractivos.

5.2 Comportamiento de reparto de las fitoproteasas comerciales

5.2.1 Efecto del peso molecular del polietilenglicol y composición del sistema sobre el equilibrio de reparto

Se consideraron SBAs formados por PEGs de diferentes PMs y NaCit pH 5,20 (PEG/NaCit). El análisis del efecto de diferentes variables sobre el patrón de reparto de BR y PAP comercial fue realizado sobre sistemas cuya composición total inicial fue seleccionada a partir de diagramas binodiales obtenidos previamente en nuestro laboratorio. Para cada tipo de SBA se evaluaron dos composiciones totales correspondientes a distintas líneas de unión (LU) las cuales fueron numeradas 1 y 2, siendo 1 la más cercana al punto crítico (ver tabla 3.2).

La figura 5.7 muestra el perfil de reparto observado para BR y PAP en los sistemas indicados precedentemente. Puede observarse que a medida que aumenta el PM del PEG se evidencia una disminución en los valores del coeficiente de reparto (K_r)

para ambas enzimas, siendo BR la más afectada por esta variable. Este efecto podría atribuirse a una disminución del espacio disponible para las proteasas en la fase superior (FS) a medida que aumenta el tamaño del polímero como consecuencia del elevado volumen de exclusión del PCF. Particularmente, puede verse que BR sufre una disminución drástica (de hasta 5 veces) en los valores de K_r al variar el PM del PEG desde 600-1000 ($K_r \gg 1,00$) hasta 2000 ($K_r \ll 1,00$) cuando analizamos la LU2.

El cálculo del rendimiento de BR en la FS de los sistemas conteniendo PEG600 y PEG1000 indica que en cada caso el 76 y 63 % de la fitoproteasa se recupera en dicha fase. *A priori*, estos sistemas parecerían apropiados para emplearlos en los primeros pasos de un proceso de purificación, sin embargo, la drástica disminución de la actividad enzimática en presencia de estos PEGs (ver sección 5.1) limitaría el empleo de los mismos para la recuperación de esta enzima.

Los cambios observados en los valores de K_{rPAP} con el tamaño del PEG no resultaron tan significativos como los de BR. El equilibrio de reparto de PAP se encuentra desplazado hacia la fase inferior en todos los sistemas ensayados, con valores cercanos a 0,50.

Al analizar el efecto de la longitud de la línea de unión (LLU), se observa que los valores de K_r s de ambas proteasas disminuyen al aumentar la concentración de los componentes de fase (mayores LLU). Para PAP, estas modificaciones resultaron poco significativas, siendo conveniente trabajar con cualquiera de las LUs ensayadas. Para BR, en cambio, la disminución de K_r fue muy notoria. En este caso, y en base a los efectos que los PEGs más livianos ocasionan en la actividad de BR, las composiciones de la LU2 se presentan como las más adecuadas ya que con ellas, la proteína se desplaza a la fase salina, pobre en polímero. Es importante remarcar que los SBAs cuyas composiciones totales estén más alejadas de la curva binodial (LLU mayores) tendrán menos chances de convertirse en monofásicos ante cambios mínimos de temperatura o por dilución al cargar la muestra (Rito-Palomares y Cueto, 2000). Por este motivo, suelen ser los elegidos para procesos extractivos, siempre que las concentraciones de los componentes de fase no sean tan excesivas como para dificultar la manipulación de los sistemas.

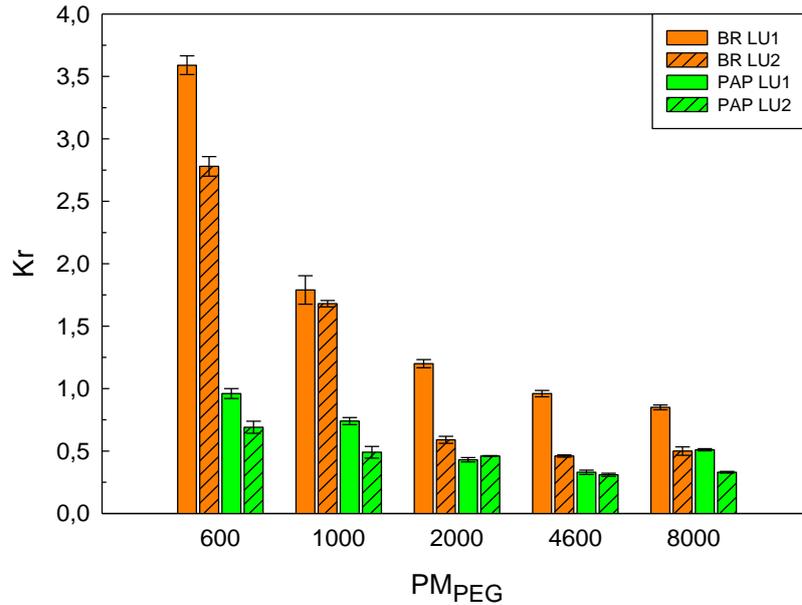


Figura 5.7: Efecto del PEG y de la composición del sistema sobre el perfil de reparto de BR y PAP comercial en SBAs PEG/NaCit pH 5,20, LU1 y LU2. Temperatura: 20 °C.

5.2.2 Comparación del perfil de reparto de bromelina y papaína

Al analizar el patrón de reparto de ambas fitoproteasas, puede inferirse como regla general una mayor tendencia de BR a repartirse hacia la FS en relación a PAP en el mismo SBA. Este comportamiento diferencial es más marcado en los sistemas formados por PEG600 y PEG1000.

Para comprender estas diferencias puede recurrirse a la siguiente expresión de tipo empírico en la que se contempla la contribución de diferentes factores al Kr de proteínas en SBAs (Berggren y col., 2002):

$$\log Kr = \log K_{\text{hidrof}} + \log K_{\text{elect}} + \log K_{\text{tamaño}} + \log K_{\text{af}} + \log K_{\text{SBAComp}} \quad (5.1)$$

En la misma, el valor de K_{SBAComp} representa la contribución de las propiedades inherentes al SBA como PM y concentración de los componentes de fase, K_{hidrof} , $K_{\text{tamaño}}$ y K_{elect} están vinculadas a las características de la molécula que se reparte, tales como hidrofobicidad superficial (HS), PM, conformación y carga eléctrica neta. Finalmente, K_{af} contempla la presencia de algún tipo de interacción específica entre la proteína y los componentes de fase. Al comparar las contribuciones a Kr para el reparto de BR y PAP en un dado SBA, surge que las diferencias deben provenir mayoritariamente de K_{af} y/o K_{hidrof} ya que K_{SBAComp} es el mismo (para un dado SBA) y los valores de $K_{\text{tamaño}}$ y K_{elect}

deben ser similares para BR y PAP por tratarse de proteínas con pesos moleculares semejantes (BR 28000 Da y PAP 26000 Da) y puntos isoeléctricos cercanos ($pI_{BR} = 9,55$ y $pI_{PAP} = 8,75$) (Albee y col., 1997). El cálculo de la HS relativa para cada proteína según lo explicado en la sección 3.2.3 de Materiales y Métodos, arrojó valores de $-0,0318$ y $-0,0363$ para BR y PAP, respectivamente. Esto indica un carácter hidrofílico ligeramente inferior (o carácter hidrofóbico ligeramente superior) para BR en relación a PAP y sugiere una mayor chance para BR de interactuar con los restos etilénicos no polares de la molécula de PEG. Esto justificaría la leve superioridad en los valores de Kr_{BR} respecto de Kr_{PAP} , observada en sistemas formados por PEGs de mayor tamaño, pero sería insuficiente para explicar las grandes diferencias obtenidas en los sistemas formados por PEGs más pequeños. En este caso resulta razonable pensar en la existencia de algún mecanismo de interacción adicional más específico entre PEG y BR, que se reflejaría en la contribución Kr .

5.2.3 Caracterización termodinámica del equilibrio de reparto

La naturaleza de las fuerzas intermoleculares involucradas en el reparto de una dada biomolécula puede aproximarse a través de la determinación de los parámetros termodinámicos asociados al equilibrio.

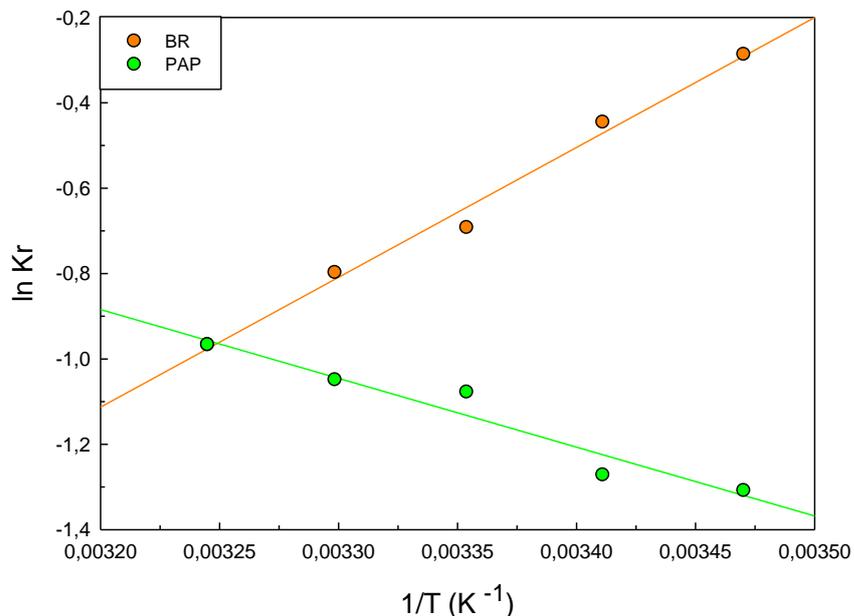


Figura 5.8: Efecto de la temperatura sobre el equilibrio de reparto (Kr) de BR y PAP en SBAs PEG8000/NaCit pH 5,20 LU2.

La figura 5.8 muestra los gráficos de $\ln K_r$ vs. la inversa de la temperatura (T) para BR y PAP en el intervalo 288,15-308,15 K (15-35 °C) en los SBAs PEG8000/NaCit LU2. El comportamiento lineal, observado también en el resto de los SBAs ensayados (datos no mostrados), indica que el cambio entálpico (ΔH°), obtenido a partir de la pendiente de dicho gráfico, se mantiene constante dentro de este rango de temperaturas. Su valor, junto con el de los demás parámetros termodinámicos asociados al pasaje de BR y PAP hacia la FS se representan en la figura 5.9 A y B, respectivamente.

Puede observarse que BR y PAP presentan tendencias diferentes. La termodinámica del reparto de BR muestra cambios entálpicos y entrópicos negativos mientras que para PAP dichas variaciones son positivas y más pequeñas. El patrón observado para esta última (PAP) ha sido observado para otras proteínas en estos sistemas (Malpiedi y col., 2008) y es compatible con la presencia de un “efecto hidrofóbico” que involucra la estructuración/desestructuración de las moléculas de agua en el mecanismo de reparto. Esto se comprende pensando que en la FI, las regiones hidrofóbicas de PAP están rodeadas de agua más estructurada (en relación al agua del seno de la fase) o “iceberg” tal como ocurre con todas la moléculas que exponen áreas hidrofóbicas. Cuando la molécula proteica es transferida hacia la FS, interaccionará con las moléculas de PEG mediante fuerzas de van der Waals, produciéndose la remoción del agua estructurada, ruptura de puentes hidrógeno ($\Delta H^\circ > 0$) y el consiguiente incremento en el desorden del sistema ($\Delta S^\circ > 0$).

En el caso de BR, los cambios entálpicos y entrópicos negativos indican que se trata de un proceso conducido entálpicamente. Berggren y colaboradores (2002) postularon que ciertos residuos aromáticos expuestos en la superficie proteica tienen una fuerte influencia en el reparto preferencial hacia la FS. Particularmente, la presencia de residuos de Trp ha mostrado tener un efecto claro direccionando la proteína hacia la fase polimérica (Huddleston y col., 1991), postulándose una interacción específica de transferencia de cargas entre las moléculas de PEG y el Trp en la cual el nitrógeno del anillo pirrólico del gupo indol actuaría como donador de hidrógeno. Existe también evidencia cristalográfica del rol crucial que tendrían en la interacción con PEGs los residuos aminoácidos cargados positivamente (Lys, Arg, His), los cuales serían capaces de interaccionar con los grupos oxo presentes en el polímero (Hašek, 2006). De acuerdo a lo calculado precedentemente (ver Tabla 4.1), el área superficial accesible (ASA) de las Lys, Arg e His en BR es mayor que en PAP (3668,73 frente a 3309,5 Å²).

Lo mismo sucede para el ASA de los Trp que en BR casi duplica al valor de PAP (353,75 contra 194,6 Å²). Esto explicaría las mayores chances de BR de interactuar con las moléculas de PEG por los mecanismos mencionados, justificaría los cambios negativos de entropía y entalpía asociados a su reparto y el consiguiente desplazamiento del equilibrio hacia la FS.

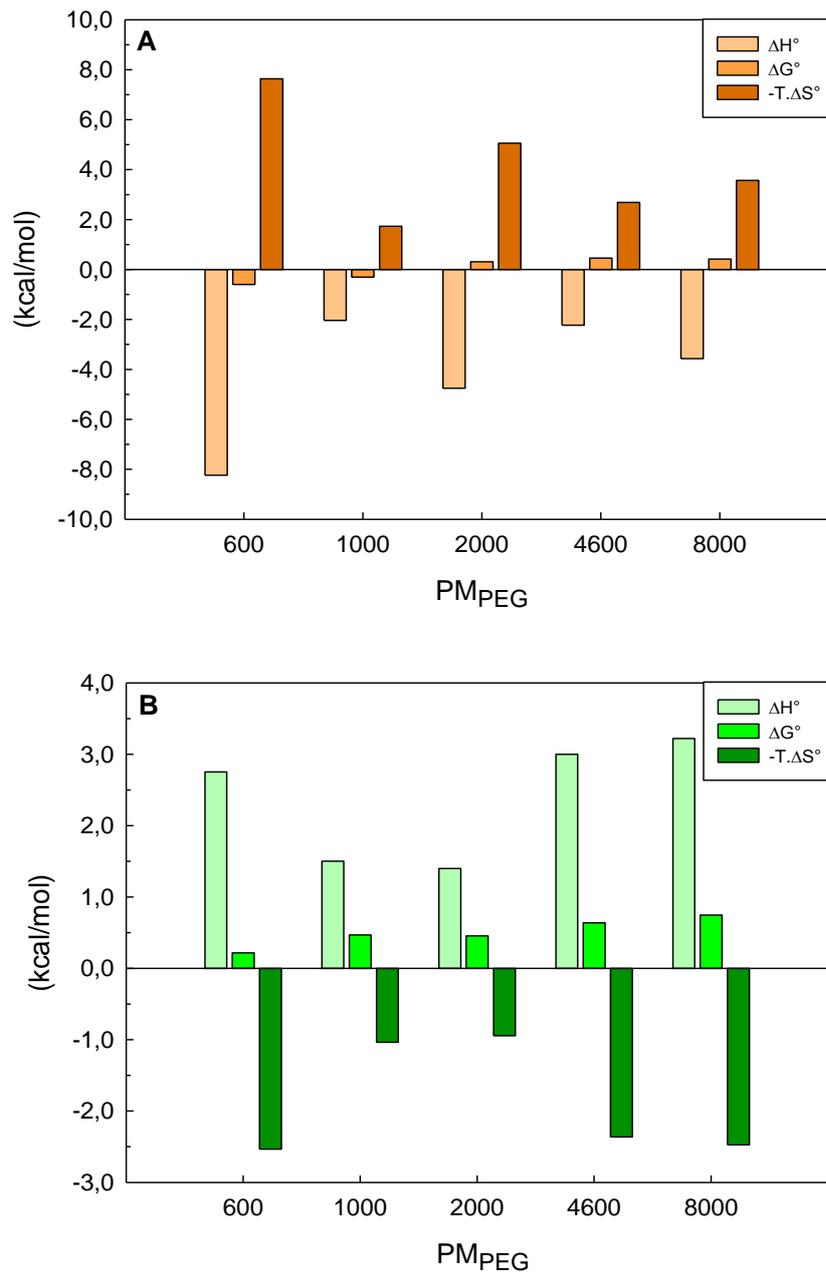


Figura 5.9: Variación de entalpía (ΔH°), entropía (ΔS°) y energía libre (ΔG°) asociados al reparto de (A) BR y (B) PAP en SBAs PEGs/NaCit LU2. Temperatura: 20 °C.

La figura 5.10 muestra en forma esquemática el mecanismo de reparto propuesto para BR y PAP. La formación de complejos BR-PEG sería responsable de los cambios negativos de entropía y entalpía asociados al reparto de BR y por ende del desplazamiento del equilibrio de reparto hacia la FS. Por razones de tipo estérico, el mecanismo propuesto para BR sólo sería relevante en el reparto en SBAs formados por PEGs de bajo PM, ya que en sistemas de PEGs de mayor tamaño, predominará el fenómeno de exclusión estérica. Para PAP, el ya explicado efecto hidrofóbico sería el responsable de los cambios positivos de los parámetros termodinámicos ΔH° y ΔS° y del consecuente reparto preferencial de la PAP hacia FI en todos los sistemas estudiados.

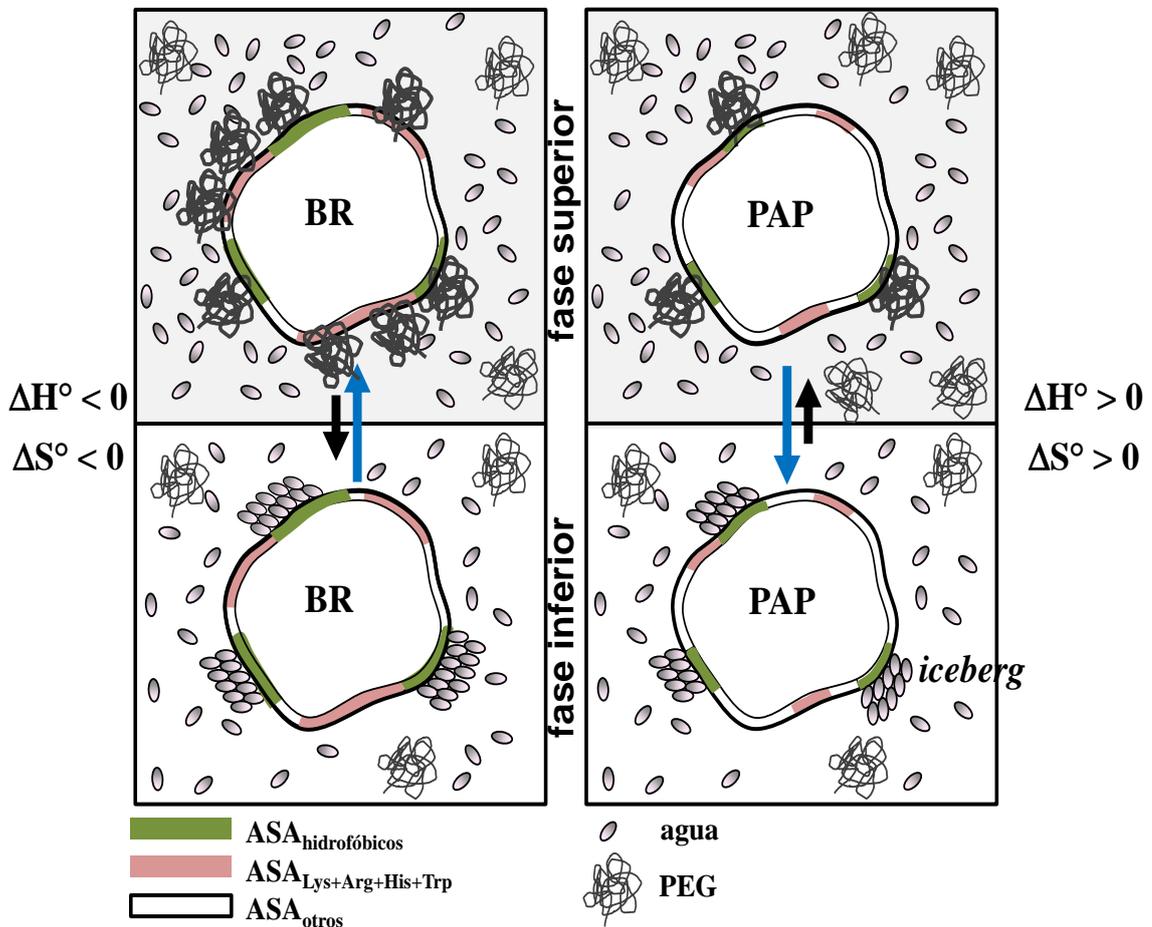


Figura 5.10: Representación esquemática del mecanismo de reparto propuesto de BR y PAP en SBAs PEG/NaCit.

5.3 Recuperación de las fitoproteasas a partir de sus extractos crudos

5.3.1 Efecto del peso molecular del polietilenglicol sobre el equilibrio de reparto de las fitoproteasas presentes en los extractos

En la figura 5.11 se representan los valores de K_r para las proteasas presentes en extractos de tallo y látex, designadas en este caso particular como BR_{tallo} y $PAP_{\text{látex}}$, en sistemas seleccionados PEG/NaCit LU2, junto con los valores de K_r las proteasas comerciales. Puede observarse que las enzimas de los extractos presentan un patrón de reparto similar al de las enzimas comerciales, pudiendo remarcarse que las de tallo y látex mostraron, en todos los casos, valores de K_r sensiblemente mayores a las comerciales probablemente debido a un aumento de las interacciones de las enzimas de los extractos con el resto de los componentes de la mezcla. La secuencia decreciente ya observada en los valores de K_r a medida que se incrementa el PM del polímero evidencia el fenómeno de exclusión ocasionado por el PEG al aumentar su tamaño, mostrándose la BR como más sensible a este efecto. Puede apreciarse que para $PAP_{\text{látex}}$, los valores de K_r s obtenidos para todos los sistemas fueron menores que la unidad, al igual que para PAP_{com} , indicando que esta enzima se reparte preferencialmente hacia la fase salina.

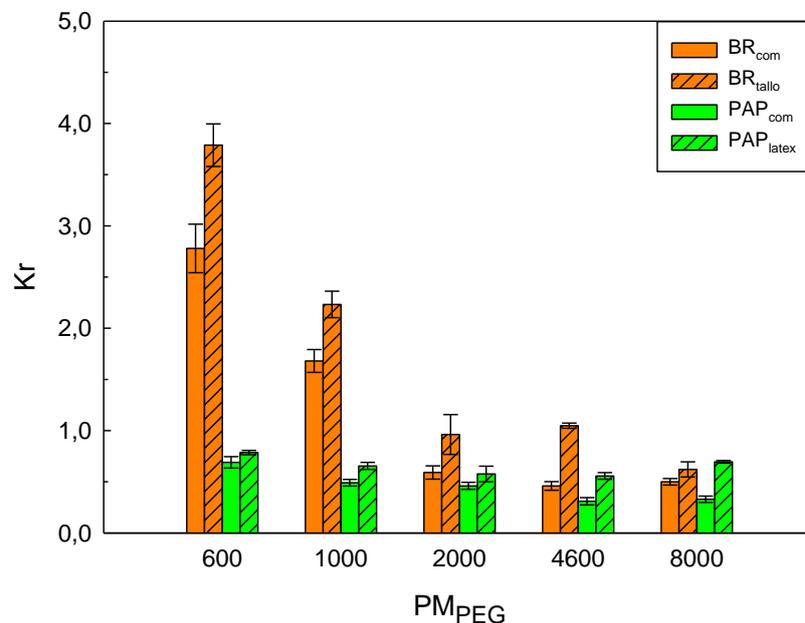


Figura 5.11: Efecto del peso molecular del polímero y composición de las fases sobre el K_r de BR y PAP de extractos naturales y su comparación con los K_r s de las proteasas comerciales en SBAs PEG/NaCit LU2. Temperatura 20 °C.

Las diferencias entre los valores de K_r de la enzima comercial (alto grado de pureza) y la enzima contenida en el extracto correspondiente, han sido observadas para otras enzimas (Tubio y col., 2009) y son adjudicables a cambios en el factor de actividad de la enzima debidos a los múltiples componentes presentes en sus mezclas complejas. Debe señalarse que en todos los SBAs donde se sembró extracto crudo (de tallo o látex) se observó a nivel interfacial, luego de alcanzado el equilibrio de reparto, la presencia del material particulado del extracto (células, fibras, etc.) fácilmente desechable. Esto indica que, junto con el proceso extractivo de la molécula de interés, tiene lugar un proceso de clarificación de la muestra, sin el requerimiento de centrifugación o filtración previa.

5.3.2 Rendimiento y factor de purificación del proceso extractivo

Los valores de rendimiento porcentual (R%) y factor de purificación (FP) logrados para ambas proteasas, luego del reparto de sus extractos crudos, nos permiten determinar cuáles serán los SBAs más adecuados para una estrategia extractiva.

La figura 5.12 A y B muestra los mencionados indicadores de desempeño del proceso de purificación para BR, tanto para FS como para FI en los diferentes SBAs ensayados. Puede comprobarse una correlación entre los valores de K_r y los rendimientos obtenidos en cada fase. Los mayores rendimientos en FS se lograron en aquellos sistemas formados por PEG600 y PEG1000, donde la BR exhibió los mayores valores de K_r . Estos sistemas permitieron recuperar el 66% de BR en FS (rica en PEG600) con un FP de 1,72. Si bien estos indicadores serían aceptables para una primera etapa de un proceso de purificación, debe recordarse que en presencia de dichos polímeros la BR experimentó una caída brusca de su actividad enzimática (ver apartado 5.1). Por su parte, los sistemas formados por PEGs de mayor PM (PEG2000, PEG4600 y PEG8000) permitieron recuperar entre el 80 y 90% de la BR en la fase salina y purificarla entre 1,4 y 2,5 veces (figura 5.12 B), mostrándose como los sistemas más apropiados para la recuperación primaria de esta enzima.

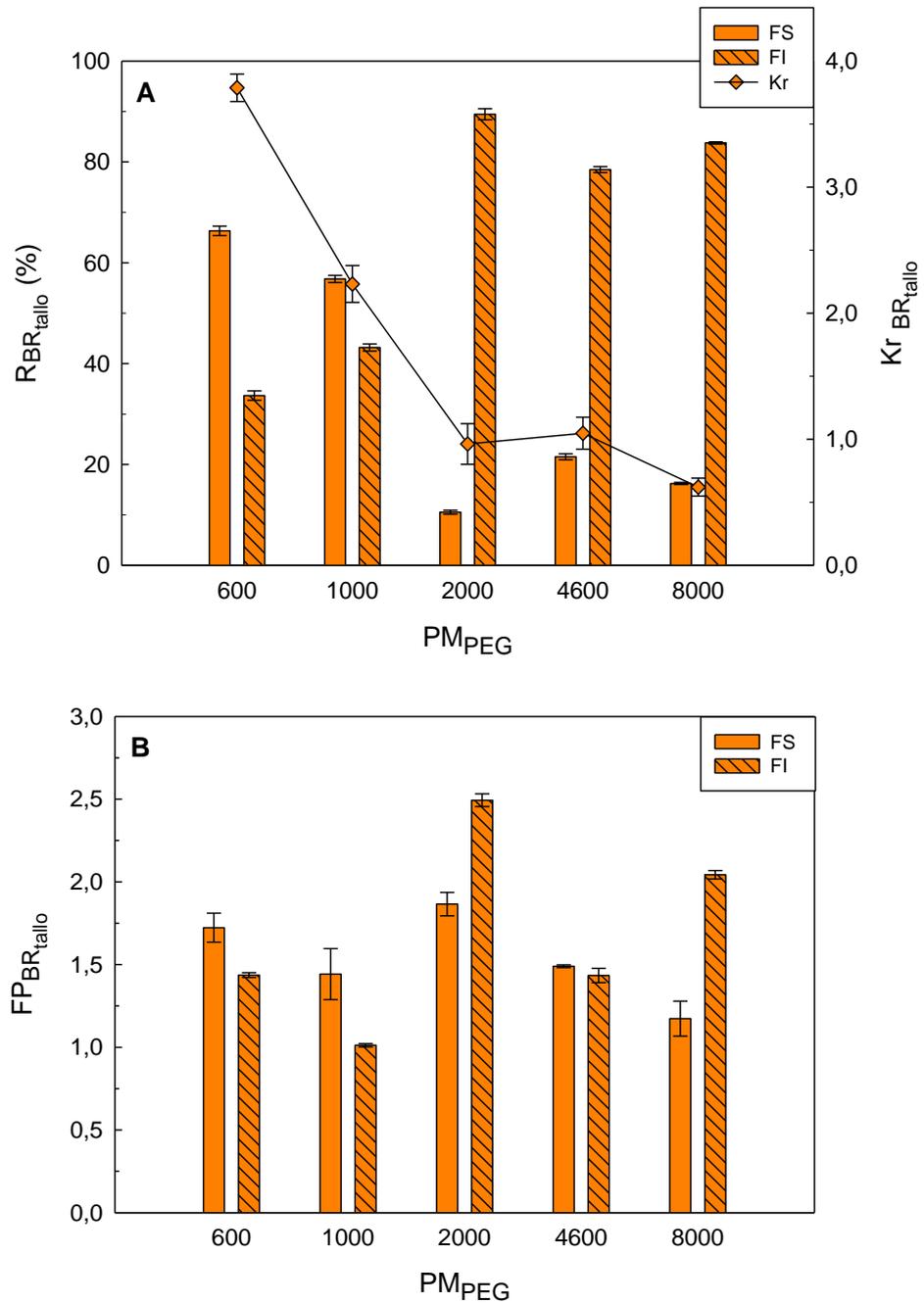


Figura 5.12: (A) Rendimiento porcentual, R(%), y coeficiente de reparto (Kr) y (B) factor de purificación, FP, de BR en fase superior e inferior de SBAs PEG/NaCit LU2. Temperatura: 20 °C.

En el caso de PAP de látex (figura 5.13 A) se aprecia que los mayores rendimientos se obtuvieron en la FI de todos los sistemas con valores comprendidos entre 58 y 80% en consistencia con los valores de Kr inferiores a la unidad. Los FPs obtenidos en dicha fase (figura 5.13 B) fueron cercanos a 1,3-1,5, no considerándose satisfactorios en ningún caso si se piensa al reparto como único método de purificación, pero sí serían aceptables como etapa de recuperación primaria de la enzima, ya que en

ésta se privilegian los valores de rendimiento por encima de los del FP. Particularmente, el sistema formado por PEG8000 mostró un buen valor de FP (2,5) en FS, pero dicho valor tiene asociado un escaso rendimiento (22%). En base a estos resultados se presentan dos alternativas: seleccionar la FI y recuperar la mayor parte de PAP sin purificarla o seleccionar la fase superior donde se alcanzaron mejores purificaciones con escaso rendimiento. Lo deseable sería lograr maximizar ambos indicadores en una sola fase.

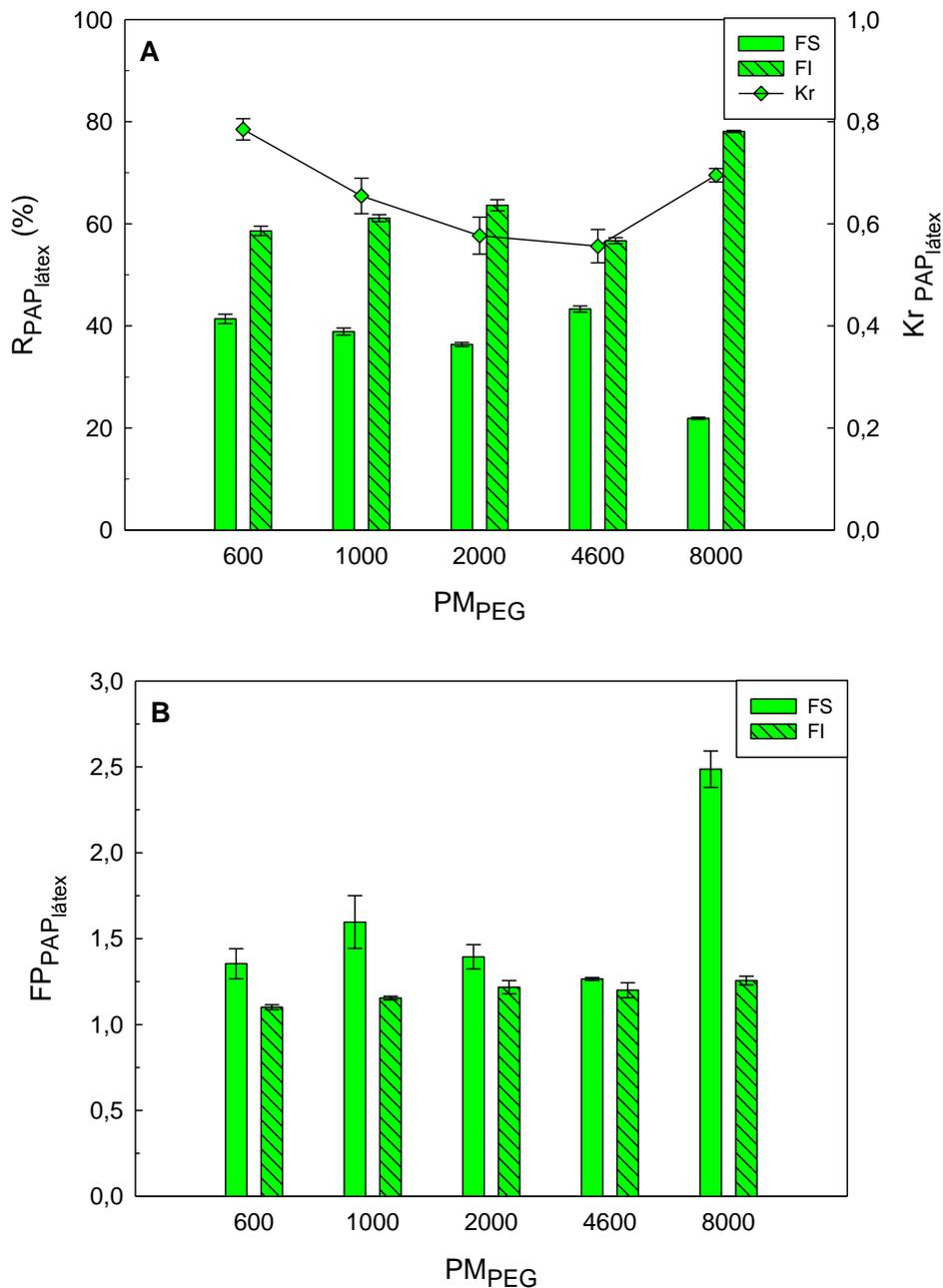


Figura 5.13: (A) Rendimiento porcentual, R(%), y coeficiente de reparto (Kr) y (B) factor de purificación, FP, de PAP en fase superior e inferior de SBAs PEG/NaCit LU2. Temperatura: 20 °C.

El FP es uno de los criterios que se evalúa para la selección de un sistema extractivo. Para su cálculo, se considera la totalidad de las proteínas presentes en los extractos crudos. Las fases donde se logran los mayores FPs son aquellas donde mejor se ha podido aislar a la proteína de interés de aquellas otras que conforman la mezcla de partida. La presencia de pequeñas moléculas contaminantes como grasas, azúcares, vitaminas, etc., también presentes en el extracto crudo, no está contemplada en el valor de FP. Es conocido que los azúcares reductores reaccionan con proteínas mediante la reacción de Maillard durante su etapa de conservación, dando lugar a productos glicosilados y pudiéndose afectar las características de estabilidad/actividad de las proteínas. Particularmente, se reportó que la PAP pierde un 70% de su actividad inicial luego de ser incubada con 300 mg/dL de glucosa al cabo de dos semanas (Zeng y col., 2006; Sox y Huth, 2009). En este marco y con la idea de establecer un nuevo criterio para la selección del sistema extractivo (además de R% y FP) se estudió el reparto de azúcares reductores (AR) presentes en los extractos crudos de ambas enzimas.

5.4 Comportamiento de reparto de azúcares reductores

El extracto de tallo de ananá y el látex de papaya son materiales con un significativo contenido de azúcares (Jothi y col., 2014; Yogiraj y col., 2014). La extracción con SBAs se ha utilizado para separar azúcares de antocianinas y betalainas presentes en extractos de remolacha y jamun (Chethana y col., 2007; Chandrasekhar y Raghavarao, 2015). Teniendo en cuenta la posible afectación que sobre las enzimas pudieran ocasionar el contacto con estos azúcares, se evaluó el perfil de reparto de los mismos en los SBAs seleccionados. La figura 5.14 A y B muestra los coeficientes de reparto de azúcares reductores (K_{rAR}) obtenidos al repartir el extracto de tallo de ananá y el látex de papaya, respectivamente. En ambos casos se observaron valores de $K_{rAR} \lll 1$, lo cual indica que los diferentes azúcares presentes en los extractos vegetales se reparten preferencialmente hacia la fase salina. Esta tendencia es más acentuada en el látex de papaya con valores de K_{rAR} inferiores a 0,09. La capacidad de los SBAs de separar las enzimas de los azúcares se estimó a través de su selectividad (β) calculada como el cociente $K_{rBR/PAP}/K_{rAR}$ en cada caso. Puede apreciarse que los sistemas formados por PEG600 y PEG1000 presentan la mayor capacidad separativa para el extracto de tallo, con valores de β mayores a 20, permitiendo recuperar mayoritariamente la BR en la FS y los azúcares en la fase contraria. En el caso del látex,

todos los sistemas mostraron una selectividad satisfactoria ($\beta > 7,5$), destacándose especialmente aquellos formados por PEG2000 y PEG4600 con valores de β superiores a 13.

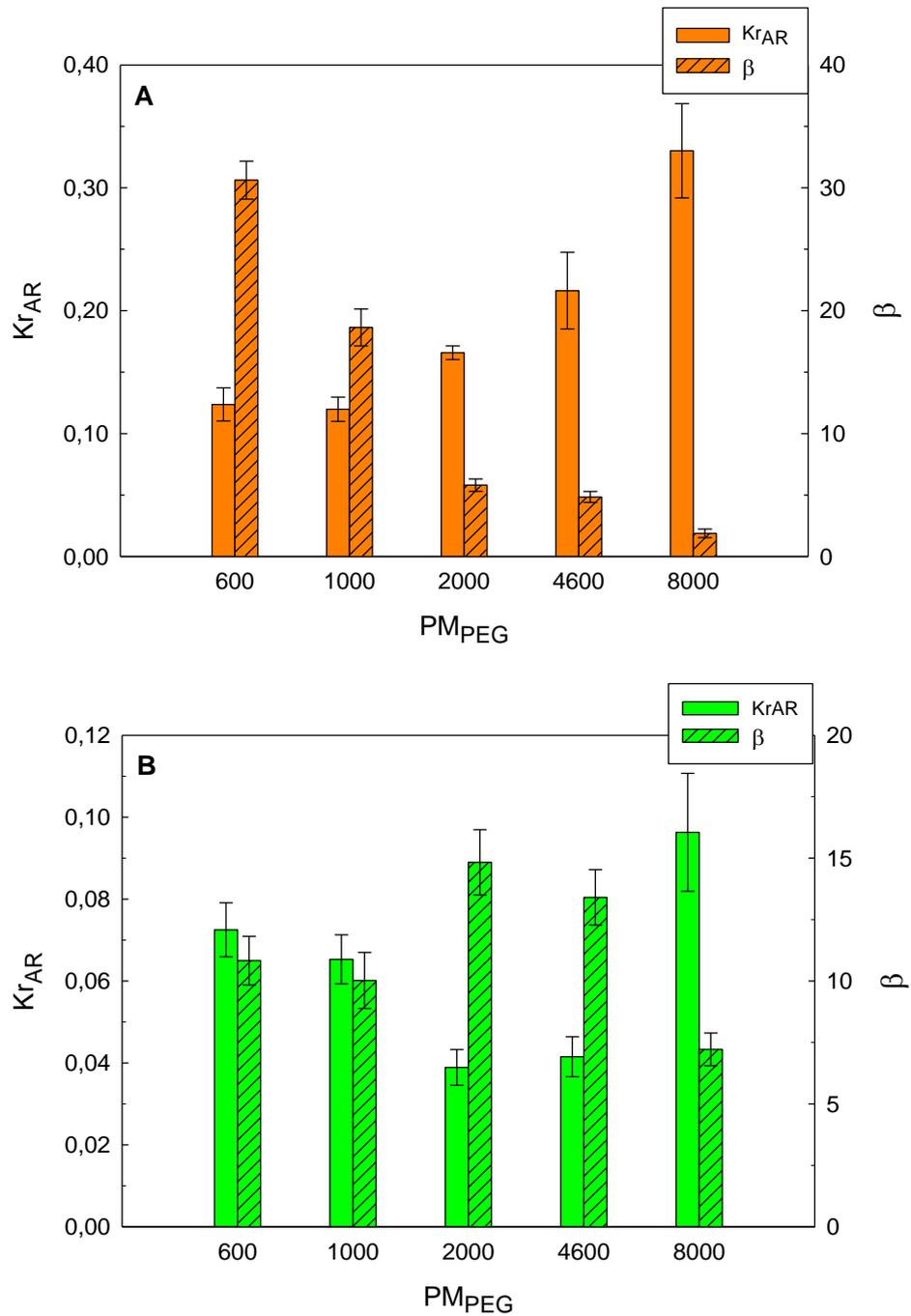


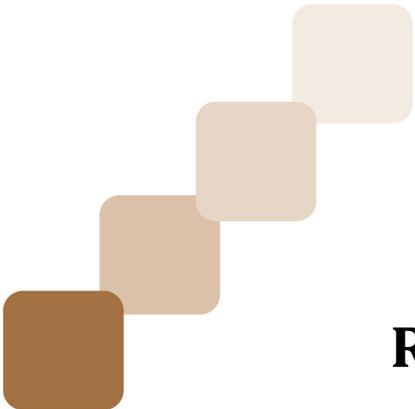
Figura 5.14: Valores de coeficiente de reparto de azúcares reductores (K_{rAR}) y selectividad (β) para el reparto de (A) BR y (B) PAP en SBAs PEG/NaCit LU2. Temperatura: 20 °C.

5.5 Conclusiones parciales

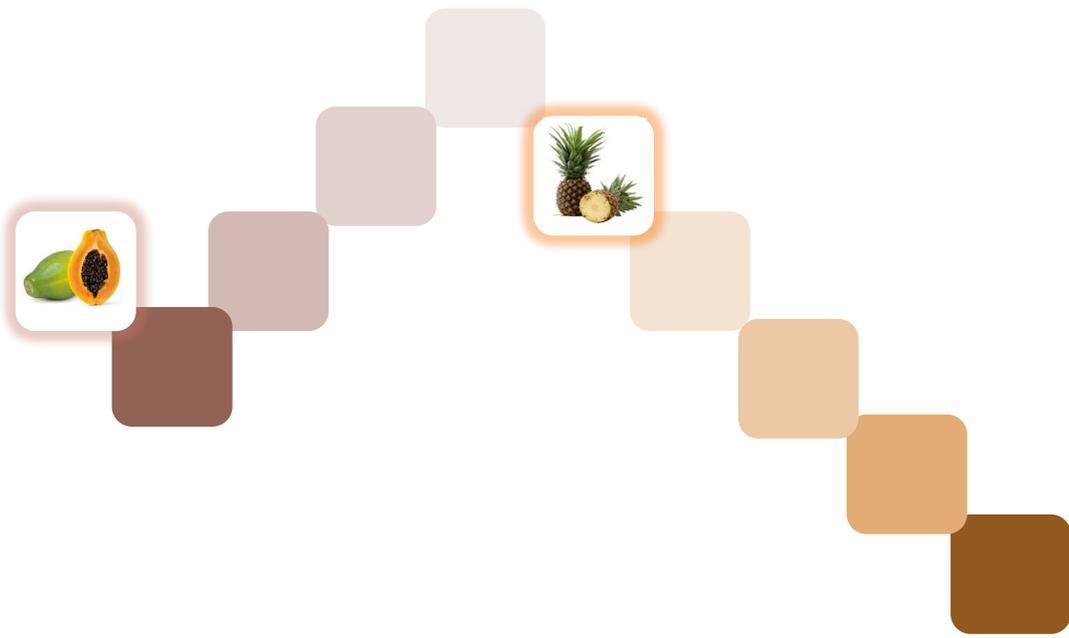
Desde un punto de vista básico, el estudio del reparto de BR y PAP en los SBAs PEG/NaCit permitió avanzar en el conocimiento de algunos aspectos del mecanismo del proceso extractivo. Si bien Kr se mostró decreciente con el peso molecular del PEG, de forma similar a lo ya observado para otras proteínas, pudieron marcarse algunas diferencias notorias entre ambas fitoproteasas. La termodinámica del reparto resultó compatible con la presencia de un efecto hidrofóbico en el reparto de PAP y de un mecanismo más específico de interacción proteína-PEG en el caso de BR en SBAs formados por los PEGs de menor tamaño. A nivel molecular estas diferencias fueron explicadas sobre la base de las propiedades de superficie de ambas proteínas, siendo crucial el área expuesta por ciertos aminoácidos (Trp, Lys, His, Arg).

Desde un punto de vista aplicado, la evaluación de los diferentes SBAs para recuperar las enzimas a partir de sus extractos crudos reflejó también comportamientos disímiles. Para BR, los SBAs formados por los PEGs de mayor PM (PEG2000, PEG4600 y PEG8000) mostraron buen desempeño extractivo ya que permitieron recuperar mayoritariamente la fitoproteasa en fase salina ($R = 80-90\%$) con FP de 1,4-2,5. Estos indicadores pueden considerarse aceptables para una etapa primaria de recuperación de la enzima, más aún si se considera que, en paralelo a la extracción, ocurre la clarificación de la muestra. Para PAP, los resultados no fueron lo suficientemente satisfactorios ya que, si bien todos los SBAs permitieron recuperar la enzima en forma significativa en la fase inferior ($> 60\%$), los valores de FP apenas superaron la unidad. Excepcionalmente, el SBA formado por PEG8000 mostró capacidad de purificar a la enzima (FP 2,5) en la fase polimérica pero con bajo rendimiento (22%). Esto deja planteado el desafío de desarrollar alguna estrategia que permita optimizar ambos parámetros en una de las fases.

Finalmente, si en estas etapas extractivas se deseara reducir también el contenido de azúcares reductores, presentes en los extractos crudos de ambas enzimas, deberá direccionarse el reparto de éstas hacia la fase polimérica, ya que los azúcares mostraron distribuirse unilateralmente hacia la fase salina en todos los SBAs ensayados.



6.
RESULTADOS



6. ESTRATEGIAS QUE INCLUYEN ALGINATO COMO LIGANDO DE AFINIDAD

❖ Ideas previas. Interrogantes

En la recuperación de proteínas a partir de matrices complejas, utilizando sistemas bifásicos acuosos polietilenglicol/sal, es aconsejada como estrategia general una extracción inicial, donde la molécula de interés se direcciona hacia la fase polimérica, seguida de una nueva extracción donde la misma se re-distribuya a una fase salina, libre de polímero. Este planteo obedece a la observación experimental de que los componentes y eventuales contaminantes que suelen acompañar a las proteínas en diferentes materiales biológicos se reparten mayoritariamente hacia la fase salina, en razón de su elevado tamaño o carácter hidrofílico. Tal es el caso de los ácidos nucleicos, azúcares, pequeñas moléculas hidrofílicas y componentes particulados en general (agregados moleculares, restos celulares, etc.). De esta forma, la primera etapa extractiva resulta muy eficaz en términos de eliminación de estos componentes y de clarificación de la muestra, pero trae aparejado que la molécula de interés se recupere en un medio viscoso y de elevada concentración en PEG, lo cual en ocasiones dificulta su manipulación y/o aplicación final. En estos casos es necesario un paso adicional que separe la proteína de este polímero, siendo lo más sencillo una segunda extracción o retro-extracción bajo diferentes condiciones de pH, concentración de sal o agregado de PEGs de mayor tamaño de modo que la molécula blanco se transfiera a una nueva fase salina, pobre en PEG. Cuando esta estrategia no resulta efectiva se recurre a otras metodologías más costosas como la ultrafiltración o diferentes tipos de cromatografías.

El reparto de afinidad con macroligandos poliméricos se presenta como una alternativa a los mencionados procesos que permitiría desplazar el equilibrio de reparto de una molécula hacia la fase polimérica, donde el ligando se distribuye mayoritariamente y luego, mediante un estímulo apropiado (cambio de pH, agregado de sal o de ciertos iones), separar a la proteína de dicha fase por precipitación. Los requisitos que deben cumplirse para que esto sea viable son: – distribución asimétrica del macroligando hacia la fase polimérica, – interacción específica de éste con la molécula de interés y – posibilidad de que los complejos formados puedan precipitarse y redisolverse manipulando adecuadamente las condiciones del medio.

La interacción de BR y PAP con NaALG, evidenciada a través de las medidas calorimétricas e hidrodinámicas (capítulo 4), sumada a la conocida capacidad de este polímero de gelificar en presencia de iones calcio y redisolverse a altas fuerzas iónicas son importantes condiciones que marcan la posibilidad de desarrollar una estrategia de recuperación de estas enzimas basada en reparto de afinidad usando al NaALG como macroligando. Para evaluar esta opción, sus indicadores de desempeño, ventajas y desventajas será necesario recorrer y dar respuesta a las siguientes cuestiones:

¿Se repartirá el NaALG preferencialmente hacia la fase polimérica de los sistemas PEG/NaCit utilizados precedentemente? ¿En qué concentración podrá emplearse este polímero? ¿Traccionará suficientemente a las proteínas de interés hacia la fase donde el mismo se distribuye mayoritariamente? ¿Cuáles serán las condiciones de precipitación y disolución de los complejos enzima-NaALG? ¿Será posible diseñar estrategias de extracción con mejores “performances” que aquellas planteadas en el capítulo precedente?

6.1 Reparto de afinidad

6.1.1 Efecto de la presencia del alginato de sodio sobre la actividad enzimática

Considerando la interacción del NaALG con BR y PAP, inferida a partir de los resultados precedentes, debe evaluarse si la formación de los complejos proteína-polímero afecta la actividad enzimática a lo largo del tiempo transcurrido en un paso extractivo. Los eventuales efectos ocasionados por el NaALG en las medidas de actividad se deberán tener presentes al explicar los resultados de las estrategias de purificación e indicarán sobre la necesidad o no de introducir factores de corrección o blancos de reacción. Reproduciendo las condiciones del proceso de reparto, ambas enzimas fueron disueltas en medios con la composición de la fase polimérica (superior) de un sistema PEG8000/NaCit LU2 con y sin agregado de diferentes concentraciones de NaALG. Adicionalmente, tanto BR como PAP fueron incubadas en sus *buffers* de conservación (Ac 100 mM pH 5,00 y Pi 50 mM pH 6,00, respectivamente) a los fines comparativos.

Las medidas de actividad residual determinadas al cabo de diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2 y 3 horas) se encuentran representadas en las figuras 6.1 y 6.2. Dichas medidas fueron realizadas según lo explicado en la sección 3.2.9 de Materiales y Métodos, considerándose como 100% de actividad a aquella medida en medio *buffer* a tiempo 0.

Similar a lo ya analizado en el capítulo 5, podemos ver que ambas soluciones de proteasas sufren una caída muy leve y gradual de su actividad cuando son mantenidas en sus *buffers* de conservación, no modificándose significativamente los valores incluso luego de 3 horas de incubación a 20 °C.

Por su parte, cuando BR fue incubada en FS tanto en ausencia como en presencia de NaALG (figura 6.1), su actividad sufrió un moderado aumento en todos los casos estudiados, no evidenciándose diferencias significativas en presencia de diferentes concentraciones del polímero. Esto sugiere que el cambio no sería consecuencia de un efecto directo del NaALG sino del medio enriquecido en PEG8000 que induciría algún cambio conformacional en el sitio activo de BR potenciando la actividad de la enzima. Es importante remarcar, que luego de 3 horas de incubación, la BR retuvo mayoritariamente su actividad en todas las condiciones ensayadas.

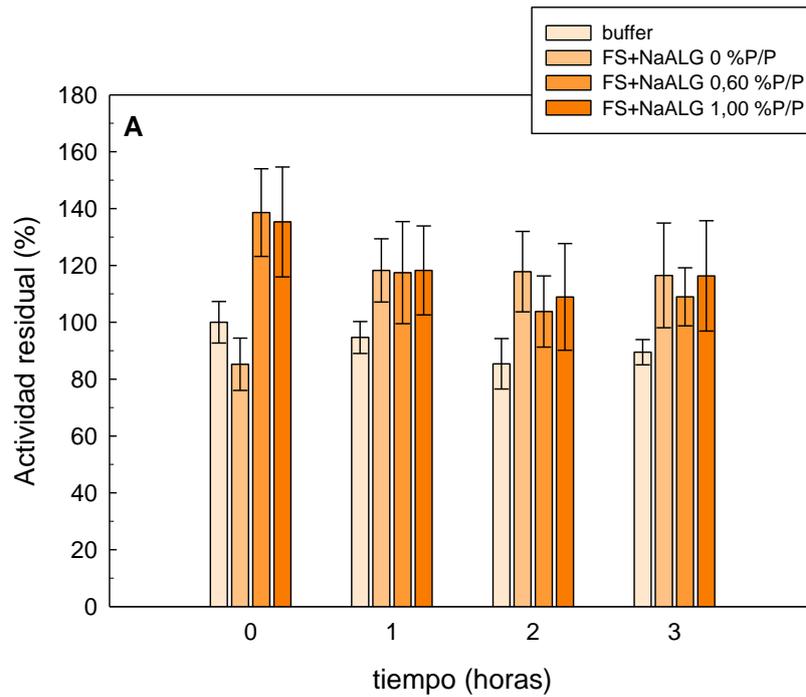


Figura 6.1: Efecto de la presencia de NaALG sobre la actividad de BR 500 μ M luego de distintos tiempos de incubación en FS del sistema PEG8000/NaCit LU2. Temperatura: 20 °C.

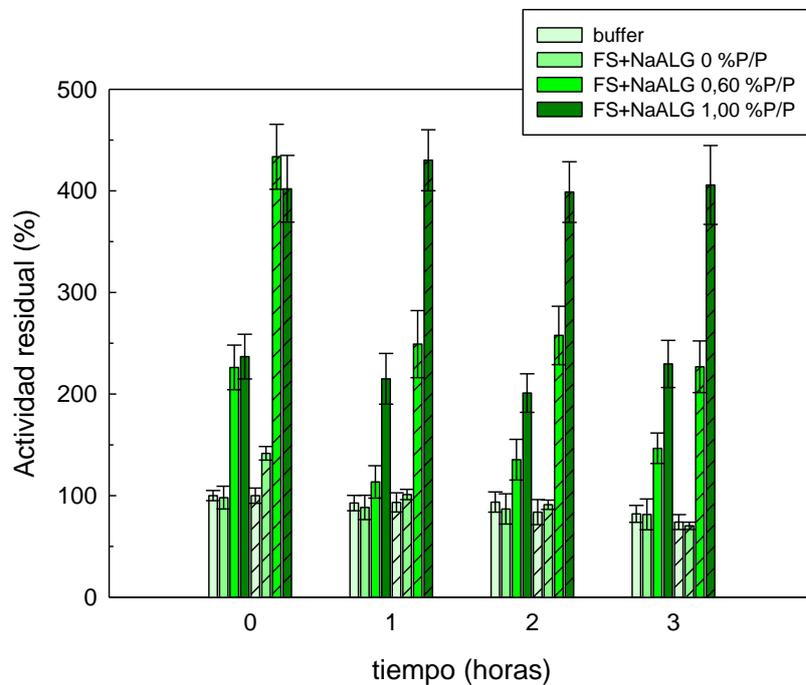


Figura 6.2: Efecto de la presencia de NaALG sobre la actividad de PAP 500 μ M luego de distintos tiempos de incubación en FS del sistema PEG8000/NaCit LU2. Actividad medida en: buffer NaPi 500 mM pH 7,00 (barras lisas); buffer TRIS 50 mM pH 8,20 (barras rayadas). Temperatura: 20 °C.

Para el caso de la enzima PAP, las incubaciones fueron llevadas a cabo de forma similar a lo hecho para BR, pero las determinaciones de actividad se realizaron en dos medios diferentes. Por un lado, en *buffer* Pi 500 mM pH 7,00 utilizado en las experiencias precedentes y, por otro, en *buffer* TRIS 50 mM pH 8,20. Este último se ensayó como alternativa para medir la actividad enzimática en medios adicionados con iones calcio, ya que de usar el primer *buffer* se formarían fosfatos insolubles que interferirían en las medidas.

En la gráfica 6.2 puede observarse que luego de incubar PAP en presencia de NaALG (0,60 y 1,00 %P/P), las medidas de actividad realizadas tanto a pH 7,00 como a pH 8,20 se incrementaron notoriamente en relación a aquellas realizadas luego de incubar en los restantes medios (*buffer* Pi 50 mM pH 6,00 y fase polimérica). Esto evidenciaría un efecto favorecedor de este polímero en la reacción de la enzima frente al sustrato BAPNA. También puede apreciarse que en ausencia de NaALG las actividades a pH 7,00 resultaron similares o ligeramente superiores a las de pH 8,20 mientras que en presencia de dicho polímero, las medidas a pH 8,20 fueron sensiblemente mayores. Este patrón es compatible con un incremento en el pH óptimo de la enzima como consecuencia de su interacción con el NaALG.

6.1.2 Distribución del alginato de sodio entre las fases

La figura 6.3 muestra los valores de coeficiente de reparto del polímero ($K_{r_{NaALG}}$) en los distintos sistemas seleccionados PEG/NaCit LU2 para una concentración final de NaALG de 0,10 %P/P. Puede observarse claramente que el equilibrio de reparto está desplazado hacia la fase polimérica en todos los SBAs, con valores de $K_{r_{NaALG}}$ muy superiores a la unidad ($> 3,40$), independientemente del PM del PEG empleado. Este desplazamiento unidireccional del polímero (70-80 % del NaALG sembrado) hacia la FS de los SBAs ensayados ya fue reportado en sistemas PEG/Pi (Teotia y Gupta, 2001) y demuestra el cumplimiento de una de las condiciones necesarias para que este polímero pueda utilizarse como macroligando de afinidad de BR y PAP en procesos de reparto.

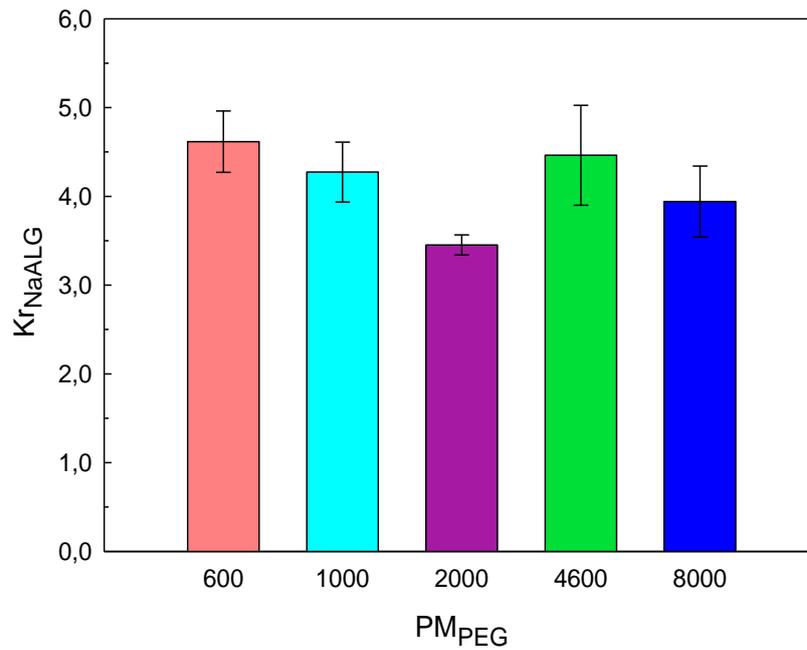


Figura 6.3: Distribución del NaALG 0,10 %P/P en SBAs PEG/NaCit LU2 formados por PEGs de distinto PM. Temperatura 20 °C.

6.1.3 Reparto de las enzimas en sistemas bifásicos adicionados con alginato de sodio

Se llevaron a cabo los repartos de las fitoproteasas comerciales en los SBAs seleccionados como potenciales sistemas a ser aplicados en la estrategia bioseparativa integrada, todos ellos con NaALG 0,10 %P/P en su composición total. En esta etapa, los sistemas formados por los PEGs más pequeños no fueron ensayados en virtud de la caída de actividad observada para ambas enzimas (90% en BR, 35% en PAP) en presencia de estos polímeros luego de diferentes períodos de incubación (ver capítulo 5).

La figura 6.4 muestra en forma comparativa los Krs de BR y PAP en SBAs con y sin NaALG. Puede observarse que en presencia de NaALG el equilibrio de reparto de ambas enzimas se vio desplazado hacia la fase rica en PEG, la cual según lo visto precedentemente, contiene también la mayor parte del NaALG agregado. Los corrimientos más notorios fueron observados en los SBAs formados por PEG8000, siendo entonces éstos seleccionados para los próximos ensayos. El direccionamiento de las enzimas puede atribuirse a un mecanismo de afinidad derivado de la capacidad del NaALG de unir BR y PAP o, eventualmente, a cambios en la composición de las fases, inducidos por la incorporación del NaALG al sistema, que modificarían el

comportamiento de reparto de las proteasas. Esta última posibilidad fue evaluada según se describe a continuación.

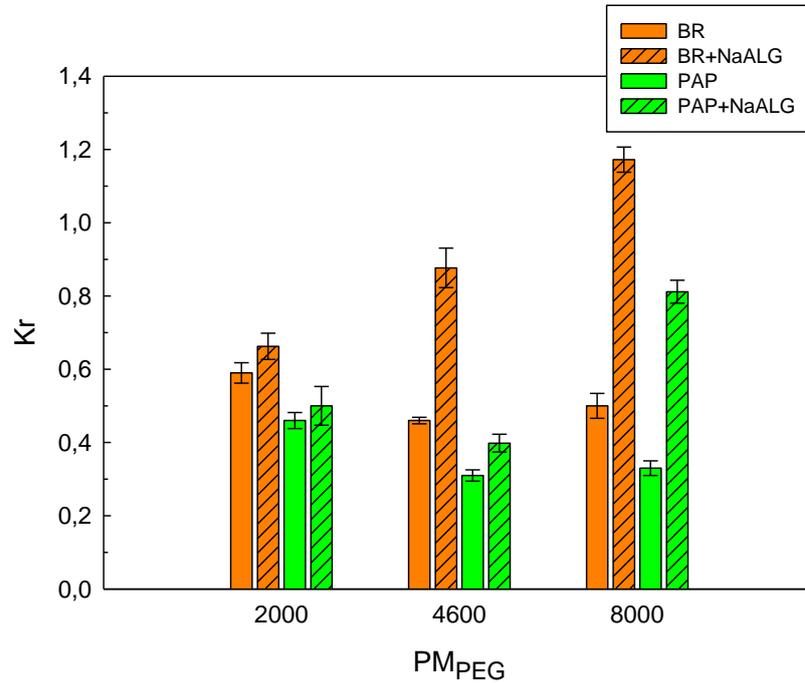


Figura 6.4: Efecto de la presencia de NaALG 0,10 %P/P sobre el perfil de reparto de BR y PAP en SBAs PEG/NaCit LU2. Temperatura: 20 °C.

6.1.4 Caracterización de los sistemas bifásicos polietilenglicol+alginato/citrato: diagramas binodiales

La figura 6.5 muestra los diagramas binodiales correspondientes al SBA PEG8000/NaCit pH 5,20 LU2, a 20 °C, con y sin agregado de NaALG 0,10 %P/P. En ambos casos los datos experimentales fueron ajustados con diferentes expresiones reportadas en la literatura (ver tabla 3.3), encontrándose los mejores resultados al aplicar la expresión de Mistry (Mistry y col., 1996). Los parámetros de ajuste correspondientes a este modelo se resumen en la tabla 6.1.

Puede apreciarse que las curvas con y sin NaALG son prácticamente superponibles en todo el rango de concentraciones. Sin embargo, en la región próxima al punto crítico, es decir, para concentraciones intermedias de ambos componentes, se observa un leve desplazamiento de la curva binodial hacia la región bifásica en el sistema con NaALG. El efecto de este corrimiento sobre las composiciones de equilibrio se muestra en la tabla 6.2.

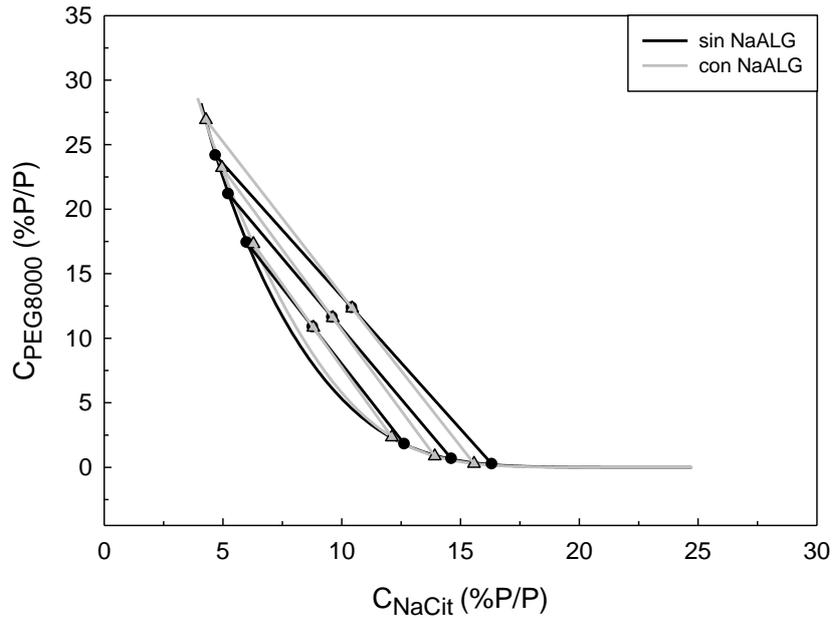


Figura 6.5: Comparación de los diagramas binodiales PEG8000/NaCit en ausencia y presencia de NaALG 0,10 %P/P. Temperatura: 20 °C.

Tabla 6.1: Parámetros de ajuste experimental obtenidos aplicando el modelo de Mistry para los SBAs PEG8000/NaCit pH 5,20 en ausencia y presencia de NaALG.

Parámetros	sin NaALG	con NaALG
<i>a</i>	5,12	4,67
<i>b</i>	-0,86	-0,64
<i>c</i>	$-7,39 \times 10^{-4}$	$-9,03 \times 10^{-4}$
$R^{2(*)}$	0,9977	0,9983

^(*) coeficiente de determinación

Para las tres composiciones totales ensayadas, los valores de concentración de PEG y NaCit en las respectivas fases, superior e inferior, muestran ligeras diferencias en los sistemas con y sin agregado de NaALG. Dentro de estos cambios, se observó como efecto más marcado el enriquecimiento de la FS en el polímero PEG, particularmente para las líneas de unión (LU) más alejadas del punto crítico (LU2 y LU3). La representación de estos resultados en la figura 6.5, muestra un incremento en la pendiente de cada LU en presencia de NaALG. Estas modificaciones también resultaron en la disminución del cociente de volúmenes fase (V_{FS}/V_{FI}).

El incremento en la concentración de PEG en la FS de los sistemas con NaALG podría ser responsable de modificaciones en el comportamiento de reparto de las enzimas. En este caso, ¿se desplazarán BR y PAP hacia la fase rica en PEG o hacia la fase salina? En la sección 5.2.1, al analizar el efecto de la composición del sistema sobre los valores de Kr para ambas proteasas, se observó que el incremento en la concentración de PEG (LU mayores) provocaba una disminución en los valores de Kr de BR y PAP, siendo esto muy notorio en el caso de BR. Según lo visto en la sección 6.1.3, la presencia de NaALG en el SBA genera el efecto contrario, es decir, favorece el desplazamiento del equilibrio de reparto de las enzimas hacia la fase rica en PEG. Se deduce entonces que esta tracción de BR y PAP, ejercida por el NaALG, hacia la FS es el resultado de la capacidad de este polímero de interaccionar específicamente con las enzimas (componente de afinidad), efecto que predomina por sobre aquel derivado del cambio en la composición de fases, que ocasionaría el comportamiento opuesto.

Tabla 6.2: Efecto de la presencia de NaALG 0,10 %P/P sobre el diagrama binodial PEG8000/NaCit pH 5,20.

Sistema	LU	Composiciones (%P/P) ^(*)						LLU (%P/P)	$\frac{V_{FS}}{V_{FI}}$
		Total		Fase Inferior		Fase Superior			
		PEG	NaCit	PEG	NaCit	PEG	NaCit		
<i>Sin NaALG</i>	1	10,82	8,83	1,76	11,66	17,38	6,02	16,92	1,85
<i>Con NaALG</i>				2,34	12,11	18,60	5,84	17,43	1,78
<i>Sin NaALG</i>	2	11,69	9,52	0,62	14,64	21,13	5,24	24,42	1,15
<i>Con NaALG</i>				0,87	13,91	23,21	4,96	25,51	0,82
<i>Sin NaALG</i>	3	12,33	10,44	0,21	16,34	24,13	4,71	26,61	1,03
<i>Con NaALG</i>				0,29	15,57	26,92	4,28	28,93	0,82

^(*) concentraciones de equilibrio de los componentes de fase

6.1.5 Selección de la concentración óptima de alginato a emplear en repartos

Si bien el efecto del NaALG sobre el direccionamiento de BR y PAP hacia la fase rica en PEG quedó evidenciado claramente, fue necesario determinar para qué concentración de este polímero se producía el máximo desplazamiento de las enzimas hacia dicha fase. Para ello sólo se trabajó con el sistema PEG8000/NaCit LU2, que es

aquel donde se registraron los mayores cambios de Kr (ver figura 6.4). El nivel máximo de NaALG ensayado fue 0,30 %P/P ya que por encima de dicho valor se visualizó marcada turbidez en el SBA, probablemente por excederse del límite de solubilidad de este polímero en cada fase. El resultado de este estudio puede observarse en la figura 6.6.

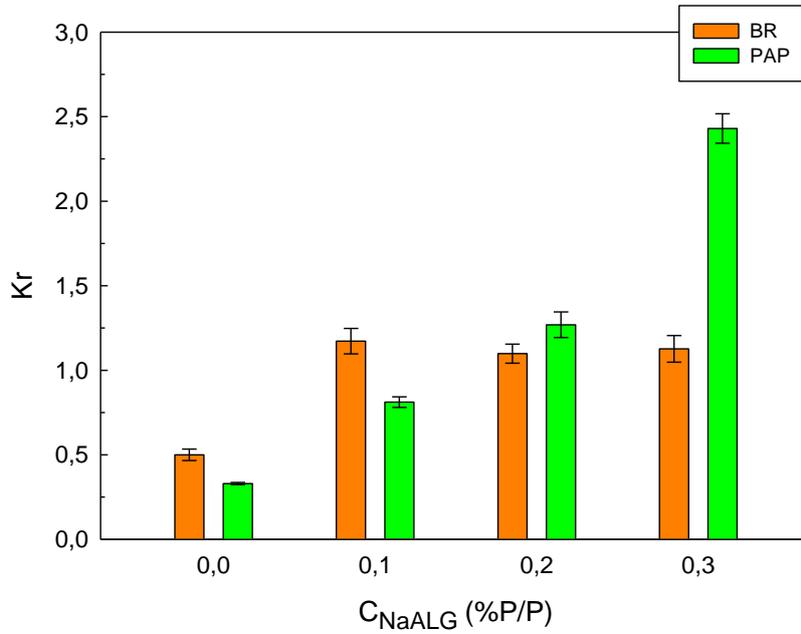


Figura 6.6: Efecto de la concentración de NaALG sobre el perfil de reparto de BR y PAP en SBA PEG8000/NaCit LU2. Temperatura: 20 °C.

Analizando los valores de Kr se puede destacar que ambas proteasas sufrieron un desplazamiento del equilibrio hacia la fase rica en PEG en presencia de NaALG. Para BR, los valores de Kr en sistemas con NaALG 0,10 %P/P se duplicaron respecto de los valores obtenidos en ausencia del polímero, no advirtiéndose nuevos cambios en K_{rBR} para concentraciones mayores de NaALG. Estos resultados sugieren que esa concentración de NaALG (0,10 %P/P) resulta suficiente para alcanzar la saturación de BR con NaALG y lograr el máximo desplazamiento del equilibrio de reparto de la enzima.

En el caso de PAP, los valores de Kr aumentaron progresivamente con la concentración del ligando incorporado, llegando a quintuplicarse en presencia de NaALG 0,30 %P/P. Si bien para esta proteína no se logró la condición de saturación, no resulta aconsejable utilizar mayores niveles de NaALG en razón de los problemas de turbidez mencionados precedentemente.

Estos distintos patrones de comportamiento son consecuencia de las diferencias encontradas en la interacción del NaALG con ambas enzimas y determinan la selección de dos concentraciones del ligando para las experiencias posteriores de extracción: 0,10 %P/P para BR y 0,30 %P/P para PAP.

6.2 Precipitación y redisolución de los complejos enzima-alginato

6.2.1 Efecto de la presencia de CaCl₂ y NaCl sobre la actividad enzimática

Durante el diseño de la estrategia bioseparativa integrada que emplea NaALG como macroligando de afinidad, se utilizará CaCl₂ para la precipitación reversible del polímero seguida de la redisolución del complejo en alta fuerza iónica dada por NaCl. En base a esta proyección, se propuso estudiar el efecto de dichas sales sobre la actividad de BR y PAP en función de distintos tiempos de incubación con las mismas. En la figura 6.7 se representa la actividad residual de las fitoproteasas en ausencia y presencia de distintas concentraciones de CaCl₂ y NaCl (disueltas en medio *buffer* NaCit 50 mM pH 5,20). A modo comparativo, de la misma manera que en la sección 6.1.1, se determinó la actividad de las proteasas en sus medios de conservación correspondientes (buffer Ac y buffer Pi). Puede apreciarse que ambas enzimas sufrieron una disminución de su actividad (5-20%) a partir de la primera hora de incubación en todos los medios ensayados, actividad que luego se mantuvo incluso hasta cumplidas las 3 horas. PAP mostró ser menos afectada por la presencia de sales. Estos resultados nos permiten concluir que aún a elevadas concentraciones de CaCl₂ y NaCl y luego de incubaciones prolongadas, ambas enzimas retienen mayoritariamente su actividad frente a sus sustratos específicos.

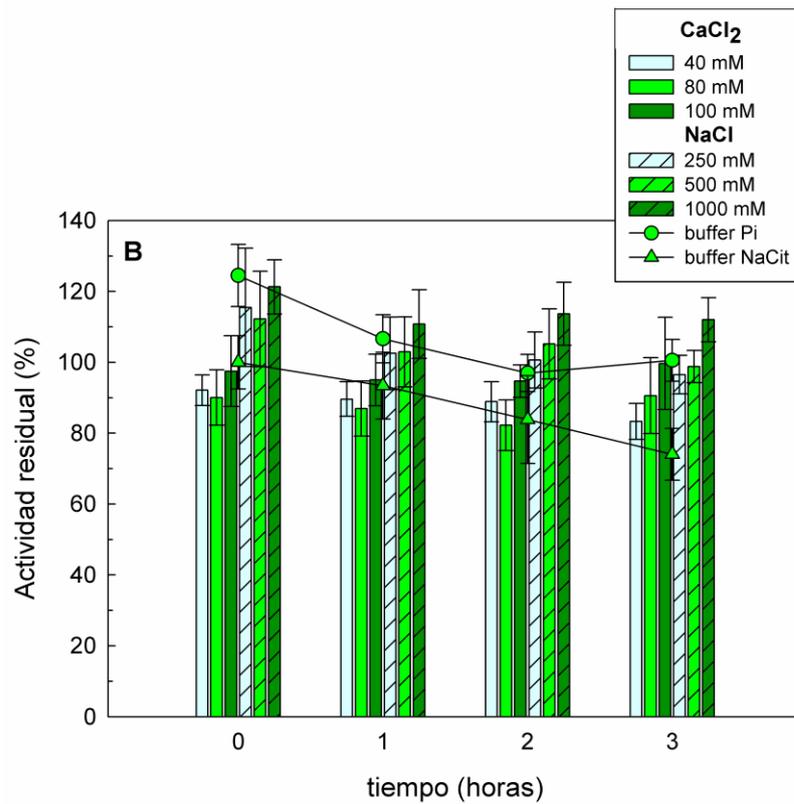
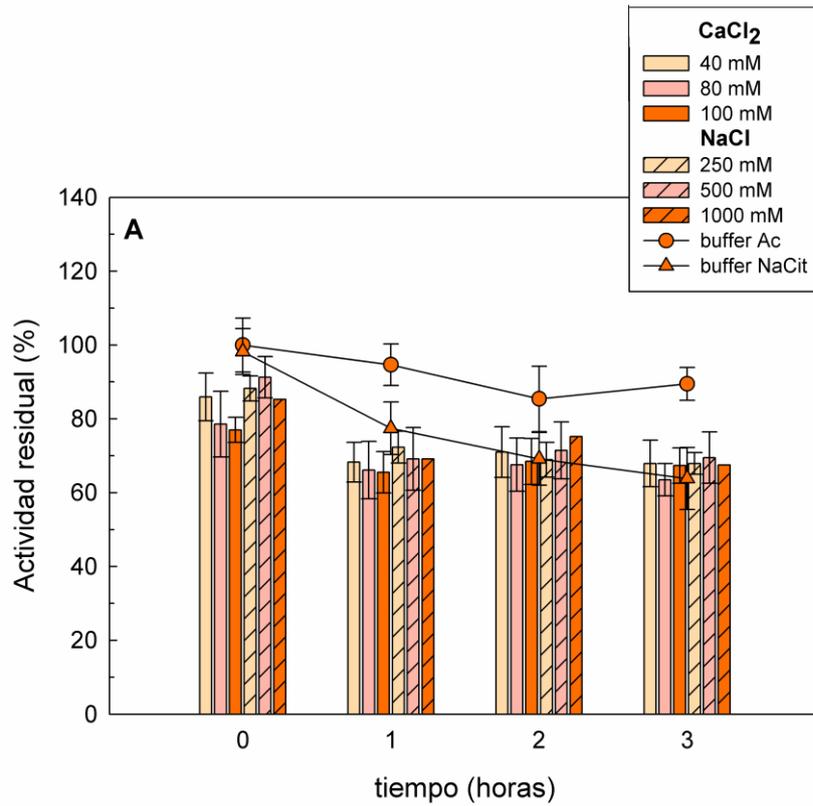


Figura 6.7: Efecto de la presencia de sales sobre la actividad de (A) BR y (B) PAP 500 μ M luego de distintos tiempos de incubación en buffer NaCit 50 mM pH 5,20. Temperatura: 20 °C.

6.2.2 Determinación de las condiciones óptimas para la formación del gel de alginato

La concentración de CaCl_2 para lograr la precipitación del NaALG fue determinada mediante la titulación de diferentes soluciones del polímero con cantidades crecientes de CaCl_2 según se muestra en la figura 6.8. Puede observarse que a bajas concentraciones de la sal los valores de absorbancia se mantienen relativamente constantes y bajos, indicando que la concentración de Ca^{2+} agregada no es suficiente para iniciar la gelificación del NaALG. Por encima de cierta concentración crítica de la sal (80-100 mM), los valores de turbidez aumentan drásticamente debido a la formación de complejos insolubles (geles) fácilmente observables, llegando a un máximo cuyo valor depende de la concentración de NaALG dado que ésta determina la máxima cantidad de gel que puede formarse en un dado sistema. Como era de esperar, a medida que aumenta la concentración del polímero se requieren menores concentraciones de CaCl_2 para iniciar el proceso de gelificación y mayores niveles de esta sal para lograr la máxima turbidez. Debe tenerse presente que durante la titulación, los agregados del agente gelificante se hicieron en forma consecutiva, difiriendo en pocos minutos unos de otros, no contemplándose que pueda requerirse cierto tiempo para la completa formación del gel.

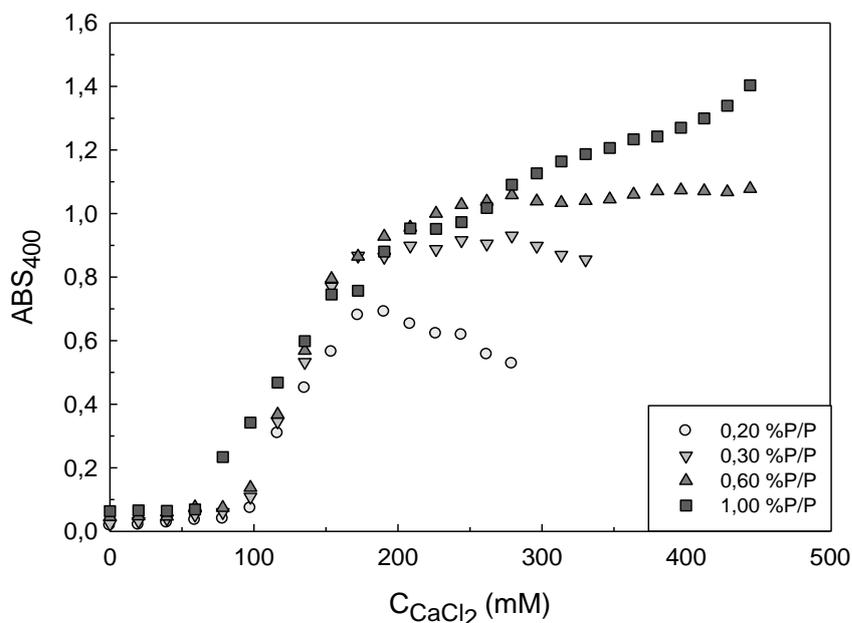


Figura 6.8: Titulación turbidimétrica de soluciones de NaALG (0,20-1,00 %P/P) con CaCl_2 .
Temperatura: 20 °C.

Para definir la concentración adecuada de CaCl_2 y el tiempo necesario para lograr la precipitación completa del NaALG se evaluó la cinética de formación del gel en sistemas con diferentes concentraciones de NaALG a los que se adicionó una concentración de CaCl_2 80 mM (la mínima requerida para iniciar la formación del gel).

La figura 6.9 muestra el perfil cinético obtenido en cada caso, apreciándose que a mayores concentraciones del polímero se requieren lapsos de tiempo más largos para la completa formación el gel. Este proceso resultó prácticamente instantáneo para el NaALG 0,20 %P/P llegando a requerir aproximadamente 25 minutos en el sistema con NaALG 1,00 %P/P. Se hicieron nuevos agregados de CaCl_2 en todos los sistemas (datos no mostrados) no observándose nuevos incrementos en la turbidez. Esto indica que la concentración utilizada de CaCl_2 (80 mM) y un tiempo de 25 minutos de incubación mínima garantizan la precipitación cuantitativa del NaALG 0,20-0,60 %P/P.

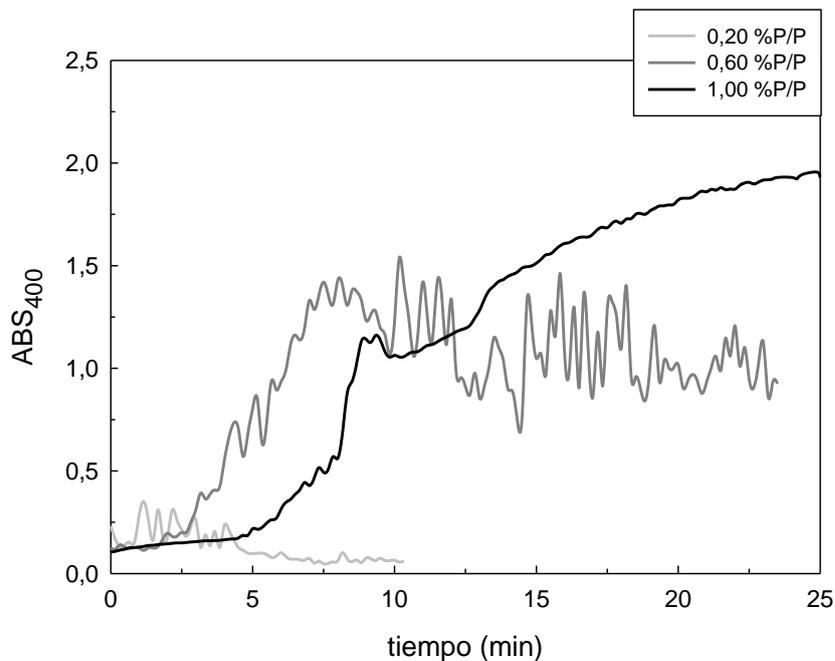


Figura 6.9: Cinética de formación del complejo NaALG- Ca^{2+} para diferentes concentraciones del polímero (0,20, 0,60, 1,00 %P/P). Temperatura: 20 °C.

6.2.3 Determinación de las condiciones de redisolución de los geles de alginato

Sobre los geles formados bajo las condiciones definidas precedentemente, se ensayaron diferentes condiciones de redisolución: i) incremento de la fuerza iónica por agregado de NaCl e ii) incorporación de NaCit como agente complejante de los iones Ca^{2+} , cruciales en el proceso de gelificación. La tabla 6.3 muestra los resultados de estos

ensayos luego de 24 horas de incubación en agitación a 8°C en los diferentes medios. Puede apreciarse que el incremento de la fuerza iónica (aumento de la concentración de NaCl entre 0 y 1000 mM) no tuvo ningún efecto en la disolución de los geles formados, ni siquiera en el sistema de baja concentración de NaALG (0,20 %P/P), siendo esto diferente a lo reportado por otros autores que indicaban disolución total de los geles con NaCl 0,5-1,0 M (Mondal y col., 2004; Teotia y Gupta, 2004). Combinando incremento de fuerza iónica con agregado de NaCit se observó efectividad parcial en el proceso de redisolución, aunque restringida al sistema de menor concentración de NaALG. Un análisis más minucioso de los resultados sugirió que la presencia de NaCit a partir de una concentración 125 mM es decisiva en el proceso de disolución, siendo necesario evaluar el efecto ocasionado por concentraciones mayores de esta sal.

Tabla 6.3: Efecto de la concentración de sales en el proceso de redisolución de los geles de alginato. Referencias: NR: No redisolución; R+: Redisolución mínima; R++: Redisolución media; R+++: Redisolución completa.

		Redisolución	
C_{NaCl} (mM)	C_{NaCit} (mM)	C_{NaALG} (%P/P)	
		0,20	0,60
0-1000	0	<i>NR</i> (*)	<i>NR</i> (*)
25	250	<i>R++</i>	<i>NR</i>
50	125	<i>R+</i>	<i>NR</i>
125	50	<i>NR</i>	<i>NR</i>
250	25	<i>NR</i>	<i>NR</i>

(*) observaciones realizadas en medio acuoso (0 mM de NaCit) para distintas concentraciones de NaCl (0, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mM)

La tabla 6.4 muestra el seguimiento en el tiempo del proceso de redisolución de los geles de NaALG ante agregados crecientes de NaCit para la concentración de NaALG de 0,20 %P/P. Se observa que al aumentar la concentración de la sal se incrementa la eficiencia del proceso lográndose la redisolución total del gel en menores tiempos de incubación. Dado que un patrón similar fue observado para los sistemas conteniendo NaALG 0,60 %P/P, se seleccionó una concentración final de NaCit 1 M

para la etapa de redisolución ya que ésta es la que permitió los mejores resultados en los menores tiempos.

Tabla 6.4: Efecto de la concentración de NaCit sobre el tiempo de redisolución del gel de NaALG para una concentración 0,20 %P/P del polímero. Referencias: NR: No redisolución; R+: Redisolución mínima; R++: Redisolución media; R+++: Redisolución completa.

C _{NaALG} (%P/P)	Tiempo (min)	C _{NaCit} (mM)							
		0	25	50	75	100	250	500	1000
0,20	0-10						NR	R+	R++
	10-20					NR	R+	R++	R+++
	20-30								
	30-40	NR	NR	NR					
	40-50						R++		
	50-60				R+	R+		R+++	
	60-120								

6.2.4 Determinación de las condiciones óptimas para la precipitación de bromelina y papaína

El estudio de la concentración de CaCl₂ y del tiempo de incubación necesario para la completa formación del gel de NaALG fue realizado en soluciones acuosas y en ausencia de las enzimas de interés. Con la idea de lograr una mayor aproximación a las condiciones extractivas de un SBA, se repitieron los procesos de gelificación utilizando como medio la FS de los SBAs PEG8000/NaCit LU2, en presencia de 500 µM de BR y PAP y con agregados de diferentes concentraciones de NaALG. El seguimiento del proceso se realizó visualizando y semicuantificando la cantidad de gel formado (simbolizado con + sobre las barras), y determinando el porcentaje de la actividad enzimática recuperada en el sobrenadante (SN) y en el gel, luego de su redisolución (RD).

La figura 6.10 A y B permite apreciar que la mayor parte de BR y PAP no fueron retenidas en el gel, sino que, por el contrario, quedaron en el SN. En el caso de BR, al incrementar la concentración de NaALG se produjo un incremento en la cantidad de gel formado y, consecuentemente, una mayor recuperación de la enzima en el

mismo, mientras que para PAP este efecto fue poco notorio. Debe precisarse que en todos los casos las cantidades de gel formado resultaron sensiblemente inferiores a aquellas obtenidas en los medios acuosos precedentemente ensayados con lo cual se infirió la presencia de algún factor que reducía la gelificación. Al analizar la composición de la FS del SBA PEG8000/NaCit LU2 surgió que, si bien la misma era predominantemente rica en PEG8000 (21,13 %P/P), contenía también una pequeña proporción de NaCit (5,24 %P/P) (ver tabla 3.2). Esto representa una concentración aproximada de 270 mM de sal, que según lo visto en el apartado 6.2.3, resultaba suficiente para capturar los iones Ca^{2+} y contraponerse a la formación del gel. En razón de esto se replanteó la experiencia haciendo una dilución de la fase (1:5) para lograr la reducción de la concentración de NaCit.

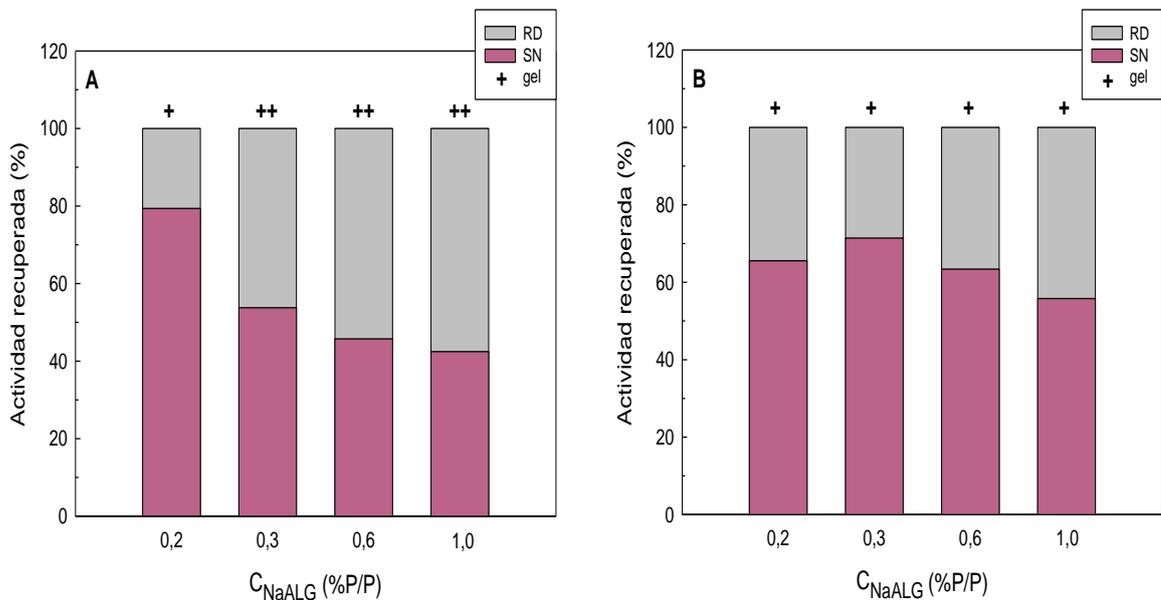


Figura 6.10: Actividad recuperada de (A) BR y (B) PAP 500 μM en SN y RD luego de la gelificación y redisolución llevada a cabo en la FS de un SBA PEG8000/NaCit LU2. Cantidad de gel formado: + mínimo; ++ medio; +++ máximo. Temperatura: 8 $^{\circ}\text{C}$.

En la figura 6.11 se observan los resultados de esta nueva estrategia, apreciándose una significativa mejora en la formación de gel y en la retención de la enzima en el mismo. En el caso de PAP, una concentración final de NaALG de 0,60 %P/P resultó suficiente para recuperar más del 90 % de la enzima, mientras que para BR se requirieron concentraciones mayores (1,00 %P/P) para retener el 80 % de la proteína en el gel.

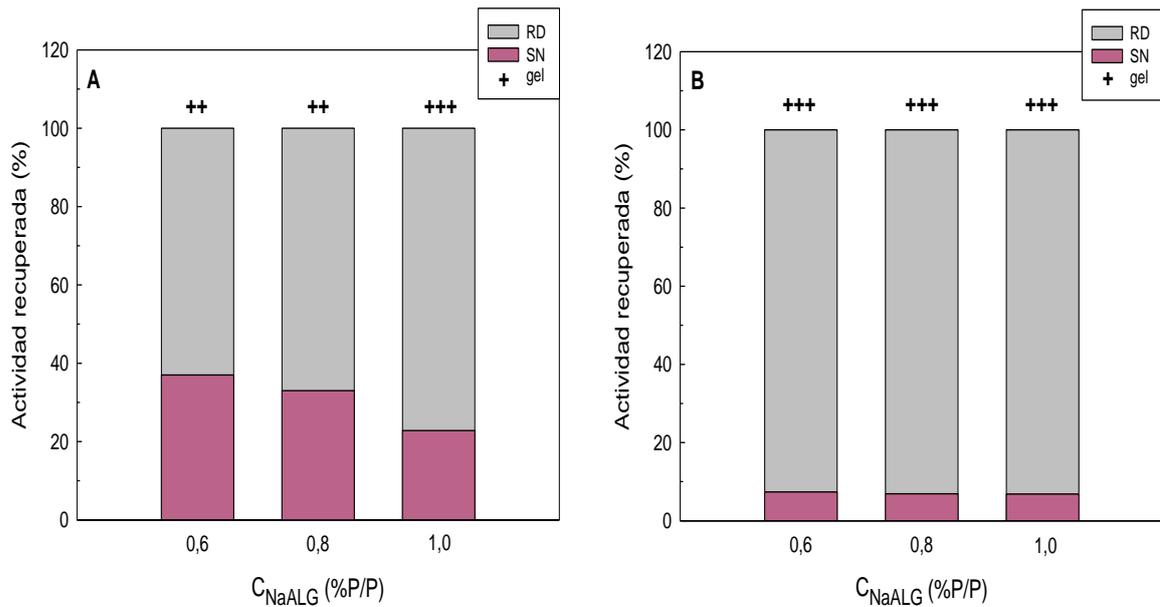


Figura 6.11: Actividad recuperada de (A) BR y (B) PAP 500 μ M en SN y RD luego de la gelificación y redisolución llevada a cabo en la FS de una SBA PEG8000/NaCit LU2 dilución 1:5. Cantidad de gel formado: + mínimo; ++ medio; +++ máximo. Temperatura: 8 °C.

6.3 Diseño de una estrategia bioseparativa combinada: reparto de afinidad empleando alginato como macroligando

En base a las condiciones halladas para el reparto direccionado de BR y PAP y luego para la precipitación y redisolución de los geles de ALG, se diseñó una estrategia para recuperar ambas proteasas a partir de sus fuentes naturales combinando el reparto de afinidad con la precipitación empleando $CaCl_2$. La figura 6.12 muestra un esquema representativo de dicha estrategia, la cual fue descrita detalladamente en la sección 3.2.25 de Materiales y Métodos. El seguimiento del proceso extractivo en cada caso fue realizado por medidas de actividad enzimática de las proteasas y proteínas totales en las distintas etapas experimentales. Los indicadores de la recuperación de ambas fitoproteasas en la FS del SBA seleccionado se muestran en la tabla 6.5.

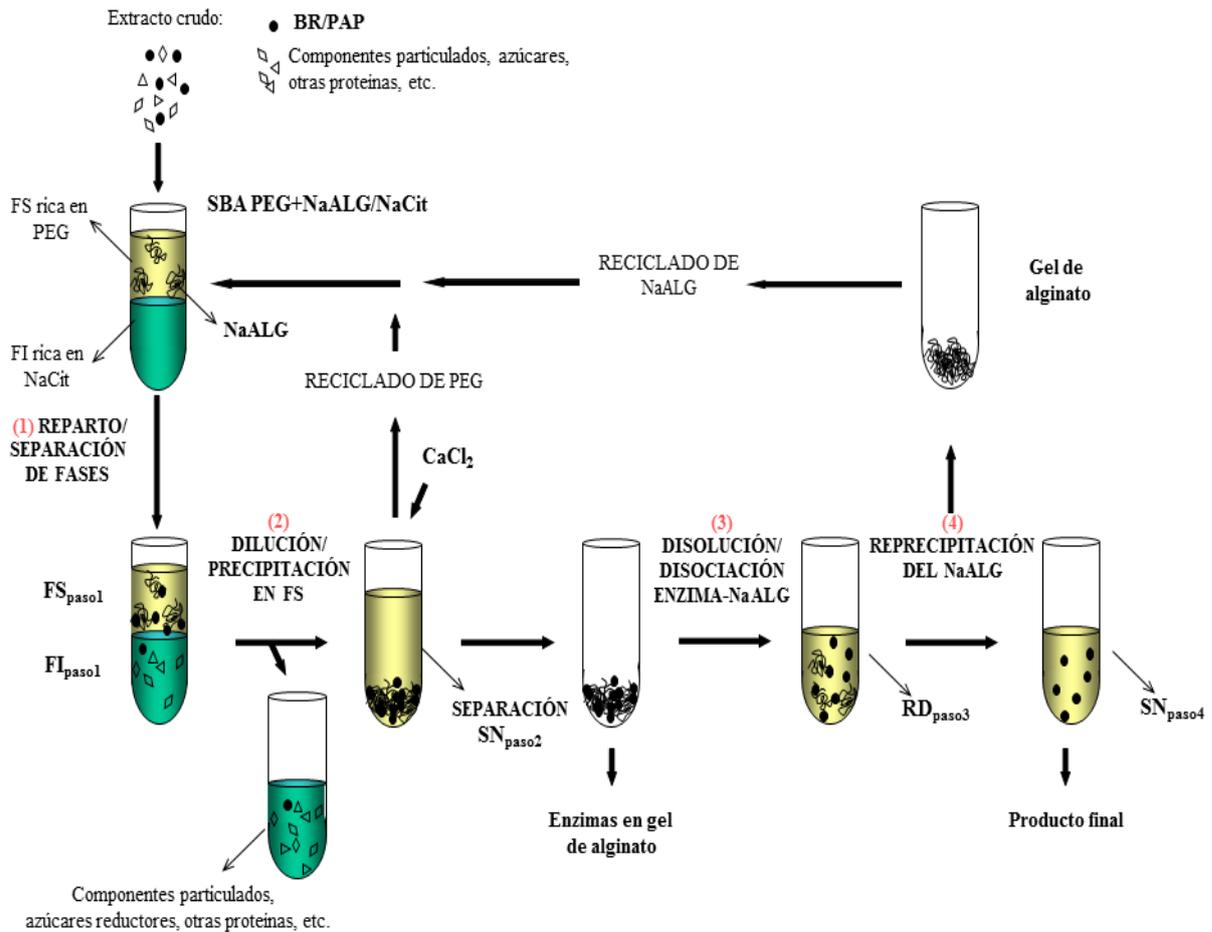


Figura 6.12: Representación esquemática de la estrategia del reparto de afinidad empleando NaALG como macroligando polimérico diseñada para el recupero de BR y PAP a partir de sus extractos.

Del análisis de los parámetros resumidos en la tabla 6.5 puede inferirse que en la primera etapa de la estrategia desarrollada, la inclusión de NaALG en los SBAs desplazó el equilibrio de reparto de ambas fitoproteasas hacia la FS, rica tanto en PEG como en el mencionado polímero de afinidad. En ambos casos se lograron rendimientos del orden del 85 %, sensiblemente superiores a los logrados en ausencia de este polímero (< 20 %) según lo visto precedentemente (capítulo 5). En cuanto a los FPs sólo en el caso de PAP se alcanzó un valor satisfactorio de este indicador ya que la enzima se purificó 2 veces en este paso. En el caso de BR el valor del FP obtenido no fue satisfactorio (1,22).

En la etapa de gelificación y redisolución (RD_{paso3}), si bien se produjo una caída del rendimiento del 6 y 12% para BR y PAP respectivamente, en el caso de esta última, esto se vio compensando por un incremento del FP.

Tabla 6.5: Indicadores de la recuperación de las fitoproteasas a partir de extractos naturales según estrategia descrita en la sección 3.2.25 y representada en la figura 3.12.

Etapa	Actividad total (u Abs/s)	Proteína total (mg)	Actividad específica (u Abs/s mg)	Rendimiento (%)	FP
BROMELINA					
<i>Extracto tallo</i>	0,276	1,090	0,253	100	1,00
<i>FS_{paso1}</i>	0,235	0,760	0,309	85,1	1,22
<i>SN_{paso2}</i>	0,016	0,074	0,216	5,8	0,85
<i>RD_{paso3}</i>	0,219	0,573	0,382	79,3	1,51
PAPAÍNA					
<i>Látex</i>	0,375	2,79	0,134	100	1,00
<i>FS_{paso1}</i>	0,318	1,17	0,271	84,8	2,01
<i>SN_{paso2}</i>	0,048	0,243	0,197	12,8	1,50
<i>RD_{paso3}</i>	0,270	0,834	0,323	72,0	2,41

6.4 Estabilidad de papaína en el gel de alginato

A partir de los indicadores de purificación globales, pudo inferirse que la estrategia combinada resultó satisfactoria para la extracción de la PAP a partir del látex. Teniendo en cuenta que la enzima de interés en este caso quedó retenida en un gel de NaALG, se evaluó y comparó su actividad en este producto final y en el látex crudo, ambos liofilizados y conservados a -18 °C, por diferentes intervalos de tiempo. La figura 6.13 muestra la actividad retenida por la enzima en las mencionadas condiciones. En ambos casos se observó una caída gradual en la actividad de la enzima conforme se incrementa el período de conservación de la misma, lográndose retener alrededor de un 60% de la actividad luego de 30 días. De esta manera podemos afirmar que la presencia de NaALG en el liofilizado no afectó significativamente la funcionalidad de la PAP en comparación con la enzima en su fuente natural, el látex de *C. papaya*. Cabe mencionar que en el caso del gel no fue adicionado ningún estabilizante.

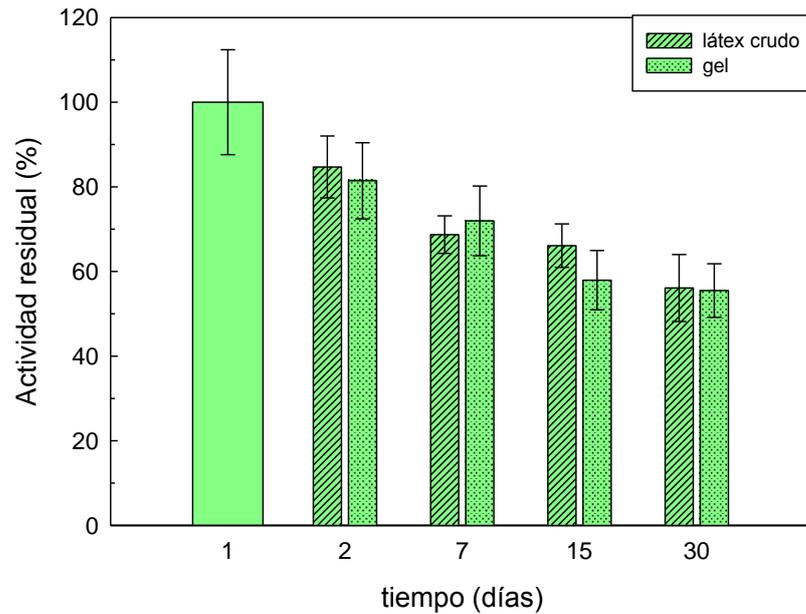


Figura 6.13: Actividad residual de PAP liofilizada en el látex y luego del entrapamiento en el gel de alginato. Temperatura de conservación: -18 °C.

6.5 Reciclado del alginato de sodio

A partir del rediseño del paso 3 (RD_{paso3}), conteniendo PAP y NaALG en un medio NaCit 1 M, se ensayó un paso adicional (paso 4) de reprecipitación (regelificación) del polímero con el objeto de recuperarlo para su reciclado y paralelamente obtener la enzima libre del mismo (ver figura 6.12). Para ello se realizó una titulación turbidimétrica con CaCl_2 y el correspondiente estudio cinético de formación de gel (similar a lo descrito en el apartado 6.2.2), hallándose que una concentración final de esta sal de 160 mM y una incubación de 30 minutos a 8°C eran las condiciones adecuadas para obtener un nuevo gel y su correspondiente sobrenadante (SN_{paso4}). La evaluación de la actividad enzimática mostró que este último contenía entre el 97-98 % de la actividad enzimática del RD_{paso3} , infiriéndose en consecuencia que el gel estaba prácticamente libre de PAP y en condiciones de ser reutilizado en un nuevo ciclo extractivo.

6.6 Conclusiones parciales

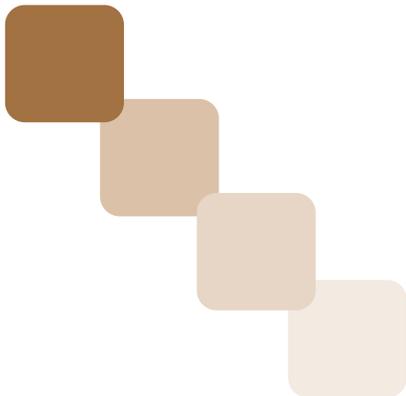
Las experiencias de reparto mostraron que el NaALG se comportó como un ligando de afinidad tanto para BR como para PAP, verificándose todas las condiciones requeridas a tal fin. En primer término, este polímero mostró un patrón de reparto desplazado hacia la fase rica en PEG de los SBAs seleccionados PEG/NaCit. Esta distribución asimétrica direccionó el reparto de ambas fitoproteasas hacia dicha fase, comportamiento que resultó dependiente de la concentración final de NaALG empleada en el SBA. En cantidades apropiadas del ligando, 0,10 y 0,30 %P/P para BR y PAP respectivamente, el rendimiento de ambas enzimas en FS se incrementó entre 2 y 5 veces. Se descartó que este efecto fuese consecuencia del cambio, inducido por el NaALG, en las composiciones de las fases de equilibrio, considerándose a la interacción enzima-NaALG como la principal responsable del comportamiento referido.

El estudio de la formación y redisolución de los geles de alginato en diferentes medios permitió definir las condiciones adecuadas para lograr la formación completa del gel y la mayor retención de enzima en el mismo.

Fue posible definir una estrategia de recuperación de BR y PAP a partir de sus respectivas fuentes combinando el reparto de afinidad con la precipitación (gelificación) del complejo enzima-ALG, sin embargo, los resultados fueron disímiles. En el caso de PAP se lograron R (%) y FPs satisfactorios, mejorándose significativamente la *performance* del reparto respecto de aquella obtenida empleando un SBA clásico, es decir, sin la adición del ligando. Para BR, los indicadores de desempeño de la estrategia combinada sólo resultaron adecuados en términos de rendimiento, pero no así en purificación. En este sentido, los SBAs clásicos PEG/NaCit se mostraron con una mayor selectividad frente a los diferentes componentes de los extractos de tallo de ananá logrando mayores factores de purificación y rendimientos comparables.



**7.
CONCLUSIONES
GENERALES**



7. CONCLUSIONES GENERALES

En los últimos años, tal como fue señalado en la introducción, el crecimiento sostenido en la utilización de enzimas, como catalizadores biológicos en diversos procesos industriales, ha marcado la necesidad de diseñar nuevos métodos que permitan obtenerlas en grandes cantidades, a bajos costos y de manera sustentable. En particular, la recuperación de las fitoproteasas bromelina y papaína reviste interés por dos motivos: la diversidad de industrias que las utilizan (cerveceras, lácteas, de la carne, del cuero, etc.), todas ellas muy desarrolladas en nuestro país, y, segundo, porque sus métodos de purificación, si bien son efectivos, son perjudiciales para el medio ambiente ya que comprenden el uso de solventes tóxicos o altas concentraciones de sales eutroficantes. Asimismo incluyen varios pasos cromatográficos que consumen tiempo y recursos.

En este marco, se planteó como objetivo general de este trabajo de tesis el diseño de estrategias extractivas de bromelina y papaína a partir de sus fuentes naturales, basadas en reparto de afinidad en sistemas bifásicos acuosos empleando alginato como macroligando polimérico. En la selección de esta como posible metodología de extracción, se tuvo en cuenta su sencillez, bajos costos y escalabilidad. Una característica adicional que se consideró fue la sustentabilidad, eligiendo a tal fin sistemas bifásicos acuosos formados por polietilenglicol y una sal de anión biodegradable (citrato sódico) y como macroligando de afinidad, alginato sódico, también biodegradable.

En el desarrollo de este trabajo se pretendió avanzar no sólo en la parte aplicada, sino también, en aspectos básicos del tema vinculados a las interacciones proteína-polímero, dado que éstas son responsables últimas de los indicadores de desempeño del proceso extractivo y determinan las estrategias a seguir para optimizarlos.

En relación a la interacción de las fitoproteasas con los polímeros de fase (polietilenglicoles) y con el polímero de afinidad (alginato) se apreciaron algunos comportamientos similares en bromelina y papaína y otros diferenciales, los que se detallan a continuación:

-Los polietilenglicoles de menores pesos moleculares (PEG600, PEG1000) produjeron las mayores modificaciones en las medidas espectroscópicas (fluorescencia, extinción de fluorescencia, dicroísmo circular) de ambas fitoproteasas reflejando

perturbaciones a nivel de estructura secundaria/terciaria de la proteína, consecuencia de la unión preferencial del polímero. En estos casos se observó una caída concomitante en la actividad enzimática frente a sustratos específicos, sugiriendo que los cambios estructurales estarían afectando directa o indirectamente el sitio activo de las enzimas. Este efecto se vio profundizado drásticamente al incrementarse los tiempos de incubación enzima-polímero, destacándose el caso de la bromelina y el PEG600, donde la pérdida de actividad alcanzó al 80-90%. Esto se observó también para PAP pero en menor medida (30-40%).

-Los polietilenglicoles más pesados (PEG2000, PEG4600, PEG8000) y, por ende, de mayor carácter hidrofóbico y volumen excluido produjeron, en cambio, perturbaciones en los espectros explicables por la disminución, causada por el polímero, en la polaridad del entorno de los residuos aminoacídicos expuestos y espectroscópicamente activos. No se evidenciaron cambios estructurales significativos en la mayoría de los casos o los mismos no afectaron al sitio activo de las fitoproteasas ya que la actividad enzimática en presencia de estos polímeros no se vio prácticamente afectada, aún luego de períodos de incubación de 3 horas.

-El alginato sódico, en muy bajas concentraciones (50 a 6000 veces inferiores a las del PEG) indujo en BR y PAP marcados cambios en sus comportamientos espectroscópicos, similares a los ocasionados por el PEG600 y compatibles con la unión preferencial del polímero a la proteína. También se observaron patrones atribuibles a la formación de microagregados siendo esto un primer indicio de la posible formación de complejos insolubles proteína-polímero. El estudio de las propiedades hidrodinámicas del alginato, en presencia de ambas fitoproteasas, aportó información complementaria, ya que permitió inferir cambios conformacionales del polímero ocasionados por las enzimas. Las variaciones significativas, observadas en el radio hidrodinámico y la viscosidad intrínseca, fueron asociadas a una pérdida de rigidez y mayor grado de compactación de la molécula de NaALG, considerándose derivadas de un fenómeno de neutralización/apantallamiento de sus cargas al interactuar con las proteínas. Las medidas calorimétricas corroboraron esta hipótesis, encontrándose que tanto BR como PAP se fijaban cooperativamente al NaALG mediante una interacción electrostática en la primera etapa de la unión (entálpicamente conducida) y una de naturaleza hidrofóbica (entrópicamente conducida), en la segunda. Es importante destacar que NaALG en este “rol de macroligando” evidenció mayor afinidad por PAP, hallándose valores de

constantes de equilibrio que duplicaron a las de BR tanto en la primera y como en la segunda etapa de fijación. En cuanto a la actividad enzimática en presencia de NaALG, no se apreciaron cambios para BR y sí un incremento notorio para PAP, sugiriendo en este caso que la interacción del NaALG con la proteína estaría afectando al sitio activo. Esto podría constituir una ventaja en el caso de que esta potenciación de la actividad de PAP ocurriera no sólo frente al sustrato sintético utilizado en este trabajo, sino también en los procesos industriales donde esta fitoproteasa es empleada.

La información precedente fue utilizada para seleccionar los sistemas bifásicos más adecuados para la extracción de BR y PAP y también para explicar el comportamiento diferencial de reparto de ambas enzimas.

El estudio de la distribución de BR y PAP en los SBAs formados por PEGs de diferentes PMs y citrato sódico con y sin agregado de NaALG, también se abordó desde un punto de vista básico ahondando en el análisis del mecanismo involucrado en el proceso y el efecto que provocó el NaALG en el reparto de las proteasas.

Pudo apreciarse que tanto BR como PAP siguieron en los SBAs PEG/NaCit el comportamiento típico de otras proteínas en sistemas polímero/sal o polímero/polímero. Esto es, ambas enzimas sufrieron una disminución de su K_r al aumentar el tamaño del PEG. Este fenómeno se explica por el incremento del efecto de exclusión que ejerce el PEG (al aumentar su PM) sobre la proteína que se reparte, direccionándola hacia la FI, pobre en el polímero. Al comparar ambas enzimas, se apreció que BR se distribuía más preferencialmente hacia la FS que PAP en todos los sistemas, con valores de $K_{rs} > 1$ en los SBAs formados por PEG600 y PEG1000 y $K_{rs} < 1$, para los restantes PEGs. En el caso de PAP, dichos coeficientes fueron inferiores a 1 en todos los SBAs. La caracterización de la termodinámica del equilibrio de reparto junto con el análisis de la superficie expuesta por los diferentes residuos aminoacídicos en cada proteína permitió plantear un mecanismo que justificaba tales diferencias. Se postuló que el mayor área superficial expuesta (ASA) de los Trp, Lys, Arg e His en BR le daban mayores chances a ésta, en relación a PAP, de interactuar con los PEGs de menor tamaño a través de interacciones de puentes de hidrógeno, resultando de esta mayor interacción en un desplazamiento de su equilibrio de reparto hacia la FS.

-Para el estudio del efecto del NaALG sobre el equilibrio de reparto, se tuvieron en cuenta las características diferenciales encontradas para las interacciones proteína-

PEG, dependientes del tamaño del polímero de cadena flexible, seleccionándose sólo los sistemas bifásicos formados por los PEGs de mayor tamaño por la menor afectación que éstos produjeron sobre la estructura-función de las enzimas de interés. Pudo verse un aumento en los valores de K_r de ambas enzimas en los sistemas PEG+NaALG/NaCit. Los cambios relativos más significativos fueron observados para PAP en concordancia con sus mayores valores de constante de equilibrio de fijación en relación a BR. Estos incrementos de K_r resultaron dependientes de la concentración de NaALG adicionada al SBA, verificándose un comportamiento similar al predicho por la ecuación de Flanagan y Barondes (ecuación 1.8) para el reparto de afinidad. Nuevamente PAP se mostró más sensible a los agregados de NaALG al sistema, logrando quintuplicar su valor de K_r respecto de aquel en ausencia del ligando.

Finalmente, desde un punto de vista exclusivamente práctico, se aplicaron estrategias extractivas de BR y PAP a partir de sus fuentes naturales, utilizando SBAs PEG/NaCit con y sin agregado de NaALG. Se observaron claras diferencias en los resultados obtenidos para cada fitoproteasa, los que se detallarán a continuación.

-En la extracción de BR a partir de extractos de tallo de ananá, se apreció una capacidad de los SBAs PEG/NaCit formados por PEGs de menores PMs (PEG600-PEG1000) para recuperar mayoritariamente la enzima en la FS (60 %) con bajos valores de FP ($\cong 1,50$). Estos SBAs fueron desestimados para la extracción de BR en virtud de los magros indicadores de desempeño y de la pérdida de actividad que experimenta la BR al ser incubada con los PEGs de menor tamaño.

Por su parte los SBAs formados por los PEGs de mayor PM (PEG2000, PEG4600 y PEG8000) permitieron recuperar entre el 80 y 90% de la BR en la fase salina y purificarla entre 2 y 3 veces, mostrándose como los sistemas más apropiados para la recuperación primaria de la enzima. Entre ellos se destaca el sistema formado por el PEG2000/NaCit por exhibir los mayores valores de R y FP (89,46% y 2,49, respectivamente). Debe tenerse presente que al ser recuperada la enzima en la FI, con baja concentración de PEG, la fase contraria, rica en el mismo, podría reciclarse contribuyendo a la sustentabilidad del proceso. Además, los efectos eventuales que el PEG2000 podría ejercer disminuyendo la actividad enzimática (similar al PEG600) se verán minimizados por el bajo nivel de este polímero en la mencionada fase. Como desventaja se advierte el elevado contenido azúcares reductores, presentes originalmente

en el extracto de tallo y que se reparten también casi unidireccionalmente hacia la FI. En ese caso se presenta como alternativa para superar esta condición, la ultrafiltración de la muestra.

-Se ensayó como variante extractiva de BR, potencialmente superadora, la utilización de sistemas bifásicos PEG8000+NaALG/NaCit seguida de la precipitación de afinidad del NaALG. Sin embargo, los indicadores de desempeño del proceso global mostraron que si bien el rendimiento ascendió al 79,3 % en FS, el FP sólo alcanzó un valor de 1,51. En este caso, si bien el NaALG ejerció claramente un efecto direccionador de la BR hacia la FS, esto no fue selectivo y se reflejó en una escasa purificación de la muestra.

-En la extracción de PAP a partir de látex de papaya utilizando diferentes sistemas PEG/NaCit, se observaron los mayores rendimientos (50-80 %) en la FI de todos los SBAs en concordancia con los valores de K_r inferiores a la unidad, no lográndose purificar significativamente la enzima en ningún caso ($FP \approx 1,5$). Complementariamente, en FS, se observaron muy bajos rendimientos (20-40 %) y purificaciones ligeramente superiores a aquellas observadas en la respectiva FI, lográndose un indicador excepcionalmente alto ($FP = 2,5$) en la fase salina del sistema formado por PEG8000. Aprovechando esta condición, se adicionó NaALG como macroligando de afinidad y se reprodujo una estrategia similar a la aplicada en la extracción de BR. Respecto de los indicadores de desempeño del reparto, se observó un notorio incremento en el rendimiento de PAP ya que este ascendió desde 21,9% (en SBAs PEG8000/NaCit) hasta 84,8% (SBAs PEG8000+NaALG/NaCit), demostrando el efecto direccionador del macroligando. Sin embargo, el FP de esta etapa disminuyó de 2,48 a 2,01. Esto estaría sugiriendo nuevamente que este efecto por parte del NaALG se ejercería también sobre otras proteínas presentes en el sistema. Los pasos posteriores al reparto, de precipitación y redisolución del gel de NaALG resultaron en un rendimiento satisfactorio del 72 % y un FP de 2,41 para el proceso global. Este valor de FP podría considerarse insuficiente si se considera que la PAP representa aproximadamente el 8% del contenido total de proteínas presentes en el látex. Sin embargo, si consideramos que otras proteasas como la quimopapaína, la glicil-endopeptidasa y la caricaína representan el 40% del total de proteína del látex y también contribuyen a las medidas de actividad frente al sustrato sintético utilizado (BAPNA), es razonable pensar que el producto final extraído no contiene sólo PAP sino otras cisteín proteasas. Esta mezcla, conocida

comercialmente como papaína refinada, es muy utilizada para propósitos industriales. Si se requiriera esta enzima para fines médicos/farmacológicos, sería necesario recurrir a metodologías de purificación más selectivas.

-A modo de conclusión final se puede afirmar que las estrategias basadas en la extracción líquido-líquido con “sistemas bifásicos acuosos preformados de polietilenglicol y citrato de sodio” y “reparto de afinidad usando alginato como macroligando” resultan satisfactorias para la recuperación de bromelina y papaína a partir de sus fuentes naturales. Las mismas permiten alcanzar valores de rendimiento y factor de purificación comparables a los de otras estrategias de recuperación primaria, y reúnen además las ventajas dadas por su sencillez, bajos costos, escalabilidad y sustentabilidad.

8.
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, N. L., Blankschtein, D. y Hatton, T. A. (1991). "Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. 1. Novel physical pictures and a scaling thermodynamic formulation." *Macromolecules*, 24 (15): 4334-4348.
- Aehle, W. (2007). "Enzymes in industry: production and applications." 3° Edition, John Wiley & Sons, Germany.
- Albee, K. L., Bernasconi, R. J. y Edmunds, T. (1997). "Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases." *Biochemical Journal*, 327 (1): 199-202.
- Albertsson, P. A. (1986). "Partition of cell particles and macromolecules." 3° Edition, Wiley-Interscience, New York.
- Arroyo, M. (1998). "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones." *Ars Pharmaceutica*, 39: 21-37.
- Arroyo-Reyna, A., Hernandez-Arana, A. y Arreguin-Espinosa, R. (1994). "Circular dichroism of stem bromelain: a third spectral class within the family of cysteine proteinases." *Biochemical Journal*, 300 (1): 107-110.
- Azarkan, M., El Moussaoui, A., Van Wuytswinkel, D., Dehon, G. y Looze, Y. (2003). "Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*." *Journal of Chromatography B*, 790 (1): 229-238.
- Babu, B. R., Rastogi, N. y Raghavarao, K. (2008). "Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system." *Chemical Engineering and Processing: process intensification*, 47 (1): 83-89.
- Banwell, C. y McCash, E. M. (1972). "Fundamentals of molecular spectroscopy." McGraw Hill, England.
- Barrett, A. J. (1994). "Classification of peptidases." *Methods in Enzymology*, 244: 1-15.
- Barrett, A. J., Woessner, J. F. y Rawlings, N. D. (2012). "Handbook of proteolytic enzymes." 2° Edition, Vol 1, Elsevier, England.
- Baskir, J. N., Hatton, T. A. y Suter, U. W. (1989). "Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems." *Biotechnology and Bioengineering*, 34 (4): 541-558.
- Beeley, J., Yip, H. y Stevenson, A. (2000). "Conservative dentistry: chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments." *British Dental Journal*, 188 (8): 427-430.
- Beijernick, M. (1896). "Original mitteilung uber eine eigentumlichkeit der loslichen starke." *Central Bakteriologie, Parasitenkunde Infektioskrankheiten*, 22: 699-701.
- Berggren, K., Wolf, A., Asenjo, J. A., Andrews, B. A. y Tjerneld, F. (2002). "The surface exposed amino acid residues of monomeric proteins determine the partitioning in aqueous two-phase systems." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1596 (2): 253-268.
- Burstein, E., Vedenkina, N. y Ivkova, M. (1973). "Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules." *Photochemistry and Photobiology*, 18 (4): 263-279.

- Buttazzoni de Cozzarin, M. S. y Caffini, N. O. (1982). "Panorama actual de las enzimas proteolíticas vegetales." *Acta Farmacéutica Bonaerense* 1.
- Camerini-Otero, R. D. y Day, L. A. (1978). "The wavelength dependence of the turbidity of solutions of macromolecules." *Biopolymers*, 17 (9): 2241-2249.
- Castell, J., Friedrich, G., Kuhn, C. y Poppe, G. E. (1997). "Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273 (1): G139-G146.
- Castellanos, Ó., Ramírez, D. C. y Montañez, V. M. (2006). "Perspectiva en el desarrollo de las enzimas industriales a partir de la inteligencia tecnológica." *Ingeniería e Investigación*, 26 (2): 52-67.
- Caygill, J. (1979). "Sulphydryl plant proteases." *Enzyme and Microbial Technology*, 1 (4): 233-242.
- Céccoli, G., Panigo, E. S., Gariglio, N., Favaro, J. C. y Bouzo, C. A. (2013). "Fruit yield and growth parameters of several *Carica papaya* L. genotypes in a temperate climate." *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina*, 45 (2): 299-310.
- Chandrasekhar, J. y Raghavarao, K. (2015). "Separation and Concentration of Anthocyanins from Jamun: An Integrated Process." *Chemical Engineering Communications*, 202 (10): 1368-1379.
- Chen, L. y Tianqing, L. (2008). "Interaction behaviors between chitosan and hemoglobin." *International Journal of Biological Macromolecules*, 42 (5): 441-446.
- Chethana, S., Nayak, C. A. y Raghavarao, K. (2007). "Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains." *Journal of Food Engineering*, 81 (4): 679-687.
- Chobotova, K., Vernallis, A. B. y Majid, F. A. A. (2010). "Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: current evidence and perspectives." *Cancer Letters*, 290 (2): 148-156.
- Cohen, L. W., Coghlan, V. M. y Dihel, L. C. (1986). "Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA." *Gene*, 48 (2): 219-227.
- Cooper, C., Dubin, P., Kayitmazer, A. y Turksen, S. (2005). "Polyelectrolyte-protein complexes." *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10 (1): 52-78.
- Cowan, R. y Whittaker, R. G. (1989). "Hydrophobicity indices for amino acid residues as determined by high-performance liquid chromatography." *Peptide Research*, 3 (2): 75-80.
- de Roos, A., Grassin, C., Herweijer, M., Kragh, K. M., Poulsen, C. H., Soe, J. B., Sorensen, J. F. y Wilms, J. (2004). "Industrial enzymes: enzymes in food applications." *De Enzymes in Industry: Production and Applications*, 2º Edition, Chapter 5, 101-155.
- Deitrick, R. (1965). "Oral proteolytic enzymes in the treatment of athletic injuries: a double-blind study." *Pennsylvania Medicine*, 68 (10): 35.
- Denizli, A. y Pişkin, E. (2001). "Dye-ligand affinity systems." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49 (1): 391-416.

- Devakate, R., Patil, V., Waje, S. y Thorat, B. (2009). "Purification and drying of bromelain." *Separation and Purification Technology*, 64 (3): 259-264.
- Diamond, A. D. y Hsu, J. T. (1990). "Protein partitioning in PEG/dextran aqueous two-phase systems." *AIChE Journal*, 36 (7): 1017-1024.
- Doko, M., Bassani, V., Casadebaig, J., Cavailles, L. y Jacob, M. (1991). "Preparation of proteolytic enzyme extracts from *Ananas comosus* L., Merr. fruit juice using semipermeable membrane, ammonium sulfate extraction, centrifugation and freeze-drying processes." *International Journal of Pharmaceutics*, 76 (3): 199-206.
- Draget, K. I., Smidsrød, O. y Skjåk-Bræk, G. (2005). "Alginates from algae." *De Biopolymers Online*, Wiley Online Library.
- Duarte, S. P., Fortes, A. G., Prazeres, D. M. y Marcos, J. C. (2007). "Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step aqueous two-phase extraction process." *Journal of Chromatography A*, 1164 (1): 105-112.
- Dubey, V. K., Pande, M., Singh, B. K. y Jagannadham, M. V. (2007). "Papain-like proteases: Applications of their inhibitors." *African Journal of Biotechnology*, 6 (9).
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. y Smith, F. (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical Chemistry*, 28 (3): 350-356.
- Duy, C. y Fitter, J. (2006). "How aggregation and conformational scrambling of unfolded states govern fluorescence emission spectra." *Biophysical Journal*, 90 (10): 3704-3711.
- Edwin, F. y Jagannadham, M. (2000). "Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1479 (1): 69-82.
- Eftink, M. R. y Ghiron, C. A. (1981). "Fluorescence quenching studies with proteins." *Analytical Biochemistry*, 114 (2): 199-227.
- Escalona, M. H., Rubio, G. Y. L. y Padilla, A. G. (2005). "Evaluación de derivados carboximetilados del alginato de sodio como superabsorbente." *Revista Cubana de Química*, 17 (3): 239-240.
- Feijoo-Siota, L. y Villa, T. G. (2011). "Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications." *Food and Bioprocess Technology*, 4 (6): 1066-1088.
- Fernández, M., Fragoso, A., Cao, R. y Villalonga, R. (2003). "Improved functional properties of trypsin modified by monosubstituted amino- β -cyclodextrins." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21 (3): 133-141.
- Flanagan, S. D. y Barondes, S. H. (1975). "Affinity partitioning. A method for purification of proteins using specific polymer-ligands in aqueous polymer two-phase systems." *Journal of Biological Chemistry*, 250 (4): 1484-1489.
- Fu, S., Thacker, A., Sperger, D. M., Boni, R. L., Velankar, S., Munson, E. J. y Block, L. H. (2010). "Rheological evaluation of inter-grade and inter-batch variability of sodium alginate." *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, 11 (4): 1662-1674.
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I., Nishinari, K. y Phillips, G. O. (2009). "Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system

- during gelation in relation to supermolecular structures and Ca^{2+} binding." *Food Hydrocolloids*, 23 (7): 1746-1755.
- Gautam, S., Mishra, S., Dash, V., Goyal, A. K. y Rath, G. (2010). "Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant." *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34: 67-76.
 - Geddes, C. D. (2001). "Optical halide sensing using fluorescence quenching: theory, simulations and applications-a review." *Measurement Science and Technology*, 12 (9): 53-88.
 - Gerard, G. (1972). "Anti-cancer therapy with bromelain." *Agressologie*, 13: 261-274.
 - Ghosh, S. (2005). "Physicochemical and conformational studies of papain/sodium dodecyl sulfate system in aqueous medium." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 264 (1): 6-16.
 - Gildberg, A. y Øverbø, K. (1990). "Purification and characterization of pancreatic elastase from Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 97 (4): 775-782.
 - González-Tello, P., Camacho, F., Blázquez, G. y Alarcon, F. J. (1996). "Liquid-liquid equilibrium in the system poly (ethylene glycol) + MgSO_4 + H_2O at 298 K." *Journal of Chemical & Engineering Data*, 41 (6): 1333-1336.
 - Graber, T. A., Taboada, M. E., Cartón, A. y Bolado, S. (2000). "Liquid-liquid equilibrium of the poly (ethylene glycol) + sodium nitrate + water system at 298.15 K." *Journal of Chemical & Engineering Data*, 45 (2): 182-184.
 - Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. y Thom, D. (1973). "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model." *FEBS Letters*, 32 (1): 195-198.
 - Guan, Y., Lilley, T. H. y Treffry, T. E. (1993). "Theory of phase equilibria for multicomponent aqueous solutions: applications to aqueous polymer two-phase systems." *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 89 (24): 4283-4298.
 - Hale, L. P., Greer, P. K., Trinh, C. T. y James, C. L. (2005). "Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations." *International Immunopharmacology*, 5 (4): 783-793.
 - Harrach, T., Eckert, K., Maurer, H. R., Machleidt, I., Machleidt, W. y Nuck, R. (1998). "Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase." *Journal of Protein Chemistry*, 17 (4): 351-361.
 - Harris, D. P., Andrews, A., Wright, G., Pyle, D. y Asenjo, J. (1998). "The application of aqueous two-phase systems to the purification of pharmaceutical proteins from transgenic sheep milk." *Bioseparation*, 7 (1): 31-37.
 - Harris, J. M. (2013). "Poly (ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications." Springer Science & Business Media, New York.
 - Hartley, B. (1960). "Proteolytic enzymes." *Annual Review of Biochemistry*, 29 (1): 45-72.
 - Hašek, J. (2006). "Poly (ethylene glycol) interactions with proteins." *Zeitschrift für Kristallographie*, 23: 613-618.

- Hatti-Kaul, R. (2000). "Aqueous two-phase systems: methods and protocols." Humana Press, New Jersey.
- Hilbrig, F. y Freitag, R. (2003). "Protein purification by affinity precipitation." *Journal of Chromatography B*, 790 (1): 79-90.
- Hope, J., Shearman, M. S., Baxter, H. C., Chong, A., Kelly, S. M. y Price, N. C. (1996). "Cytotoxicity of prion protein peptide (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) differs in mechanism from the cytotoxic activity of the alzheimer's disease amyloid peptide, A β 25-35." *Neurodegeneration*, 5 (1): 1-11.
- Huddleston, J., Veide, A., Köhler, K., Flanagan, J., Enfors, S.-O. y Lyddiatt, A. (1991). "The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems." *Trends in biotechnology* 9 (1): 381-388.
- Huet, J., Looze, Y., Bartik, K., Raussens, V., Wintjens, R. y Boussard, P. (2006). "Structural characterization of the papaya cysteine proteinases at low pH." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341 (2): 620-626.
- Illanes, A. (2008). "Enzyme biocatalysis: principles and applications." Springer Science & Business Media, New York.
- Jegannathan, K. R. y Nielsen, P. H. (2013). "Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review." *Journal of Cleaner Production*, 42: 228-240.
- Johannes, T., Simurdiak, M. R. y Zhao, H. (2006). "Biocatalysis." *Encyclopedia of Chemical Processing*: 101-110.
- Johannes, T. W. y Zhao, H. (2006). "Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways." *Current Opinion in Microbiology*, 9 (3): 261-267.
- Johansson, G. y Andersson, M. (1984). "Parameters determining affinity partitioning of yeast enzymes using polymer-bound triazine dye ligands." *Journal of Chromatography A*, 303: 39-51.
- Johansson, G., Kopperschläger, G. y Albertsson, P. Å. (1983). "Affinity partitioning of phosphofructokinase from baker's yeast using polymer-bound cibacron blue F3G-A." *European Journal of Biochemistry*, 131 (3): 589-594.
- Jothi, J. S., Islam, M., Islam, M. S., Rahman, M. R. T. y Akther, S. (2014). "Development and shelf-life prediction of pineapple (*Ananas comosus*) preserve and candy." *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 10 (1): 77-82.
- Kalra, N., Bhui, K., Roy, P., Srivastava, S., George, J., Prasad, S. y Shukla, Y. (2008). "Regulation of p53, nuclear factor κ B and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 226 (1): 30-37.
- Kaul, A. (2000). "The phase diagram." *De Aqueous two-phase systems: methods and protocols, Methods in Biotechnology*, (11): 11-21, Springer.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. y Price, N. C. (2005). "How to study proteins by circular dichroism." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751 (2): 119-139.
- Kelly, S. M. y Price, N. C. (2000). "The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function." *Current Protein and Peptide Science*, 1 (4): 349-384.

- Ketnawa, S., Rawdkuen, S. y Chaiwut, P. (2010). "Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar." *Biochemical Engineering Journal*, 52 (2): 205-211.
- Ketnawa, S., Sai-Ut, S., Theppakorn, T., Chaiwut, P. y Rawdkuen, S. (2009). "Partitioning of bromelain from pineapple peel (Nang Lae cultv.) by aqueous two phase system." *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2 (4): 457-468.
- Khanna, N. y Panda, P. (2007). "Effect of papain on tenderization and functional properties of spent hen meat cuts." *Indian Journal of Animal Research*, 41 (1): 55-58.
- Kimmel, J. R. (1954). "Crystalline papain." Doctoral dissertation, University of Utah.
- Koh, J., Kang, S.-M., Kim, S.-J., Cha, M.-K. y Kwon, Y.-J. (2006). "Effect of pineapple protease on the characteristics of protein fibers." *Fibers and Polymers*, 7 (2): 180-185.
- Kumar, A. y Singh, S. (2013). "Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications." *Critical Reviews in Biotechnology*, 33 (4): 365-378.
- Kumar, A., Srivastava, A., Galaev, I. Y. y Mattiasson, B. (2007). "Smart polymers: physical forms and bioengineering applications." *Progress in Polymer Science*, 32 (10): 1205-1237.
- Lakowicz, J. R. (2013). "Principles of fluorescence spectroscopy." 2° Edition, Springer Science & Business Media, New York.
- Lee, J. C. y Lee, L. (1981). "Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols." *Journal of Biological Chemistry*, 256 (2): 625-631.
- Ley, C. M., Tsiami, A., Ni, Q. y Robinson, N. (2011). "A review of the use of bromelain in cardiovascular diseases." *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 9 (7): 702-710.
- Lima, N. y Mota, M. (2003). "Biotecnologia: fundamentos e aplicações." Lisboa: Lidel: 368-373.
- Lopes, M. C., Mascarini, R. C., da Silva, B. M. C. G., Flório, F. M. y Basting, R. T. (2007). "Effect of a papain-based gel for chemomechanical caries removal on dentin shear bond strength." *Journal of Dentistry for Children*, 74 (2): 93-97.
- Malpiedi, L. P., Picó, G. y Nerli, B. (2008). "Features of partitioning pattern of two pancreatic enzymatic precursors: trypsinogen and chymotrypsinogen in polyethyleneglycol–sodium citrate aqueous biphasic systems." *Journal of Chromatography B*, 870 (1): 1-7.
- Malpiedi, L. P., Picó, G. A., Loh, W. y Nerli, B. B. (2010). "Role of polymer–protein interaction on partitioning pattern of bovine pancreatic trypsinogen and alpha-chymotrypsinogen in polyethyleneglycol/sodium tartrate aqueous two-phase systems." *Journal of Chromatography B*, 878 (21): 1831-1836.
- Marcos, J., Fonseca, L., Ramalho, M. y Cabral, J. (1998). "Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase volume ratio in poly (ethylene glycol)–sodium citrate aqueous two-phase systems." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711 (1): 295-299.
- Marquardt, D. W. (1963). "An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters." *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, 11 (2): 431-441.

- Maurer, H. (2001). "Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58 (9): 1234-1245.
- McHugh, D. J. (1987). "Production, properties and uses of alginates." *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds*. FAO. Fisheries Technical Papers, 288: 58-115.
- Merchuk, J. C., Andrews, B. A. y Asenjo, J. A. (1998). "Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711 (1): 285-293.
- Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426-428.
- Mistry, S. L., Kaul, A., Merchuk, J. y Asenjo, J. (1996). "Mathematical modelling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction." *Journal of Chromatography A*, 741 (2): 151-163.
- Mitchel, R. E., Chaiken, I. M. y Smith, E. L. (1970). "The complete amino acid sequence of papain ADDITIONS AND CORRECTIONS." *Journal of Biological Chemistry*, 245 (14): 3485-3492.
- Mondal, K., Mehta, P. y Gupta, M. N. (2004). "Affinity precipitation of *Aspergillus niger* pectinase by microwave-treated alginate." *Protein expression and purification*, 33 (1): 104-109.
- Mondal, K. y Gupta, M. N. (2006). "The affinity concept in bioseparation: evolving paradigms and expanding range of applications." *Biomolecular Engineering*, 23 (2): 59-76.
- Monti, R., Basilio, C. A., Trevisan, H. C. y Contiero, J. (2000). "Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*." *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43 (5): 501-507.
- Muhammad, N., Kryuchkova, N., Dworeck, T., Rodríguez-Ropero, F. y Fioroni, M. (2013). "Enhanced EGFP fluorescence emission in presence of PEG aqueous solutions and PIB₁₀₀₀-PEG₆₀₀₀-PIB₁₀₀₀ copolymer vesicles." *BioMed Research International*.
- Murachi, T. y Takahashi, N. (1970). "Structure and function of stem bromelain." *Structurefunction relationships of proteolytic enzymes*. Munks-gaard, Copenhagen, Denmark: 298-309.
- Napper, A., Bennett, S., Borowski, M., Holdridge, M., Leonard, M., Rogers, E., Duan, Y., Laursen, R., Reinhold, B. y Shames, S. (1994). "Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain." *Biochemical Journal*, 301 (3): 727-735.
- Nitsawang, S., Hatti-Kaul, R. y Kanasawud, P. (2006). "Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation." *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (5): 1103-1107.
- Ota, S., Moore, S. y Stein, W. H. (1964). "Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelains." *Biochemistry*, 3 (2): 180-185.
- Pace, C. N. y Scholtz, J. M. (1997). "Measuring the conformational stability of a protein." *Protein Structure: A Practical Approach*, 2: 299-321.

- Pasin, B. L., Azón, C. y Garriga, A. (2012). "Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones." *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3 (1): 130-151.
- Pessoa Junior, A. y Kilikian, B. V. (2005). "Purificação de produtos biotecnológicos. Purificação de Produtos Biotecnológicos, Manole.
- Piva, E., Ogliari, F. A., Moraes, R. R. d., Corá, F., Henn, S. y Correr-Sobrinho, L. (2008). "Papain-based gel for biochemical caries removal: influence on microtensile bond strength to dentin." *Brazilian Oral Research*, 22 (4): 364-370.
- Pizzorno, J. E. y Murray, M. T. (1999). "Textbook of Natural Medicine." 2, Churchill Livingstone.
- Rabelo, A. P. B., Tambourgi, E. B. y Pessoa, A. (2004). "Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers." *Journal of Chromatography B*, 807 (1): 61-68.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. y Deshpande, V. V. (1998). "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 597-635.
- Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. (1993). "Evolutionary families of peptidases." *Biochemical Journal*, 290 (1): 205-218.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. y Bateman, A. (2010). "MEROPS: the peptidase database." *Nucleic Acids Research*, 38 (suppl 1): D227-D233.
- Reed, J. y Kinzel, V. (1984). "Near-and far-ultraviolet circular dichroism of the catalytic subunit of adenosine cyclic 5'-monophosphate dependent protein kinase." *Biochemistry*, 23 (7): 1357-1362.
- Rito-Palomares, M. y Cueto, L. (2000). "Effect of biological suspensions on the position of the binodal curve in aqueous two-phase systems." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743 (1): 5-12.
- Ritonja, A., Rowan, A. D., Buttle, D. J., Rawlings, N. D., Turk, V. y Barrett, A. J. (1989). "Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin." *FEBS Letters*, 247 (2): 419-424.
- Rocha, M. V., Romanini, D., Nerli, B. B. y Tubio, G. (2012). "Pancreatic serine protease extraction by affinity partition using a free triazine dye." *International Journal of Biological Macromolecules*, 50 (2): 303-309.
- Rogers, R. D. y Eiteman, M. A. (1995). "Hydrophobic and charge effects in the partitioning of solutes in aqueous two-phase systems." En *Aqueous biphasic separations*, Chapter 1, 31-48, Springer.
- Ross, K. C. y Zhang, C. (2010). "Separation of recombinant β -glucuronidase from transgenic tobacco by aqueous two-phase extraction." *Biochemical Engineering Journal*, 49 (3): 343-350.
- Rowan, A. D. y Buttle, D. J. (1994). "Pineapple cysteine endopeptidases." *Methods in Enzymology*, 244: 555-568.
- Rowan, A. D., Buttle, D. J. y Barrett, A. J. (1990). "The cysteine proteinases of the pineapple plant." *Biochemical Journal*, 266 (3): 869.

- Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J., Aguilar, O. y Rito-Palomares, M. (2012). "Aqueous two-phase affinity partitioning systems: current applications and trends." *Journal of Chromatography A*, 1244: 1-13.
- Sadana, A. (1997). "Bioseparations of Proteins: Unfolding/Folding and Validations." *De Separation Science and Technology*, Vol 1, Academic Press, California.
- Senstad, C. y Mattiasson, B. (1989). "Purification of wheat germ agglutinin using affinity flocculation with chitosan and a subsequent centrifugation or flotation step." *Biotechnology and Bioengineering*, 34 (3): 387-393.
- Shrake, A. y Rupley, J. (1973). "Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin." *Journal of Molecular Biology*, 79 (2): 351-371.
- Silverstein, R. M. (1974). "The assay of the bromelains using N α -CBZ-l-lysine p-nitrophenyl ester and N-CBZ-glycine p-nitrophenyl ester as substrates." *Analytical Biochemistry*, 62 (2): 478-484.
- Sox, H. C. y Huth, E. J. (2009). "Landmark Papers in Internal Medicine: The First 80 Years of *Annals of Internal Medicine*." ACP Press, Philadelphia.
- Sreerama, N. (2016). "A Software Package for Analyzing Protein CD Spectra." Recuperado de [http://sites.bmb.colostate.edu/sreeram/CDPro/\(08/2012\)](http://sites.bmb.colostate.edu/sreeram/CDPro/(08/2012)).
- Street, G. (1994). "Highly selective separations in biotechnology." Springer.
- Suh, H.-J., Lee, H., Cho, H.-Y. y Yang, H.-C. (1992). "Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple." *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 35 (4): 300-307.
- Sumant, O. (2016). "World Enzymes Market - Opportunities and Forecasts, 2014 - 2020." Recuperado de [https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market\(06/2016\)](https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market(06/2016)).
- Sumantha, A., Larroche, C. y Pandey, A. (2006). "Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective." *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2): 211.
- Tanford, C. (1961). "Physical chemistry of macromolecules." Wiley.
- Tejedor, M. C., Delgado, C., Grupeli, M. y Luque, J. (1992). "Affinity partitioning of erythrocytic phosphofructokinase in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol)-bound Cibacron Blue influence of pH, ionic strength and substrates/effectors." *Journal of Chromatography A*, 589 (1): 127-134.
- Teotia, S. y Gupta, M. (2001). "Reversibly soluble macroaffinity ligand in aqueous two-phase separation of enzymes." *Journal of Chromatography A*, 923 (1): 275-280.
- Teotia, S., Lata, R. y Gupta, M. (2001). "Free polymeric bioligands in aqueous two-phase affinity extractions of microbial xylanases and pullulanase." *Protein Expression and Purification*, 22 (3): 484-488.
- Teotia, S., Lata, R., Khare, S. y Gupta, M. (2001). "One-step purification of glucoamylase by affinity precipitation with alginate." *Journal of Molecular Recognition*, 14 (5): 295-299.
- Teotia, S. y Gupta, M. (2004). "Purification of phospholipase D by two-phase affinity extraction." *Journal of Chromatography A*, 1025 (2): 297-301.

- Teotia, S., Lata, R. y Gupta, M. (2004). "Chitosan as a macroaffinity ligand: purification of chitinases by affinity precipitation and aqueous two-phase extractions." *Journal of Chromatography A*, 1052 (1): 85-91.
- Teotia, S., Mondal, K. y Gupta, M. (2006). "Integration of affinity precipitation with partitioning methods for bioseparation of chitin binding lectins." *Food and Bioproducts Processing*, 84 (1): 37-43.
- Timasheff, S. N. (1993). "The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?" *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22 (1): 67-97.
- Tochi, B. N., Wang, Z., Xu, S.-Y. y Zhang, W. (2008). "Therapeutic application of pineapple protease (bromelain): a review." *Pakistan Journal of Nutrition*, 7 (4): 513-520.
- Tsodikov, O. V. R., M Thomas. Sergeev, Yuri V (2002). "Novel computer program for fast exact calculation of accessible and molecular surface areas and average surface curvature." *Journal of Computational Chemistry*, 23 (6): 600-609.
- Tubío, G., Pellegrini, L., Nerli, B. B. y Picó, G. A. (2006). "Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycols) of different molecular weight and sodium citrate." *Journal of Chemical & Engineering Data*, 51 (1): 209-212.
- Tubio, G., Picó, G. A. y Nerli, B. B. (2009). "Extraction of trypsin from bovine pancreas by applying polyethyleneglycol/sodium citrate aqueous two-phase systems." *Journal of Chromatography B*, 877 (3): 115-120.
- van Beilen, J. B. y Li, Z. (2002). "Enzyme technology: an overview." *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (4): 338-344.
- Vold, I. M. N., Kristiansen, K. A. y Christensen, B. E. (2006). "A study of the chain stiffness and extension of alginates, in vitro epimerized alginates, and periodate-oxidized alginates using size-exclusion chromatography combined with light scattering and viscosity detectors." *Biomacromolecules*, 7 (7): 2136-2146.
- Walsh, G. (2002). "Proteins: biochemistry and biotechnology." John Wiley & Sons, England.
- Walter, H. y Johansson, G. (1986). "Partitioning in aqueous two-phase systems: an overview." *Analytical biochemistry* 155(2): 215-242.
- Walter, H., Johansson, G. y Brooks, D. E. (1991). "Partitioning in aqueous two-phase systems: recent results." *Analytical Biochemistry*, 197 (1): 1-18.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941). "Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase." *Naturwissenschaften*, 29 (39): 589-590.
- Wharton, C. W. (1974). "The structure and mechanism of stem bromelain. Evaluation of the homogeneity of purified stem bromelain, determination of the molecular weight and kinetic analysis of the bromelain-catalysed hydrolysis of N-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-serine methyl ester." *Biochemical Journal*, 143 (3): 575-586.
- Whitehurst, R. J. y Van Oort, M. (2010). "Enzymes in food technology." 2° Edition, Wiley Online Library.
- Xu, Y., Vitolo, M., Albuquerque, C. N. y Pessoa, A. (2002). "Affinity partitioning of glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in aqueous two-phase systems with free triazine dye ligands." *Journal of Chromatography B*, 780 (1): 53-60.

- Yang, J., Chen, S. y Fang, Y. (2009). "Viscosity study of interactions between sodium alginate and CTAB in dilute solutions at different pH values." *Carbohydrate Polymers*, 75 (2): 333-337.
- Yogiraj, V., Goyal, P. K., Chauhan, C. S., Goyal, A. y Vyas, B. (2014). "Carica papaya Linn: an overview." *International Journal of Herbal Medicine*, 2 (5): 01-08.
- Zaslavsky, B. Y. (1992). "Bioanalytical applications of partitioning in aqueous polymer two-phase systems." *Analytical Chemistry*, 64 (15): 765A-773A.
- Zaslavsky, B. Y. (1994). "Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications." CRC Press.
- Zaslavsky, B. Y. y Huddleston, J. (1995). "Aqueous two-phase partitioning." *Trends in Biotechnology*, 13 (8): 311-311.
- Zeng, J., Dunlop, R. A., Rodgers, K. J. y Davies, M. J. (2006). "Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols." *Biochemical Journal*, 398 (2): 197-206.
- Zhao, Y., Li, F., Carvajal, M. T. y Harris, M. T. (2009). "Interactions between bovine serum albumin and alginate: an evaluation of alginate as protein carrier." *Journal of Colloid and Interface Science*, 332 (2): 345-353.
- Zhong, D., Huang, X., Yang, H. y Cheng, R. (2010). "New insights into viscosity abnormality of sodium alginate aqueous solution." *Carbohydrate Polymers*, 81 (4): 948-952.