

Caracterización de Propiedades y Purificación Parcial de Extractos Proteolíticos de *Bromelia serra*

Área del Conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas

Becario/a: GÓMEZ HERRERA, Melanie Desirée

Director/a: AVANZA, Maria Victoria- ALAYÓN LUACES, Paula

Facultad: Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura- Ciencias Agrarias

Agrarias

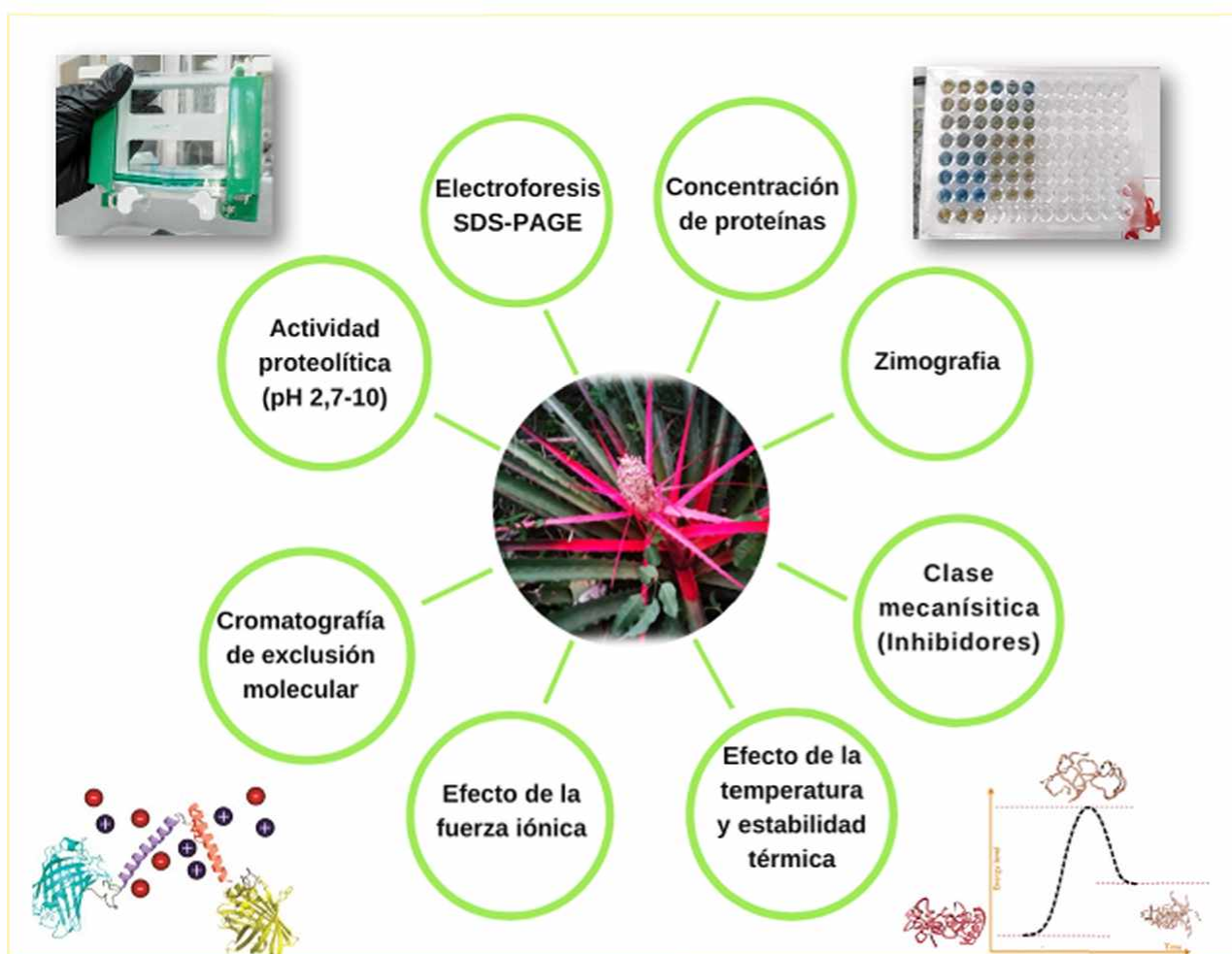
E-mail: melaniegomezherrera@gmail.com

Introducción y Objetivos

Algunas especies nativas de la familia de las *Bromeliaceae* se caracterizan por poseer endopeptidasas en cantidades superiores a las fisiológicamente necesarias, lo que constituye una potencialidad muy atractiva debido a los múltiples usos biotecnológicos que poseen dichas enzimas. Las proteasas son ampliamente utilizadas como catalizadores intervinientes en la biotecnología de los alimentos, industria textil, procesamiento de cueros, farmacéutica, detergentes, investigación proteómica, entre otros. *Bromelia serra* es una especie nativa de la región con pocos estudios hasta la fecha y cuya disponibilidad de material vegetal es abundante.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las propiedades del extracto enzimático proveniente de hojas de *Bromelia serra* y purificarlo parcialmente.

Materiales y Método



Resultados y Discusión

Los resultados de SDS-PAGE (Fig. 1A) muestran una banda clara entre 20 y 30 kDa en el CE (calle 2). Las muestras de EE (calle 3) en condiciones no reductoras muestran proteínas principales, por encima de 67 kDa, y proteínas más pequeñas con pesos moleculares aproximados de 50 y 40 kDa, pero no mostraron bandas claras entre 20 y 30 kDa. (calle 3). En condiciones reductoras el EE exhibió bandas de proteínas de 60, 45 y 22 kDa (calle 4). La zimografía de EE (Fig. 1B) muestra una zona clara entre 94 y 67 kDa, lo que indica la degradación de la gelatina provocada por la actividad hidrolítica. El EE fue inhibida significativamente por pepstatina A (50%) y E-64 (15%). La actividad proteolítica en EE presentó alta actividad en pH ácido (2,7-4) y baja actividad en pH alcalino neutro (6-11,75). La actividad óptima de EE se alcanzó a 60°C, y en cuanto a la estabilidad térmica, retuvo más del 97% de la actividad proteolítica después de la incubación en un rango de temperatura de 37–60 °C durante 60 min. Los procedimientos de cromatografía presentaron dos enzimas purificadas de 21 y 54 kDa con actividad proteolítica. Las características del EE sugieren que es un candidato potencial como catalizador industrial.

Agradecimientos

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica por el apoyo económico otorgado

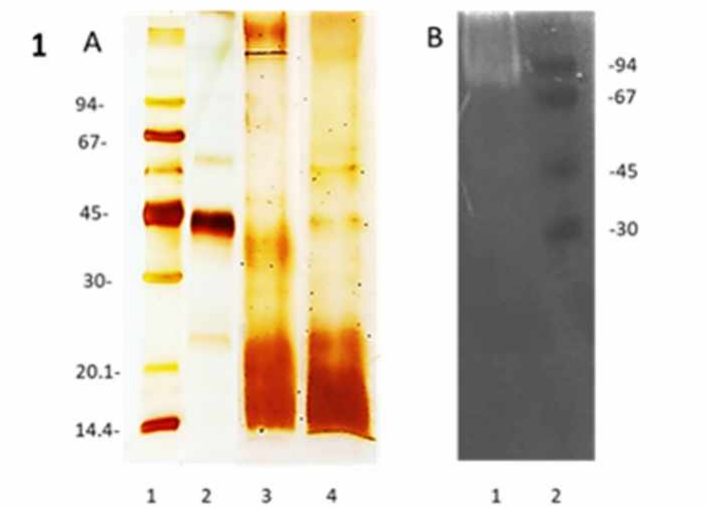


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE). Calle 1: marcadores de proteínas estándar; calle 2: extracto crudo; calle 3: extracto enzimático; calle 4: extracto enzimático con 2-mercaptoetanol (A). Zimografía. Calle 1: extracto enzimático; Calle 2: marcadores de proteínas estándar (B).

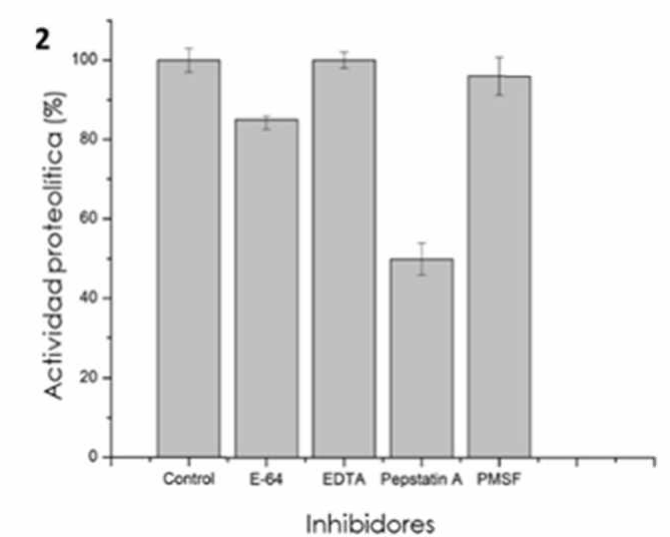


Figura 2. Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad enzimática. Las barras representan la desviación estándar (n = 4).

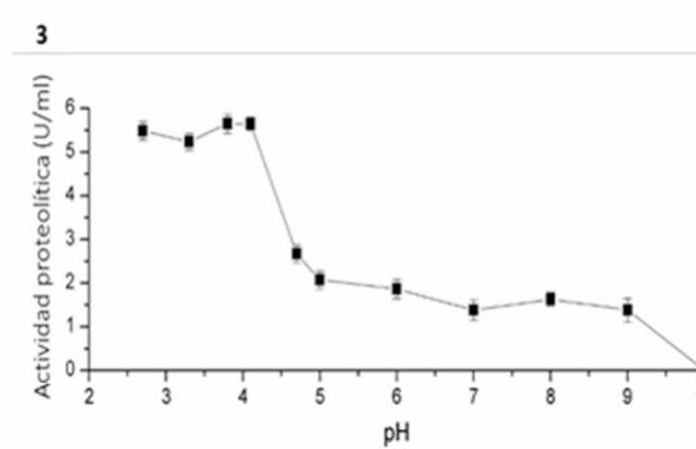


Figura 3. Efecto del pH sobre el extracto enzimático proteolítico con hemoglobina como sustrato

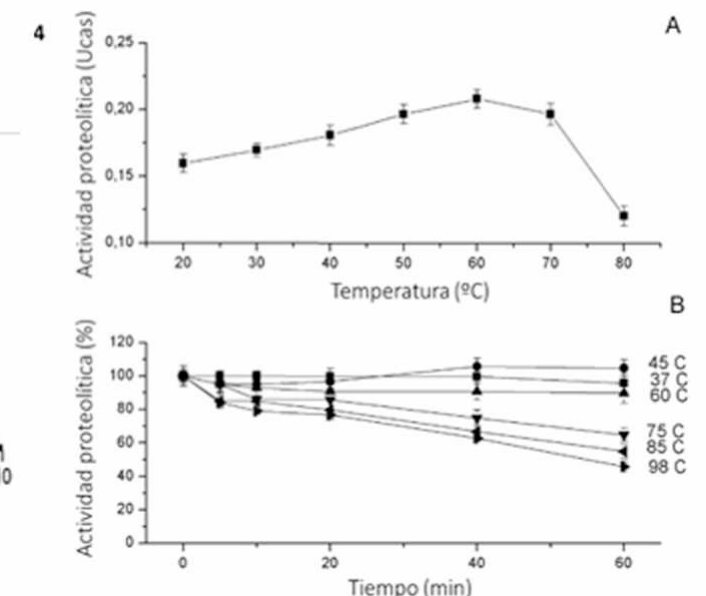


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre el extracto de enzima proteolítica (A) y la estabilidad de la enzima (B). Las barras representan la desviación estándar (n = 4).

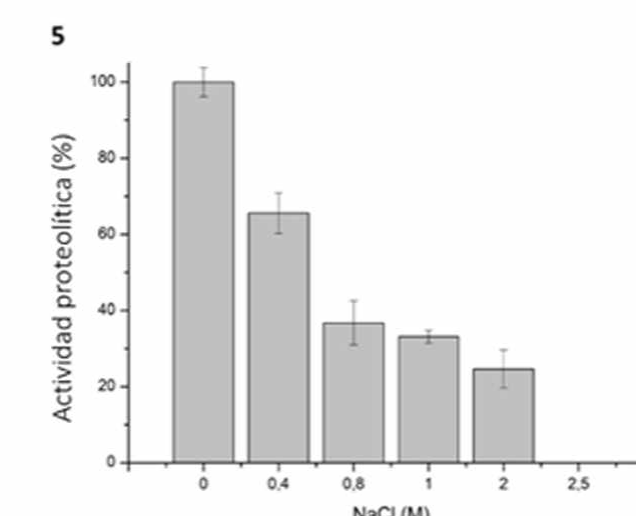


Figura 5. Efecto del NaCl sobre la actividad proteolítica del extracto de enzima (A). Efecto de la cisteína sobre la actividad enzimática (B). Las barras representan la desviación estándar (n = 4).

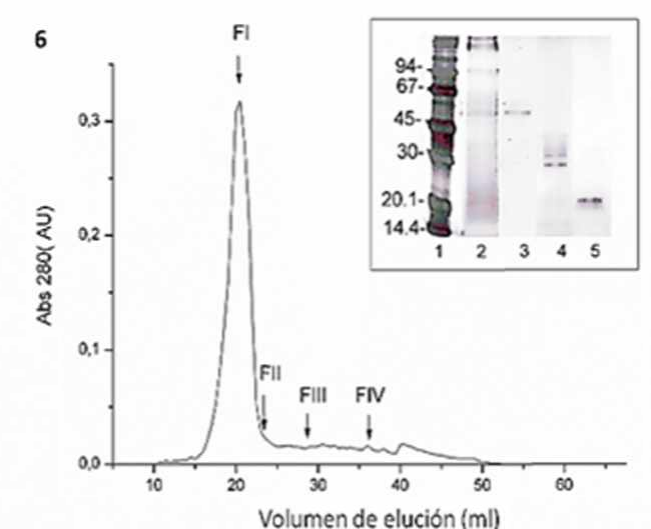


Figura 6. Cromatografía de exclusión por tamaño con Sephadex G-75. Se recogieron fracciones de 0,5 ml a un caudal de 0,250 ml / min y se analizaron a 280 nm. Las flechas indican actividad proteolítica en la fracción I (FI), II (FII), III (FIII) y IV (FIV). Recuadro en la figura 6: SDS-PAGE de las fracciones con actividad proteolítica FI (calle 2), FII (calle 3), FIII (calle 4), FIV (calle 5) y el estándar de peso molecular (calle 1).