

EXTRACCIÓN DE FOSFOLIPASA A2 DESDE EL APOPLASTO DE RAÍCES DE SOJA (*GLYCINE MAX*)

Mariana C. Minchiotti y Ricardo R. Madoery

Química Orgánica - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Av. Valparaíso esq. Félix Marrone, Ciudad Universitaria. C.C 509 (5000) Córdoba. Correo electrónico: rmadoery@agro.unc.edu.ar

Introducción

Las fosfolipasas A2 secretorias (sPLA2, EC 3.1.1.4) son enzimas interfaciales que promueven la reacción de hidrólisis de fosfolípidos, produciendo ácidos grasos y lisofosfolípidos. Estos lisoderivados son potentes emulsionantes de interés para la industria alimentaria y farmacéutica. En la actualidad, las normativas internacionales sólo aceptan enzimas microbianas y vegetales en la producción industrial. En trabajos anteriores, la extracción de sPLA2 a partir de homogenatos de semilla de soja (*Glycine max*), como así también la vía recombinante llevaron a reducidos rendimientos con procedimientos difícilmente escalables. Se planteó como hipótesis: “la extracción desde el apoplasto de soja permite aislar la enzima sPLA2 minimizando la contaminación con sustancias citoplasmáticas y estructurales”. En función de la localización extracelular de sPLA2 en plantas, se ajustó un procedimiento basado en infiltración con vacío. El **objetivo** de este trabajo fue: extraer sPLA2 directamente desde el espacio extracelular (o apoplasto) de soja (*GmsPLA2*), evitando el tratamiento de semilla completa y obteniendo así un extracto inicial más puro.

Metodología

Las variables independientes fueron: órgano-estadio vegetal y composición de solución de infiltración. Las variables de respuesta fueron: actividad específica PLA2 U/g material vegetal y actividad específica PLA2 U/mg proteína. Se plantearon diseños comparativos de un factor con varios niveles. Los valores reportados representan promedios de mediciones de actividad PLA2 realizadas por duplicado, sobre tres experimentos independientes. La actividad enzimática PLA2 se determinó aplicando el método cinético de Madoery y Minchiotti (2006). El procesamiento de datos se realizó con el programa Sigma Plot 10.0.

Semillas de soja (*Glycine max*) provistas por Laboratorio de Semillas FCA, se mantuvieron adecuadamente hidratadas y en oscuridad a 26 °C durante 8 días. A continuación, las raíces fueron separadas de las semillas germinadas y colocadas en contacto con la solución de infiltración en kitasato y agitadas en shacker 60 min. Se aplicó vacío (75 kPa) 15 min. Los segmentos fueron introducidos en jeringas plásticas y centrifugados a 1310 g 15 min. para recuperación del fluido apoplástico (FAP). El FAP colectado de tubos de centrifuga fue macro y microfiltrado y luego sembrado en

columna de Sephadex G-25. El eluido con Tris pH 7,8 fue ultrafiltrado aplicando dispositivos Vivaspin 6 (GE Healthcare) membrana PES 30 kDa.

Resultados

Se ensayaron los siguientes medios de infiltración: H₂O, Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, KCl 50 mM y mezcla Tris 25 mM-CaCl₂ 50 mM. En concordancia con el conocimiento sobre expresión de genes en *Glycine max*, raíces de germinación 8 días llevaron a máximos rendimientos y actividad específica *GmsPLA2*: 46 U/g y 23 U/mg respectivamente con Tris 50 mM; y 64 U/g y 22 U/mg con mezcla Tris-CaCl₂. Con raíces 4 días y solución Tris 50 mM, se alcanzó 8,4 U/g y 42 U/mg, indicando menor rendimiento pero mayor pureza *GmsPLA2*. La disminución de concentración de CaCl₂ a 5 mM en la mezcla Tris-CaCl₂ llevó a relativamente bajo rendimiento pero alta actividad específica en ensayo de raíces 4 días. Esto revela que el poder de lavado o estringencia de la solución depende de la presencia de CaCl₂. KCl fue notablemente menos efectivo y la infiltración con agua resultó en bajos rendimiento y actividad específica *GmsPLA2*, debido probablemente al colapso de membranas biológicas por efectos osmóticos y consiguiente liberación de material intracelular. En la recuperación del FAP, el entramado de la pared celular podría actuar como un filtro molecular natural, no permitiendo el pasaje de grandes macromoléculas. *GmsPLA2* tiene un PM del orden de 14 kDa (Minchiotti et al., 2008; Mariani et al, 2012). La purificación en columna Sephadex G-25 resultó efectiva para separar moléculas inhibitoras de actividad PLA2. Finalmente, el filtrado con dispositivo de ultrafiltración Vivaspin 30 KDa mostró un aumento de 617 veces en la actividad específica PLA2 (factor de purificación) y retención de actividad 58 % (rendimiento).

Conclusiones

El fluido apoplástico obtenido por infiltración de raíces 8 días con mezcla Tris-CaCl₂ desarrolló una actividad específica promedio 410 veces superior al homogenato inicial obtenido por procesamiento de semilla completa en un trabajo anterior (Minchiotti et al., 2008). Esto permitió simplificar notablemente la purificación de *GmsPLA2*, consiguiendo un elevado factor de purificación. De esta manera, la metodología de extracción desde el espacio extracelular de soja desarrollada en este trabajo, resulta extrapolable al aislamiento y purificación de *GmsPLA2* a escala industrial.

Bibliografía

Berg, O., Gelb, M., Tsai, M. and Jain, M. (2001) Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A2-paradigm. *Chem. Rev.* 101: 2613-2654.

Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M., Muehling, K. (2001) Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplasmic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum* 111, 457–465.

Madoery, R. y Minchiotti, M. (2006) Un método espectrofotométrico directo y continuo para la determinación de actividad fosfolipasa A2. *LabCiencia* 1 (02/2006), 13-15.

Mansfeld, J. (2009) Plant phospholipases A2: perspectives on biotechnological applications. Review. *Biotechnol Lett* 31: 1373-1380.

Mariani, M. E., M. A. Villarreal, et al. (2012) In silico and in vitro characterization of phospholipase A2 isoforms from soybean (*Glycine max*). *Biochimie* 94: 2608-2619.

XXXI Congreso Argentino de Química

25 al 28 de Octubre de 2016 Asociación Química Argentina

Sánchez de Bustamante 1749 – Ciudad de Buenos Aires – Argentina

The Journal of The Argentine Chemical Society Vol. 103 (1-2) January – December 2016 ISSN: 1852 -1207

Anales de la Asociación Química Argentina AAQAE 095 - 196

Minchiotti, M.; Scalambro, M. B.; Vargas, L.; Coronel, C. y Madoery, R. (2008) Isolation of phospholipase A₂ from soybean (*Glycine max*) seeds. The study of its enzymatic properties. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 389-394.

O'Leary, B.M., Rico, A., McCraw, S., Fones, H.N., Preston, G.M. (2014) The Infiltration-centrifugation Technique for Extraction of Apoplastic Fluid from Plant Leaves Using *Phaseolus vulgaris* as an Example. *J. Vis. Exp.* 94, e52113, doi:10.3791/52113.

Witzel, K., Shahzad, M., Matros, A., Mock, H., and Mühling, K. (2011) Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods* 7:48. doi:10.1186/1746-4811-7-48.

Zhang, L., Tian, L., Zhao, J., Song, Y., Zhang, C. and Guo, Y. (2009) Identification of an Apoplastic Protein Involved in the Initial Phase of Salt Stress Response in Rice Root by Two-Dimensional Electrophoresis. *Plant Physiol.* 149, 916-928.