

## 8.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. MATERIAL VEGETAL

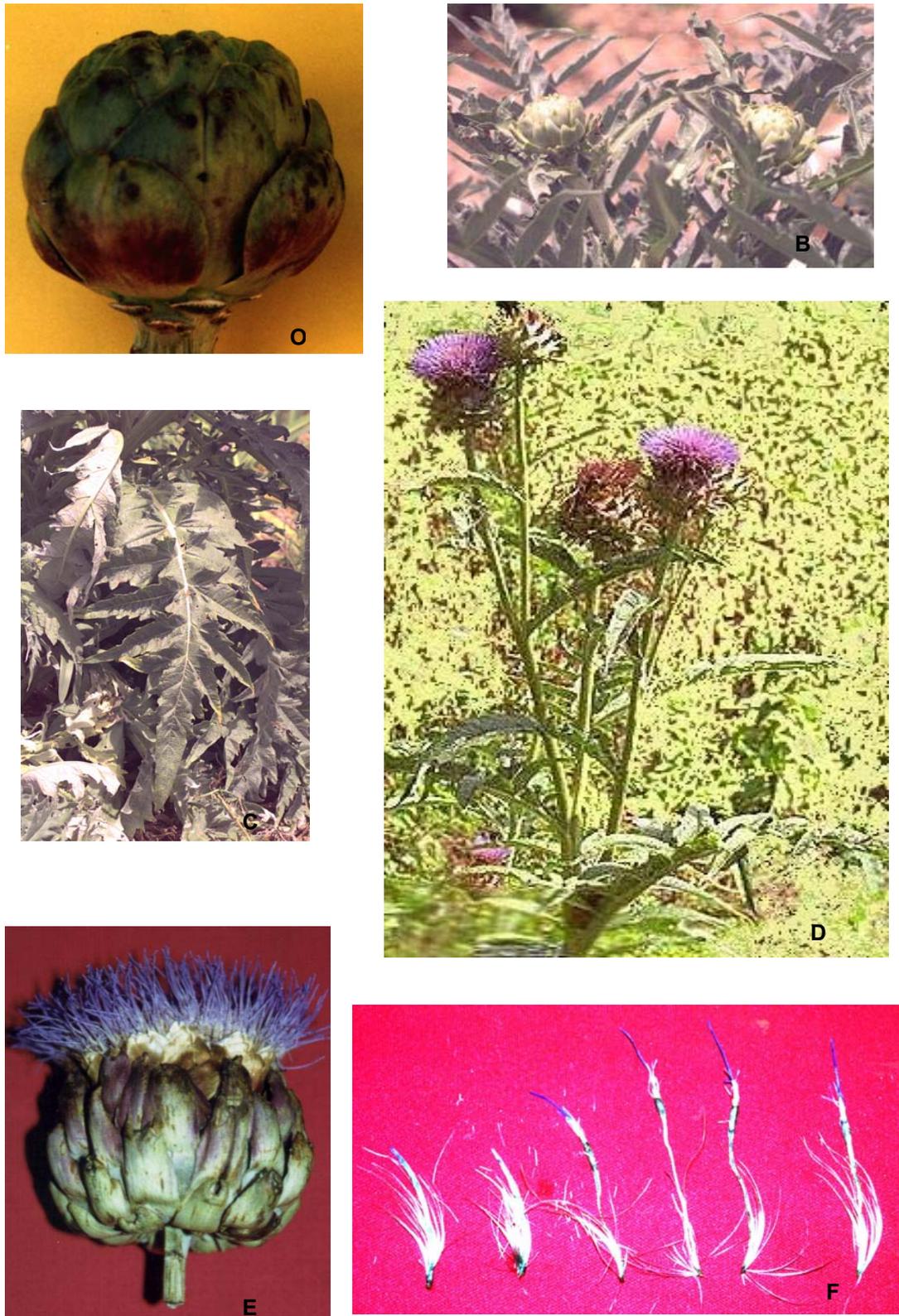
#### 8.1.1. *Cynara scolymus* L. (“alcaucil”, “alcachofa”)

Todas las especies pertenecientes al género *Cynara* L. son originarias de la cuenca del Mediterráneo e Islas Canarias. En Argentina prosperan dos especies: *C. cardunculus* L. (“cardo de Castilla”, “cardo”, “cardo de comer”), muy difundida como maleza, y *C. scolymus* L., el “alcaucil” o “alcachofa”, cultivado como hortaliza.

*C. scolymus* L. es una planta herbácea perenne, de más o menos 1 m de altura y de color gris claro, de hojas basales arrosetadas de hasta de 1 m de largo, lobuladas o pinatífidas, blanco-tomentosas en la cara inferior y con capítulos dispuestos en la extremidad de los tallos. Los capítulos son ovoides o globosos y más grandes que los del cardo, con las brácteas carnosas, desprovistas generalmente de apéndices espinosos. Las flores son tubulosas, hermafroditas, azuladas. Las anteras son sagitadas en la base y el estilo tiene las ramas pegadas, provistas de un anillo de pelos debajo del punto de bifurcación. Los aquenios son comprimidos, con el papus plumoso (*Figura 5*). Se consumen los capítulos inmaduros, pudiendo también comerse sus pecíolos foliares al igual que en el cardo (Dimitri, 1979).

#### 8.1.2. Cultivares estudiados

Se utilizaron plantas de alcaucil de los cultivares Green Globe y Francés Precoz cultivadas a campo en Nogoyá (Entre Ríos). La recolección del cultivar Green Globe se realizó durante la primavera (meses de octubre a diciembre de 1995 a 1998) y la del Francés Precoz en agosto y setiembre de 1996. La recolección durante varios meses permitió estudiar la localización del sistema enzimático en los órganos vegetales con diferentes grado de desarrollo.



**Figura 5.-** Plantas (B, D) y diferentes órganos de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe: A) capítulo inmaduro; C) hojas; E) inflorescencia; F) flores maduras.

### 8.1.3.- Desinfección del material vegetal

Las plantas fueron lavadas escrupulosamente bajo canilla y seccionadas en diferentes partes: raíces, hojas jóvenes y adultas, nervaduras, tallos y hojas de la inflorescencia, flores inmaduras, receptáculos, papus y flores maduras.

Para la desinfección del material vegetal destinado a cultivo *in vitro* se realizaron ensayos variando los tiempos de exposición y las concentraciones de los agentes utilizados para tal fin (etanol, bicloruro de mercurio e hipoclorito de sodio). El método y los explantos elegidos fueron los siguientes:

- las yemas apicales de *Cynara scolymus* L. cv. Francés Precoz fueron esterilizadas con  $\text{HgCl}_2$  ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) durante 5 minutos y  $\text{NaClO}$  al 17 % ( $1 \text{ g l}^{-1}$  de cloro activo) durante 10 minutos. Después de enjuagar 3 veces con agua destilada estéril, las yemas desinfectadas fueron mantenidas en una solución antioxidante compuesta de partes iguales de ácido ascórbico ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ) y ácido cítrico ( $150 \text{ mg l}^{-1}$ ).
- las brácteas provenientes de capítulos inmaduros de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe se esterilizaron con solución de  $\text{HgCl}_2$  ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) durante 5 minutos,  $\text{NaClO}$  al 20 % por 20 minutos y finalmente fueron enjuagadas 3 veces con agua estéril. Las secciones de brácteas se mantuvieron sumergidas en la solución antioxidante mencionada anteriormente.

## 8.2. CULTIVOS *IN VITRO* INDIFERENCIADOS: CALLOS

Para la obtención de callos se emplearon dos cultivares de alcaucil: Francés Precoz y Green Globe.

### 8.2.1. Cultivar Francés Precoz

#### 8.2.1.1. Establecimiento

Yemas apicales de *C. scolymus* L. cv. Francés Precoz desinfectadas como se indica en 8.1.3 fueron cultivadas en un medio constituido por sales MS (Murashige & Skoog, 1962) modificadas por la reducción a la mitad de concentración de los componentes nitrogenados y suplementadas con tiamina.HCl ( $0,4 \text{ mg l}^{-1}$ ), piridoxina ( $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ), mioinositol ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ), agar ( $8 \text{ g l}^{-1}$ ), ANA ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) y BA ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ). Previo ajuste del pH a 5,8 los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 1 atm durante 20 minutos. Los cultivos se incubaron a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y en oscuridad.

### *8.2.1.2. Efecto de ANA y de BA*

Luego de dos subcultivos (cada 4 semanas) en el medio de MS modificado, los callos se transfirieron al mismo medio base con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Fueron suplementados con BA ( $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ ) y concentraciones variables de ANA ( $0,1$ ;  $2,5$  y  $5 \text{ mg l}^{-1}$ ), que constituyeron los tratamientos A, B y C, respectivamente. Se emplearon 30 ml de estos tres medios contenidos en frascos de 150 ml y se cultivó en oscuridad a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

A los 7, 14, 21 y 28 días fueron evaluados el peso fresco y seco, las proteínas totales, la actividad proteolítica sobre caseína y el poder coagulante de la leche de los callos en cultivo. Los pesos fresco y seco de los callos se determinaron según lo descrito en 8.5.

Los extractivos celulares crudos se obtuvieron macerando los callos como se indica en 8.4.1 y en ellos se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), la actividad proteolítica utilizando caseína (8.7.1) y el poder coagulante de la leche según la técnica descrita en 8.6.1.2.

## **8.2.2. Cultivar Green Globe**

### *8.2.2.1. Establecimiento*

Los callos de *C. scolymus* L. cv. Green Globe se obtuvieron a partir de secciones de 2-2,5 cm de longitud de brácteas de capítulos inmaduros, desinfectadas según 8.1.3 y sumergidas en solución antioxidante. De las brácteas desinfectadas se extrajeron explantos de  $0,5 \times 0,5 \text{ cm}$  que fueron cultivados en medio salino MS, vitaminas de Gamborg, mioinositol ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ), agar ( $7 \text{ g l}^{-1}$ ) y suplementados con diferentes concentraciones de ANA y BA, que constituyeron los tratamientos 1 a 6 (*Tabla 10*). El pH de los medios de cultivo fue ajustado en 5,8 y se esterilizaron en autoclave a 1 atm durante 20 minutos. Los explantos fueron cultivados a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  en cajas de Petri y en oscuridad con 20 ml de cada uno de los medios ensayados.

Los callos obtenidos fueron transferidos a tubos de 55 ml conteniendo 15 ml de los 6 medios ensayados y subcultivados cada 4 semanas.

**Tabla 10.-** Concentraciones de ANA y BA utilizados para el establecimiento de callos *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe.

| ANA (mg l <sup>-1</sup> ) | BA (mg l <sup>-1</sup> ) |         |         |
|---------------------------|--------------------------|---------|---------|
|                           | 0,1                      | 0,5     | 1       |
| 5                         | Medio 1                  | Medio 2 | Medio 3 |
| 10                        | Medio 4                  | Medio 5 | Medio 6 |

### 8.2.2.2. Efecto del ácido naftalenacético (ANA) y de benciladenina (BA)

Después de tres subcultivos se estudió el efecto de los diferentes balances hormonales de los medios 1 a 6 sobre el crecimiento de los callos y en la actividad proteolítica y coagulante de la leche de los extractos celulares crudos. A tal fin se evaluó el peso fresco, el peso seco, las proteínas totales, la actividad proteolítica y la actividad coagulante de la leche en los extractivos de los callos crecidos en los seis medios de cultivo a los 7, 14, 21, 28 y 35 días. Durante las generaciones quinta a vigésima se evaluó solamente el peso fresco, las proteínas totales y la actividad coagulante de los extractos celulares de los callos cultivados en el medio 6. En estos extractos celulares se completó el estudio realizando ensayos de inhibición con pepstatina, electroforesis en geles de poliacrilamida y zimogramas, como se detalla más adelante.

El peso fresco y seco, las proteínas y la actividad coagulante se determinaron con las técnicas empleadas para los callos del cultivar Francés Precoz (8.2.1.2). Para evaluar la actividad proteolítica se utilizó caseína y/o hemoglobina bovina según lo descrito en 8.7.1.y 8.7.2.).

### 8.2.2.3. Efecto del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y del ácido abscísico (ABA)

Callos de *C. scolymus* L. cv. Green Globe crecidos durante ocho generaciones en el medio de cultivo MS con vitaminas de Gamborg y ANA (10 mg l<sup>-1</sup>): BA (1 mg l<sup>-1</sup>) [medio 6] se cultivaron en el mismo medio pero suplementado con GA<sub>3</sub> y ABA como reguladores del crecimiento en las concentraciones especificadas en la *Tabla 11*. Como recipientes de cultivo se utilizaron tubos (base plana) de 55 ml conteniendo 15 ml de medio y el cultivo se realizó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Se estudió el efecto de estos medios sobre el crecimiento de los callos (peso fresco) y la producción de peptidasas (actividad proteolítica y coagulante de la leche) en los extractos celulares crudos de los callos cultivados durante 30 días.

**Tabla 11.-** Concentraciones de GA<sub>3</sub> y ABA utilizadas para evaluar su efecto sobre callos de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe.

| GA <sub>3</sub> (mg l <sup>-1</sup> ) | ABA (mg l <sup>-1</sup> ) |          |
|---------------------------------------|---------------------------|----------|
|                                       | 0                         | 0,1      |
| 0                                     | Medio 7                   | Medio 10 |
| 5                                     | Medio 8                   | Medio 11 |
| 10                                    | Medio 9                   | Medio 12 |

### 8.2.3. Análisis estadístico

Los experimentos de crecimiento de los callos fueron llevados a cabo con un diseño totalmente aleatorizado, se realizaron tres veces y cada tratamiento contó con diez repeticiones. El peso fresco y seco y la actividad proteolítica se analizaron por ANOVA y por el test de comparaciones múltiples de Duncan.

## 8.3. CULTIVOS *IN VITRO* INDIFERENCIADOS: SUSPENSIONES

### 8.3.1. Iniciación

Las suspensiones celulares se iniciaron a partir de callos de *C. scolymus* L. cv. Green Globe. Se utilizó un clon celular seleccionado en base a su velocidad de crecimiento y a su contenido en peptidasas coagulantes de la leche, que fue cultivado en medio MS con vitaminas de Gamborg, mioinositol (100 mg l<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g l<sup>-1</sup>), agar (7 g l<sup>-1</sup>) y suplementadas con ANA (10 mg g l<sup>-1</sup>) y BA (1 mg g l<sup>-1</sup>). Los callos de décima generación (2 g) en fase exponencial de crecimiento fueron disgregados mecánicamente e inoculados en 50 ml del mismo medio sin agar contenido en frascos Erlenmeyer de 250 ml. Los cultivos se mantuvieron en un agitador orbital (100 rpm) a 24 ± 2°C y en oscuridad. Se agregaron perlas de vidrio de 2 mm para evitar la agregación y obtener suspensiones finas. Los subcultivos se realizaron cada tres semanas inoculando la suspensión celular filtrada a través de una malla de acero inoxidable de 250 micrones en medio fresco (relación 1:1). El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,8 y se esterilizó en autoclave a 1 atm durante 20 minutos.

Por otro lado y debido a la tendencia de las células en cultivo a formar agregados se inocularon, después de disgregarlos, 2 g de callos de duodécima generación en fases exponencial o estacionaria de crecimiento, en 50 ml del mismo medio y se cultivaron en las mismas condiciones que las suspensiones finas.

### 8.3.2. Crecimiento y producción de los cultivos en suspensión

Para realizar los estudios de crecimiento y de producción de peptidasas se utilizaron tanto suspensiones celulares finas mantenidas y subcultivadas durante dos meses para lograr su crecimiento sincronizado, como cultivos de agregados celulares.

Se distribuyeron alícuotas de 50 ml de los cultivos de células en suspensión en 20 frascos estériles de 250 ml de capacidad. A los 4, 7, 11 y 14 días se tomaron cuatro frascos al azar para realizar las mediciones. Se evaluó el peso fresco de los extractivos celulares según lo indicado en 8.5 y la actividad coagulante de la leche en el medio exocelular de las células en suspensión con la técnica descrita en 8.6.2.

Se completó el estudio realizando ensayos de inhibición con pepstatina, electroforesis en geles de poliacrilamida y zimogramas, como se detalla más adelante.

### 8.3.3. Análisis estadístico

Los experimentos de crecimiento de las suspensiones celulares fueron llevados a cabo con un diseño totalmente aleatorizado, se realizaron tres veces y cada tratamiento contó con cuatro repeticiones. El peso fresco y la actividad coagulante de la leche se analizaron por ANOVA.

## 8.4. EXTRACTIVOS VEGETALES

### 8.4.1. Obtención de preparaciones crudas

Las preparaciones crudas de las enzimas se obtuvieron macerando en trituradora eléctrica el material vegetal con buffer fosfato potásico 0,1 M, de pH 7 (1:3, p/v), con el agregado de EDTA 5 mM y cisteína 5 mM. Esta extracción se realizó con agitación suave e intermitente y en baño de hielo-agua para prevenir la proteólisis. El agregado de EDTA evita la acción de fenoloxidasas que poseen  $\text{Cu}^{2+}$  en su centro activo (Anderson, 1968), mientras que la cisteína actúa como agente reductor. Además se eligió un valor de pH de extracción alejado del pH óptimo estimado, con el objeto de minimizar la autodigestión durante el procesamiento de las muestras.

Los extractos crudos fueron filtrados a través de gasa doble y centrifugados a 16000g durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorval. En el caso que existieran, se removieron las gomas y otros materiales insolubles (película blanquecina que flotaba en la superficie y *pellet* marrón). El sobrenadante se filtró a través de papel y se conservó a -20°C hasta su análisis.

#### 8.4.2. Obtención de polvos acetónicos

Los polvos acetónicos de diferentes tejidos fueron obtenidos homogeneizando las muestras frescas (10 g) en una trituradora con acetona fría a  $-20^{\circ}\text{C}$  (30 ml) y en baño de hielo. Cada mezcla se filtró por tamiz de malla gruesa recibiendo sobre filtro Buchner, lavando con acetona fría y secando al vacío. Los polvos acetónicos se conservaron en frascos herméticos en heladera hasta su uso.

Los extractivos de los polvos acetónicos de cada tejido se obtuvieron suspendiendo el polvo con 30 ml de buffer fosfato de potasio 0,1 M de pH 6, conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 5 mM, con agitación, durante 60 minutos y a  $4^{\circ}\text{C}$ . La suspensión fue centrifugada a 16000g durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el precipitado fue descartado. El sobrenadante recolectado fue inmediatamente congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### 8.5. PESO FRESCO Y PESO SECO

El peso fresco de los callos se determinó después de eliminar la humedad superficial con papel absorbente y el peso seco fue evaluado secando en estufa a  $65^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante.

El peso fresco de las células en suspensión se determinó pesando el *pellet* obtenido después de centrifugar los cultivos a 16000g en centrífuga refrigerada durante 20 minutos sobre papeles de filtro y expresando los resultados en  $\text{g l}^{-1}$ .

#### 8.6. ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA LECHE

Es posible estimar la actividad enzimática observando el tiempo de coagulación de una muestra de leche bajo condiciones definidas de calidad y concentración de sustrato y de temperatura y tiempo de reacción (Dalglish, 1992).

**Preparación del sustrato:** se utilizó leche descremada en polvo envasada en sobres de aproximadamente 5 g (San Regim). Se pesó el contenido de un sobre y se preparó una solución al 10 % (p/v) en  $\text{CaCl}_2$  10 mM por agregado y mezcla manual hasta obtener una preparación homogénea. La mezcla se llevó a volumen ajustando el pH en 6 y se mantuvo con agitación suave para prevenir la formación de espuma, en agitador magnético durante 30 minutos. El sustrato se mantuvo en heladera hasta su uso, pero no excediendo las 4 horas. Todo el procedimiento se realizó con el sustrato protegido de la luz con una cubierta de papel metalizado a fin de estandarizar las condiciones de preparación del sustrato.

La actividad coagulante de la leche de cada una de las preparaciones crudas y de los medios de cultivo se determinaron por los métodos descritos a continuación.

### 8.6.1. Actividad coagulante intracelular

#### 8.6.1.1.- Prueba en placa

Se colocaron en una placa de toque 20  $\mu$ l de extracto crudo al que se le agregaron 100  $\mu$ l de una solución al 10 % (p/v) de leche descremada. La mezcla fue observada bajo lupa con 20x durante 5 minutos, categorizando con cero y de una a tres cruces la calidad y cantidad de coágulos formados. La prueba fue realizada por triplicado y en ambiente de temperatura controlada (25°C). Se realizaron controles negativos adicionando el buffer de la muestra a la leche preparada según se indicó anteriormente. La relación extracto crudo a leche fue elegida después de realizar pruebas con diferentes cantidades de estos dos componentes.

Esta metodología se realizó con fines orientativos, fundamentalmente para seguimiento de los cultivos *in vitro*. La evaluación definitiva de la actividad coagulante se realizó con las pruebas en tubo.

#### 8.6.1.2. Pruebas en tubo

La actividad coagulante de la leche sobre las diferentes partes de la planta fue realizada según una modificación de la técnica de Arima *et al.* (1970). En un baño de agua a 37  $\pm$  0,2°C se colocaron tubos con 500  $\mu$ l de los extractos crudos a los que se les adicionó 3 ml de una solución al 10 % (p/v) de leche descremada en polvo en solución de Ca Cl<sub>2</sub> 10 mM. Con la finalidad de visualizar mejor la formación del coágulo, se introdujo un tubo con tinta azul en el interior del tubo de reacción. El tiempo de coagulación fue determinado por observación directa de la floculación contra el tubo con colorante. La prueba fue realizada por triplicado y como control negativo se adicionó buffer a la solución de leche.

Para evaluar la actividad coagulante de la leche por los cultivos de callos y de células en suspensión se realizaron pruebas para adaptar las proporciones de reactivos al escaso peso de las muestras. En estos ensayos se utilizaron 500  $\mu$ l de leche descremada a la que se le adicionaron 100  $\mu$ l de los diferentes extractivos de los callos y células en suspensión. El tiempo de coagulación fue determinado por observación directa de la floculación y la prueba fue realizada por triplicado.

Una unidad de actividad coagulante de la leche (UCL) se definió como la cantidad de enzima necesaria para coagular 1 ml de leche en 40 minutos, en las condiciones del ensayo (Smeets, 1995).

La actividad específica se expresó como UCL por mg de proteína.

### 8.6.2.- Actividad coagulante exocelular

La detección de actividad coagulante en el agar circundante de los callos en cultivo se realizó utilizando una sección de agar de 10 mm de diámetro por 2 mm de espesor obtenida con un sacabocado. La muestra de agar se colocó en un tubo contenido 1 ml de leche, se disgregó agitando en vortex durante 30 segundos y se colocó en un baño de agua a  $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .

Para medir la actividad coagulante del medio exocelular de los cultivos en suspensión se utilizaron 500  $\mu\text{l}$  de leche descremada a la que se le adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo.

Las pruebas fueron realizadas por triplicado y el tiempo de coagulación se determinó por observación directa de la floculación expresando los resultado en UCL  $\text{ml}^{-1}$ .

## 8.7. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad proteolítica fue determinada en los diferentes materiales vegetales usando como sustratos: caseína, azocaseína o hemoglobina.

### 8.7.1. Caseína

Se preparó una solución al 1 % de caseína tipo Hammersten (Research Organics) con 1,5 ml NaOH 0,1 M y llevando a 100 ml con buffer fosfato de potasio 0,1 M de pH 6. La suspensión se mantuvo durante 20 minutos en baño de agua hirviente. La solución resultante se filtró por papel en caliente, se ajustó el pH a 6 y se llevó a volumen con agua destilada. El sustrato fue utilizado en el día.

La mezcla de reacción constituida por 0,1 ml de solución de enzima y 1,1 ml de caseína al 1 % (p/v) fue incubada en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. La reacción fue detenida por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético al 5 % (p/v). Los blancos fueron preparados por agregado del ácido tricloroacético a la enzima y la posterior adición de sustrato. Los tubos se centrifugaron a 4000g durante 20 minutos y la absorbancia de los sobrenadantes fue medida a 280 nm, a través de una celda de 1 cm de paso.

Siguiendo el criterio de Sarah *et al.* (1989) para expresar la actividad enzimática cuando se utilizan sustratos proteicos, se definió para este caso una unidad enzimática arbitraria ( $U_{\text{cas}}$ , unidad caseinolítica) como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm, en las condiciones del ensayo.

### 8.7.2. Hemoglobina

Se preparó una solución al 2 % de hemoglobina según una modificación de la técnica de Anson (1938) propuesta por Sarah *et al.* (1989). A tal fin se disolvieron 2 g de hemoglobina en polvo (Sigma) en una solución de 80 g de urea en 80 ml de agua. Después de incubar durante 30 minutos a 37°C se filtró por papel, se llevó a pH 4 con buffer cítrico-citrato 0,2 M de pH 3 y se completó a 100 ml con agua. Esta solución de hemoglobina desnaturalizada fue almacenada a 4°C con el agregado de tiomerosal al 2 % (p/v) por no más de una semana.

La mezcla de reacción conteniendo 250  $\mu$ l de una dilución de la enzima y 1,25 ml de la solución de hemoglobina fue incubada durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo por la adición de 2,5 ml de ácido tricloroacético al 5 % (p/v). La mezcla fue centrifugada a 4000g durante 20 minutos y la absorbancia del sobrenadante fue medida a 280 nm. Una unidad de actividad enzimática ( $U_{Anson}$ ) fue definida como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de 1 unidad de absorbancia a 280 nm, bajo las condiciones del ensayo.

### 8.7.3. Azocaseína

El sustrato fue preparado según una modificación de la técnica de Charney & Tomarelli (1947). La mezcla de reacción conteniendo 250  $\mu$ l de azocaseína al 2 % en Tris-HCl 0,1 M de pH 6 y 150  $\mu$ l del extracto de enzima fue incubada a 37°C, 30 minutos. La reacción se detuvo por la adición de 1,2 ml de ácido tricloroacético al 10 % (p/v); la mezcla se mantuvo en reposo durante 15 minutos y luego se centrifugó a 8000g durante 3 minutos. A continuación se mezclaron 1,2 ml de sobrenadante con 1,4 ml de NaOH 1 M y se midió la absorbancia a 440 nm. Se realizaron ensayos blanco agregando en primer término el ácido tricloroacético. Una unidad de actividad enzimática ( $U_{azoc}$ ) fue definida como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de 1 unidad de absorbancia a 440 nm, bajo las condiciones del ensayo.

## 8.8. PROTEÍNAS TOTALES

El contenido proteico se determinó utilizando el método de Bradford (1976), basado en que la unión del Coomassie Blue G-250 a la proteína se traduce en un corrimiento del máximo de absorbancia de la forma roja del colorante libre desde 465 nm a 595 nm, que es donde absorbe la forma azul del complejo colorante-proteína. El método de Bradford es recomendado para determinar proteínas en extractos vegetales debido a que éstos frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con otros métodos, como con la clásica técnica de Lowry (Michaud & Asselin, 1995).

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango 0,1 a 1 mg ml<sup>-1</sup> para el ensayo estándar y entre 5 y 100 µg ml<sup>-1</sup> para el microensayo. En este último la mezcla de reacción consistió en 200 µl de muestra con 2 ml del reactivo de Bradford, en tanto que en el macrométodo la relación fue de 50 µl de muestra a 2,5 ml de reactivo. La lectura se realizó a 595 nm dentro de los 30 minutos.

En las experiencias cromatográficas el perfil de proteínas se estimó por medida de la absorbancia a 280 nm.

### **8.9. ESTABILIDAD TÉRMICA**

Con la finalidad de estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de las preparaciones crudas de las flores maduras, las muestras fueron incubadas durante 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 y 180 minutos a 37, 45, 55 y 65°C en buffer fosfato de potasio 0,1 M de pH 6. Finalizado el período de incubación, las muestras fueron mantenidas en baño de hielo hasta que se midió la actividad caseinolítica residual, de acuerdo a la técnica descrita en 8.7.1.

### **8.10. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

La actividad proteolítica de las preparaciones crudas de las flores maduras fue medida usando hemoglobina bovina desnaturalizada según la técnica indicada en 8.7.2, en un rango de pH de 2,7 a 10.

Se realizó además la determinación sobre azocaseína en el rango de pH 4 a 8. El sustrato se preparó según lo descrito en 8.7.3.

En las determinaciones se emplearon los siguientes buffers: citrato sódico - ácido cítrico 0,1 M (pH 2,7 a 5,5), fosfato potásico 0,1 M (pH 6 a 8) y ácido bórico - cloruro de potasio - hidróxido de sodio 0,1 M (pH 8 a 10).

### **8.11. EFECTO DE ACTIVADORES E INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

El efecto de activadores e inhibidores sobre la actividad proteolítica de los extractos de flores fue determinado preincubando las muestras con el activador o inhibidor durante 30 minutos a 37°C y estimando la actividad caseinolítica residual a pH 6, según la técnica descrita en 8.7.1. Con este propósito fueron ensayados cisteína (5 mM), E-64 (10µM), pepstatina A (1 µM) y fenilmetilsulfonil fluoruro (1 mM). También fue medida la capacidad de inhibición de 1,10-fenantrolina (10 mM), usando en este caso azocaseína como sustrato según la técnica descrita en 8.7.3, dado que este inhibidor de metaloproteasas muestra alta absorbancia a 280 nm. Los controles se realizaron preincubando las

preparaciones enzimáticas con el solvente utilizado para disolver los activadores o inhibidores.

El objetivo de estas reacciones fue determinar el grupo al que pertenecen las peptidasas en estudio, según los tipos mecanísticos propuestos por Barrett *et al.* (1998).

## **8.12. PURIFICACIÓN DE LAS PREPARACIONES CRUDAS**

Los extractos crudos de las flores fueron sometidos a una primera purificación utilizando una de las tres técnicas siguientes: extracción con acetona, precipitación fraccionada con sulfato de amonio o adsorción con carbón activado. Luego se separaron las fracciones con actividad proteolítica mediante cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose), que posteriormente fueron sometidas a cromatografía de afinidad en una de las estrategias.

Se estableció el grado de purificación alcanzado en cada etapa y el porcentaje de recuperación de la actividad proteolítica.

El peso molecular relativo se estimó por cromatografía de exclusión molecular y por SDS-PAGE y la masa molecular por espectrometría de masa, que además permitió evaluar el grado de pureza. La aplicación de isoelectroenfoque permitió establecer el grado de homogeneidad y el valor del punto isoeléctrico de cada una de las fracciones activas. La actividad proteolítica en los geles se detectó mediante zimogramas con gelatina o hemoglobina a pH ácido.

### **8.12.1. Extracción con acetona**

Las proteínas de las flores fueron precipitadas homogeneizando 10 g de tejido fresco en una trituradora con 30 ml de acetona fría a -20°C. La suspensión obtenida se filtró por tamiz de malla gruesa, se dejó en reposo durante 10 minutos en frío y luego fue centrifugada a 16000g durante 30 minutos a 4°C. Los precipitados se redisolieron con 50 ml de buffer fosfato de potasio 0,1 M de pH 6, conteniendo EDTA (5 mM) y cisteína (5 mM), se centrifugaron a 16000g durante 30 minutos a 4°C y los precipitados fueron descartados. Los sobrenadantes fueron inmediatamente congelados a -20°C hasta su análisis.

### **8.12.2. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio**

Los extractos crudos obtenidos con buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 7 fueron precipitados fraccionadamente con sulfato de amonio al 30, 45, 60 y 80 %. A tal fin se fue agregando el sulfato de amonio lentamente y con agitación suave a la muestra colocada en baño de hielo hasta llegar al 30 % de saturación. Treinta minutos después de obtener

la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  deseada, la mezcla se centrifugó a 16000g durante 20 minutos y a 4°C. Se retuvo el sobrenadante, se agregó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta obtener el 45 % de saturación y así sucesivamente se continuó con la precipitación fraccionada. Los precipitados fueron redisoluertos con buffer fosfato 0,1 M de pH 6.

Las muestras fueron desaladas por pasaje en columna con Sephadex G-25 (Pharmacia) usando como solvente de elución buffer fosfato 0,1 M de pH 6. Se midió la absorbancia a 280 nm y se colectaron 10 ml de cada una de las cuatro fracciones precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de los eluidos con alta absorbancia.

### **8.12.3. Adsorción con carbón activado**

Los extractos crudos de las flores fueron tratados con diferentes concentraciones de carbón vegetal activado con la finalidad de eliminar compuestos de naturaleza fenólica por adsorción. Es conveniente excluir los fenoles de las muestras, ya que pueden combinarse con las proteínas por puentes de hidrógeno y uniones covalentes y como resultado de ello inhibir la actividad enzimática.

El carbón se activó en estufa a 180°C durante 2 horas y se mantuvo en desecador hasta su uso. El carbón y los extractos vegetales se pusieron en contacto en cantidades equivalentes al 2,5, 5 y 10 % (p/v), alternando períodos de 30 segundos de agitación en vortex e inmersión en baño de hielo durante otros 30 segundos, hasta completar 10 minutos. Las mezclas se dejaron sedimentar a 4°C durante 30 minutos y luego se centrifugaron a 16000g y 4°C, durante 60 minutos. En los sobrenadantes se determinó la concentración de proteínas totales, la actividad hemoglobinolítica y la actividad coagulante, a fin de evaluar la pérdida de proteínas de interés.

#### *8.12.3.1. Caracterización espectrofotométrica UV y visible*

Se realizaron los espectros UV y visible del extracto crudo de las flores antes y después del tratamiento con carbón activado al 10 % en un espectrofotómetro Beckman 26.

### **8.12.4. Cromatografía de intercambio iónico**

Para purificar el extracto crudo y el precipitado con sulfato de amonio se utilizó una columna Pharmacia K 15/30 (1,5 cm x 30 cm) rellena con 30 ml de DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) equilibrada con buffer fosfato potásico 50 mM de pH 6 y con gradientes salinos de NaCl, variables según el ensayo.

El volumen de elución fue de 180 ml, recogiendo fracciones de 2 ml. La velocidad de flujo fue de 45  $\text{cm}^3 \text{h}^{-1}$  y se midieron los valores de absorbancia a 280 nm y la actividad proteolítica sobre hemoglobina a pH 4.

#### *8.12.4.1. Extracto crudo de flor*

Se sembraron 10 ml de los extractivos de las flores obtenidos con buffer fosfato de pH 7, que fueron eluidos con buffer fosfato potásico 50 mM de pH 6 y la aplicación posterior de un gradiente lineal de NaCl (0 a 0,4 M) en el mismo buffer. Las fracciones con actividad proteolítica fueron reunidas (10 ml) y recromatografiadas separadamente en la misma columna con un gradiente de NaCl de 0,20 a 0,35 M.

#### *8.12.4.2. Extracto de flor precipitado con sulfato de amonio*

El precipitado obtenido con sulfato de amonio al 80 % del extractivo de las flores tratado fraccionadamente como se explica en 8.12.2 fue redissuelto en 10 ml de buffer y purificado en la columna de DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) equilibrada con buffer fosfato de potasio 50 mM de pH 6. La elución fue realizada con un gradiente lineal de NaCl (0 a 0,9 M) en el mismo buffer y el *pool* de las fracciones con actividad proteolítica (10 ml cada una) fue recromatografiado, eluyendo con un gradiente de NaCl 0,3 a 0,6 M.

#### *8.12.4.3. Extracto de flor adsorbido con carbón activado*

El extracto crudo tratado con carbón activado fue purificado con el intercambiador aniónico DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia). Se lavó la columna con buffer fosfato 50 mM (pH 6,5) y se eluyó con 200 ml de un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,35 M en el buffer de partida. La velocidad de flujo fue de  $13,5 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$  ( $7,6 \text{ cm h}^{-1}$ ). Se recolectaron fracciones de 2 ml en las que se midió la absorbancia a 280 nm y la actividad hemoglobinolítica.

### **8.12.5. Cromatografía de exclusión molecular**

El peso molecular de la fracción activa obtenida por intercambio aniónico se determinó sembrando 2 ml de muestra en una columna de 50 x 1,5 cm rellena con Sephadex G-75 (Pharmacia) equilibrada con buffer fosfato potásico 0,1 M de pH 6. Para eluir se utilizó el mismo buffer. La velocidad de flujo fue de  $30 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$  y se recogieron fracciones de 2 ml, cuya actividad fue seguida por lectura de la absorbancia a 280 nm.

Como marcadores de peso molecular y de volumen muerto ( $V_0$ ) de la columna se usó el kit de Sigma MW-GF-70 que contiene aprotinina (pulmón bovino): 6,5 kDa; citocromo C (corazón equino): 12,4 kDa; anhidrasa carbónica (eritrocito bovino): 29 kDa; albúmina (suero bovino): 66 kDa y Blue Dextran: 2000 kDa.

El peso molecular de las muestras se determinó interpolando el volumen de elución de las muestras ( $V_e$ ) sobre una curva en la que se graficó el peso molecular vs.  $V_e/V_0$  de cada proteína estándar.

### 8.12.6. Cromatografía de afinidad

El *pool* del pico activo obtenido por cromatografía de intercambio aniónico de los extractivos de las flores tratados con carbón activado fueron purificados realizando una cromatografía de afinidad utilizando una columna de 10 x 1,2 cm rellena con 5 ml de pestatina-agarosa (Sigma). Se equilibró con buffer ácido acético-acetato de sodio 0,1 M de pH 5. La muestra (1 ml) fue sembrada y lavada por el pasaje del mismo buffer con el agregado de NaCl 0,1 M hasta obtener valores de absorbancia (280 nm) próximos a cero. La elución se realizó utilizando buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8 y NaCl 1 M. La velocidad de flujo aplicada fue de 30 cm<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> y se recogieron fracciones de 2 ml.

## 8.13. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE PUREZA DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

### 8.13.1. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida

Se utilizó la técnica descrita por Davies (1964). Los geles (7 cm x 8 cm x 0,75 mm) se prepararon empleando los soportes del equipo Mini Protean II (Bio-Rad) con una concentración de acrilamida del 14 % en el gel de resolución y del 5 % en el gel concentrador (*stacking*). Como buffer de corrida se utilizó Tris-glicina pH 8,3. Los extractivos vegetales fueron solubilizados en buffer de muestra a una concentración de 1 µg µl<sup>-1</sup> de proteínas y centrifugados a 16000g. Se sembraron 10-20 µl de las muestras con jeringa Hamilton. La corrida se desarrolló en un equipo Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad) durante 60 minutos a voltaje constante (150 V), empleando una fuente PowerPac 300 (Bio-Rad). Para colorear se usó Coomassie Blue R250.

### 8.13.2. Electroforesis bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

El SDS-PAGE se realizó utilizando la técnica descrita por Laemmli (1970).

Los geles, el buffer de reservorio y de la muestra, las condiciones de corrida y el colorante fueron los mismos que en el punto anterior, con el agregado de SDS a los geles y los buffers y β-mercaptoetanol al buffer de la muestra.

Los geles fueron escaneados y analizados utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation; Web site: <http://www.scioncorp.com>). La determinación de los pesos moleculares se realizó utilizando una curva de calibración obtenida al graficar los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas patrones en función de la movilidad relativa de cada especie proteica. Los patrones de peso molecular utilizados se detallan en el Anexo.

### 8.13.3. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) es un método que permite separar las proteínas en un gradiente de pH. La proteína migrará hacia el pH de su punto isoeléctrico (pI) y se concentrará allí. Es un método relativamente rápido y simple, de muy alta resolución y permite definir el valor del pI de cada proteína.

Los valores de los puntos isoeléctricos de diferentes fracciones de las flores de alcaucil se determinaron utilizando un equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio Rad).

Los geles se prepararon empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo, que permite preparar dos placas simultáneamente. Se utilizó una película plástica (Gel Support Film for Polyacrylamide, Bio-Rad) adherida por su cara hidrofílica al vidrio que sirve como soporte. La mezcla de poliacrilamida al 10 % y anfolitos de pH 3-10 o de pH 4-6,5 (Pharmalyte, Pharmacia), previamente desgasificada, se depositó con pipeta en la película plástica y se dejó polimerizar por lo menos 12 horas a temperatura ambiente.

Las muestras se concentraron y desionizaron por precipitación con tres volúmenes de acetona. El sobrenadante se eliminó por centrifugación a 16000g durante 15 minutos y el precipitado fue redissuelto con agua bidestilada. Se sembraron 2 a 10  $\mu$ l de cada una de las muestras con jeringa Hamilton en la zona central del gel y se permitió que difundieran dentro del mismo durante 5 minutos.

La corrida se realizó en tres etapas sucesivas: 15 minutos a 100 V, 15 minutos a 200 V y 60 minutos a 450 V. Una vez finalizada, los geles fueron sumergidos durante 30 minutos en solución fijadora, tratados sucesivamente con las soluciones colorante y decolorante y secados. La composición de las mencionadas soluciones se indica en el Anexo.

Los geles fueron escaneados y analizados utilizando el programa Scion Image. La determinación de los valores de pI de las proteínas se realizó utilizando una curva de calibración resultante de graficar los pI de proteínas estándar en función de la distancia recorrida por la especie proteica de interés, tomando como referencia la posición del cátodo. A tal fin se utilizaron mezclas de proteínas en el rango de pI 3,5 a 9,3 (Pharmacia) detalladas en el Anexo.

### 8.13.4. Actividad enzimática en geles

La actividad enzimática puede ser detectada en geles nativos o en SDS-PAGE si las muestras son preparadas sin reducción ni calentamiento y si son renaturalizadas después de la electroforesis. La actividad se detectó por tres métodos que fueron modificaciones de las técnicas descritas por Westergaard *et al.* (1980).

#### *8.13.4.1. Zimograma con gelatina incluida*

Se realizaron electroforesis nativas y SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes con geles de resolución al 14 % y *stacking* al 5 %, agregando gelatina al 0,7 % previamente a la polimerización. Después del desarrollo de la electroforesis, los geles fueron colocados en buffer cítrico-citrato 0,1 M de pH 4 durante 2 horas a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. La proteólisis fue detenida al transferir los geles a la solución colorante (Coomassier Blue R-250). Las proteínas con actividad proteolítica sobre gelatina se visualizaron como bandas no teñidas sobre el fondo oscuro del gel.

#### *8.13.4.2. Zimograma con gelatina overlay*

Las placas de agarosa se prepararon sobre película Gel Support Film for Agarose (Bio-Rad), de 125 x 65 mm de tamaño volcando sobre la cara hidrofílica del film una solución de agarosa al 1 % y gelatina al 0,2 % en buffer cítrico-citrato 0,1 M de pH 4 (0,15 ml cm<sup>-2</sup>)

Para el desarrollo del zimograma se colocó la placa de agarosa-gelatina sobre el gel de poliacrilamida en la que se habían corrido las proteínas. El conjunto se colocó en cámara húmeda toda la noche a temperatura ambiente o 40 minutos en estufa a 50°C. Transcurrido el período de incubación, la placa de agarosa-gelatina fue fijada durante 60 minutos, deshidratada entre papeles de filtro, secada con pistola de aire y coloreada con Coomassie Blue R-250.

#### *8.13.4.3. Zimograma con hemoglobina*

En la identificación de actividad proteolítica de las proteínas separadas por su pl se realizaron zimogramas sumergiendo placas de agarosa al 1 % preparadas como en el punto anterior en una solución de hemoglobina al 2 % en buffer cítrico-citrato 50 mM de pH 4 durante 20 minutos. Sobre esta placa de agarosa-hemoglobina, enjuagada con agua destilada y escurrida durante 10 minutos, se colocó el gel de poliacrilamida correspondiente al isoelectroenfoque. La incubación, fijación y coloración se realizó como en 8.13.4.2.

## 8.14. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

### 8.14.1. Plan de inmunización

El plan de inmunización se diagramó para obtener respuestas secundarias (anticuerpos tipo IgG) de alta afinidad, por lo que se emplearon bajas concentraciones del antígeno y esquemas de inmunización largos. Se realizaron adaptaciones a la técnica descrita por Gavilondo Cowley (1995).

Como antígeno se utilizó la subunidad menor de la peptidasas de alcaucil purificada por cromatografía de afinidad y separada por SDS-PAGE.

Dos conejos New Zealand blancos adultos y jóvenes fueron inmunizados por vía subcutánea con una solución del antígeno en solución fisiológica ( $0,6 \text{ mg ml}^{-1}$ ). A los 20 días se realizó la inmunización de amplificación (*booster*) inyectando los conejos con el mismo antígeno.

Como suero control se utilizaron muestras de sangre de los conejos antes de inmunizar. El título de anticuerpos producidos se verificó realizando sangrías exploratorias. El suero inmune se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 1 ml en tubos tapados.\*

### 8.14.2. Producción y título de anticuerpos

La producción y el título de anticuerpos se determinó por inmunelectroforesis y por ELISA indirecto.

#### *8.14.2.1. Inmunelectroforesis*

Para realizar la inmunelectroforesis se prepararon portaobjetos con una película de 3 ml de agar diluido en buffer veronal sódico 50 mM de pH 8,6. Una vez solidificado, en el agar de las zonas cercanas a los bordes mayores del portaobjeto se practicó una doble incisión de 2 mm de separación y de 65 mm de longitud, dejando sin marcar 5 mm en cada extremo. En la zona central y equidistante de cada canal se realizó un orificio de 1,8 mm de diámetro, donde se sembraron 5  $\mu\text{l}$  del antígeno. Los portaobjetos fueron colocados en el soporte de la cámara electroforética conteniendo buffer veronal y estableciendo contacto mediante puentes de papel de filtro fueron corridos a 8 mA.

---

\* La obtención de anticuerpos anti-peptidasa de alcaucil fue realizada en colaboración con la Dra. Hebe Goldman de la cátedra Inmunoquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Una vez terminada la electroforesis y después de retirar el agar limitado por la doble incisión longitudinal, se colocaron en dicho canal 100 µl del antisuero a valorar. Los portaobjetos se dispusieron en una cámara húmeda durante 48 horas.

Las placas fueron lavadas dos veces cada 12 horas con solución fisiológica y varias veces durante 3 horas con agua destilada. Luego se secaron durante 24 horas en estufa a 37°C, cubiertas con papel de filtro.

Para visualizar las zonas de reacción de antígeno y anticuerpo se sumergieron los portaobjetos durante 15 minutos en Amido Schwartz al 0,5 % en metanol-ácido acético-agua (4,5:1:4,5) y se decoloró varias veces con mismo solvente.

#### *8.14.2.2. ELISA indirecto*

El extracto de la peptidasa utilizada para inmunizar el conejo con una concentración de 10 µg ml<sup>-1</sup> en buffer carbonato/bicarbonato 50 mM de pH 9,6 (100 µl por pocillo) se adsorbió en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos, incubando toda la noche a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó incubando durante 1 hora a 37°C con 200 µl de leche en polvo descremada (Molico) al 8 % en PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7-7,4). Después de lavar las placas cuatro veces con PBS conteniendo 0,3 ml l<sup>-1</sup> de Tween 20 (PBST), se agregaron 100 µl de las diluciones seriadas al medio en PBST de los sueros inmunes y control y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavaron cuatro veces con PBST y se cubrieron con 100 µl de anticuerpos de cabra anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma A-8275), diluído 1/2000 en PBST. Las placas se incubaron una hora a 37°C y luego se lavaron cinco veces con PBST. El revelado se realizó agregando a cada pocillo 100 µl de ortofenilendiamina (OPD) 1 mg ml<sup>-1</sup> en buffer citrato-fosfato de sodio 0,1 M de pH 5 con 0,025 % de agua oxigenada e incubando en la oscuridad durante 10 minutos. La reacción se detuvo con el agregado de 50 µl de ácido sulfúrico 2N y se realizó la lectura en un espectrofotómetro para policubetas (Metrolab) a 492 nm.

Como controles se realizaron reacciones con: a) suero de conejo sin inmunizar; b) antígeno no pegado al pocillo y c) PBST en reemplazo del anticuerpo.

#### **8.14.3. Electrotransferencia (*blotting*)**

Las muestras conteniendo 10–20 µg de proteína fueron separadas en geles de poliacrilamida al 14 % por SDS-PAGE de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Luego las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando un equipo Mini Trans-Blot (Bio-Rad).

Previo a la transferencia, la membrana de nitrocelulosa (Immobilon-NC Hahy, 0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore), seis hojas de papel Whatman 3 MM y dos esponjas se sumergieron durante 30 minutos en buffer de transferencia (Tris base 25 mM y glicina 192 mM en metanol 20 %, pH 8,1-8,4). Sobre el ánodo del equipo para electrotransferencia se colocaron sucesivamente una esponja, tres hojas de papel Whatman, la membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida y finalmente las otras tres hojas de papel y la otra esponja. Todo el procedimiento se realizó en baño de hielo y trabajando con guantes.

La electrotransferencia se realizó a 100 V durante 60 minutos. Para corroborar la transferencia se localizaron los marcadores de peso molecular con una tinción con Ponceau S 0,1 % (p/v) en ácido acético al 5 % (v/v) durante 10 minutos. La membrana se lavó varias veces con agua bidestilada y los marcadores de peso molecular se señalaron con un punto en el centro de la banda utilizando un marcador indeleble.

#### **8.14.4. Western blotting**

Las membranas de nitrocelulosa conteniendo las proteínas electrotransferidas fueron lavadas con buffer PBS e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, en buffer de bloqueo (100 ml PBS conteniendo 3 g leche descremada y 100  $\mu\text{l}$  de Tween 20) con la finalidad de rellenar los sitios de la membrana a los cuales no se hubieran unido las proteínas proveniente del gel de poliacrilamida. Luego, las membranas se sumergieron durante tres horas (con agitación) en 30 ml de una dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal anti-peptidasa de alcaucil (anticuerpo primario) en buffer de lavado (PBST), consistente en una solución al 3 ‰ de Tween 20 en PBS. Las membranas se lavaron tres veces con PBST durante 10 minutos para retirar el exceso de anticuerpo o el que estuviera unido inespecíficamente a proteínas. Luego se incubaron durante 1 hora con una dilución 1:1000 en PBST del anticuerpo secundario: anticuerpo de cabra anti IgG (H+L) de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Zymed Laboratories®). Después de lavar las membranas con PBST tres veces durante 10 minutos cada una, se reveló la actividad peroxidásica con diazaminobencidina (DAB) en presencia de 0,1 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 vol). La reacción se detuvo lavando las membranas con agua destilada, las que luego se secaron al aire.

#### **8.15. SECUENCIA AMINOTERMINAL**

Una muestra de la fracción con mayor actividad coagulante específica, obtenida por cromatografía de intercambio aniónico, fue corrida en SDS-PAGE y la banda de menor peso molecular fue electrotransferida a una membrana de PVDF (Millipore) y lavada varias veces con agua deionizada (Matsudaira, 1987).

La secuencia N-terminal de la subunidad menor de la peptidasa aislada de flores de alcaucil fue determinada por el método de degradación de Edman usando un secuenciador proteico automático Beckman LF3000 equipado con un analizador de aminoácidos PTH System Gold (Beckman). La homología con otras peptidasas fue realizada utilizando el servicio en red BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

### **8.16. ESPECTROMETRÍA DE MASA**

La determinación de la masa molecular y del grado de pureza de la fracción electrotransferida fue realizada por espectrometría de masa (MALDI-TOF MS). El espectro de masa MALDI-TOF se obtuvo en un espectrómetro Bruker Biflex equipado con un laser de nitrógeno (337 nm) y usando 19kV como voltaje de aceleración.

La proteína fue separada de la membrana por tratamiento con acetonitrilo al 40 % en agua, conteniendo 0,1 % de ácido trifluoroacético. El acetonitrilo fue eliminado por evaporación y la solución de proteínas (1-10  $\mu$ M) se mezcló con igual volumen de la matriz de ácido sinápínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxincinámico) disuelta en 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua/acetonitrilo 2:1. Se usaron proteínas de masa molecular conocida como estándar<sup>♦</sup>.

---

<sup>♦</sup> La secuencia amino terminal y la espectrometría de masa fueron realizadas en el Institut de Biologia Fonamental de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España.

## 8.17. ELABORACIÓN Y ANÁLISIS DE QUESOS

Las preparaciones crudas de las flores de alcaucil obtenidas como se describe en 8.4.1 fueron examinadas en cuanto a su capacidad coagulante de las leches bovina y caprina. Se realizaron ensayos a escala laboratorio (10 litros de leche) y en la Planta Piloto de la Universidad Nacional de Luján (200 litros) agregando 30 ml de extracto floral (54 mg de proteínas) cada 10 litros de leche. Tanto los *starters* como la metodología utilizada en la manufactura fueron los empleados tradicionalmente para la obtención de los diferentes tipos de quesos, según las normas vigentes del Código Alimentario Nacional.

De acuerdo a Brule & Lenoir (1990) la transformación de la leche en queso implica cuatro etapas:

1. **Coagulación:** modificaciones fisicoquímicas de las micelas de caseína bajo la acción de enzimas proteolíticas que determinan la formación de un entramado proteico denominado *coágulo* o *gel*.
2. **Desuerado:** separación del suero después de la rotura mecánica del coágulo por moldeado y presión; esta operación conduce a la obtención de la *cuajada*.
3. **Salado:** incorporación de sal en la superficie o en la masa.
4. **Afinado:** conjunto de transformaciones bioquímicas de los constituyentes de la cuajada bajo la acción de enzimas, la mayor parte de ellas de origen microbiano.

La modificación de los distintos parámetros tecnológicos utilizados en cada una de ellas permite obtener la variedad de quesos conocida.

### 8.17.1. Elaboración de quesos con leche de vaca

Los quesos se elaboraron empleando extractivos de flores utilizando como control quesos preparados con cuajo bovino. Las condiciones de elaboración fueron las estándar para cuajares bovinos según las normas FAO/OMS (1973).

La leche cruda de vaca se obtuvo del tambo de la Universidad Nacional de Luján, se almacenó a 5°C en un tanque pulmón de acero inoxidable de 500 litros y se pasteurizó a 72°C durante 15 segundos usando un equipo Alfa Laval de 1000 l h<sup>-1</sup>.

Se traspasaron 200 litros de leche pasteurizada a una tina quesera de 500 litros (Bauducco) y usando ácido acético de grado alimentario se llevó la acidez a los grados Dornic<sup>1</sup> adecuados para el queso a elaborar. A la leche acidificada se le agregó el fermento según el tipo de queso y de acuerdo a las concentraciones recomendadas por

---

<sup>1</sup> 10 grados Dornic equivalen a 0,1 % de ácido láctico.

el fabricante y se calentó durante 30-60 minutos. Luego se adicionó el cuajo bovino (Cortafor-T) o el extracto de flores de alcaucil y después de la coagulación se realizaron los lirados y paleados según lo esquematizado en cada caso (*Figuras 6,7y 8*).

Se drenó el suero utilizando primero un liencillo de algodón (tela quesera) y luego moldes (1-1,2 kg), en donde los quesos fueron prensados. El salado se realizó por inmersión en piletas con solución de NaCl (aproximadamente 20°Beaumé)\* y se maduró en cámaras (INCA).

#### *8.17.1.1. Quesos de pasta blanda*

Para producir queso de pasta blanda tipo Cuartirolo se utilizó leche de vaca con 3,20 g % de tenor graso, 3,14 g % de proteínas y 15°Dornic de acidez. El fermento empleado fue TH3 (CHR Hansen's Lab.). Se envasaron y la maduración se realizó en cámara a 7°C durante 21 días (*Figura 6*).

#### *8.17.1.2. Quesos de pasta semidura*

Se elaboraron quesos de pasta semidura tipo Gouda con leche de vaca con 3,40 g % de tenor graso, 3,14 g % de proteínas y 16°Dornic de acidez. El fermento mesófilo empleado fue CHN11 (CHR Hansen's Lab.). Las condiciones de elaboración fueron las estándares para obtener queso Gouda con cuajares bovinos y están descritas en la *Figura 7*.

La maduración se realizó en cámara a 14°C durante 44 días.

Se elaboraron además quesos Gouda aumentando el tiempo de inmersión en NaCl a 30 y 40 horas con la finalidad de analizar el efecto del salado en la maduración. En estos quesos se estudió la evolución del pH, humedad, nitrógeno total y soluble y la hidrólisis de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caseína como se describe en *8.17.3* y *8.17.4*.

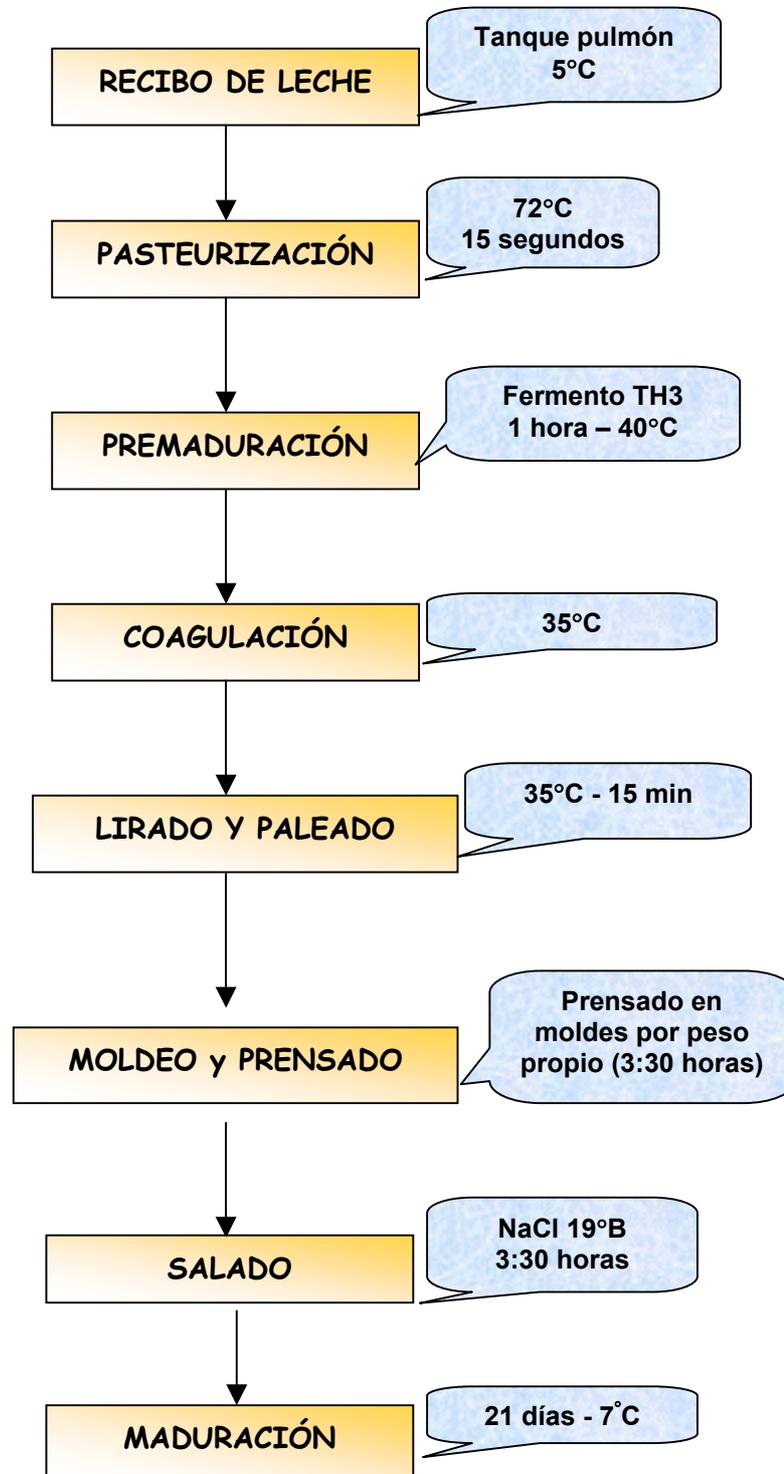
### **8.17.2. Elaboración de quesos con leche de cabra**

La elaboración de quesos de cabra se realizó en una pequeña fábrica artesanal de la provincia de Entre Ríos y según la tecnología allí desarrollada. La leche de cabra pasteurizada se calentó hasta alcanzar 38°C. Como fermento se utilizó TH4 de CHR Hansen's Lab. Después de 30 minutos se ajustó la acidez en 23° Dornic y se agregó el coagulante manteniendo la temperatura en 37°C. Se utilizó cuajo CortaforT (Tuteur) para el queso testigo y extracto crudo de flores de alcaucil (30 ml cada 10 litros de leche) con una concentración de proteínas de 0,8 mg ml<sup>-1</sup> como cuajo vegetal.

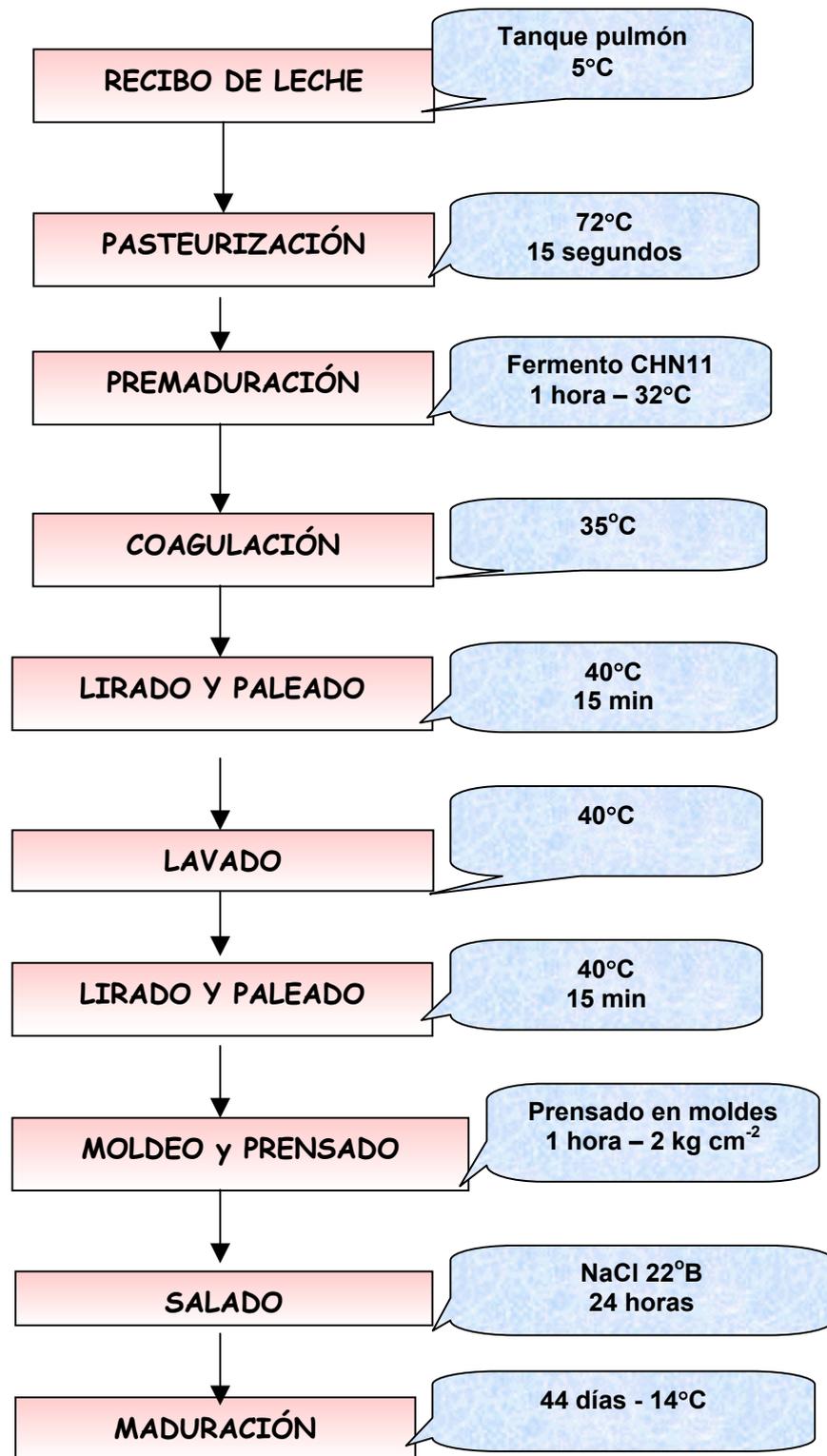
---

\* °Bé (°Beaumé): densidad (determinada con areómetro) correspondiente a g% (p/v) de NaCl

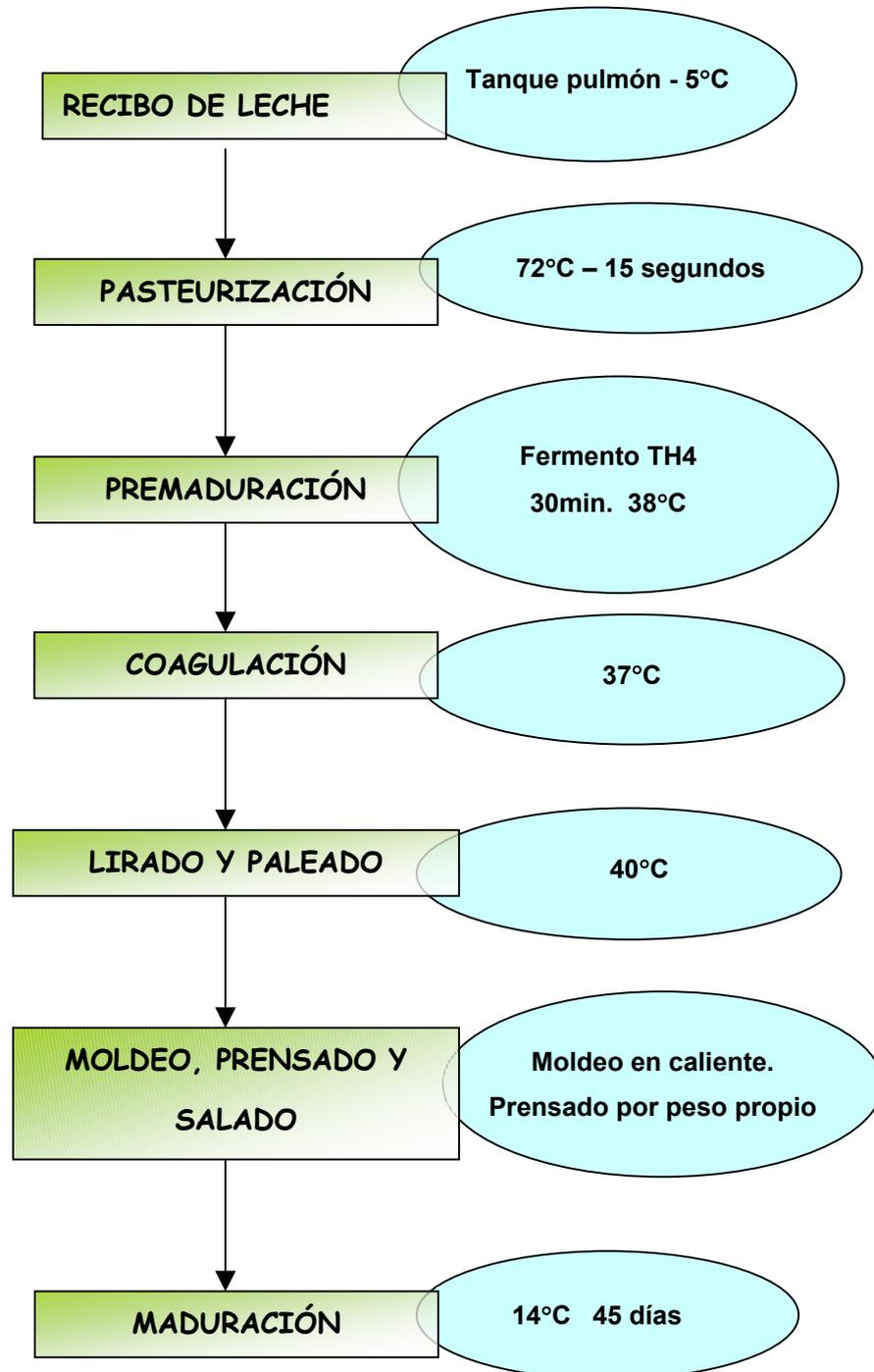
La masa se cortó y se eliminó el suero. Después de desmenuzarla con un batidor se calentó a 40°C, se colocó en moldes y se prensó por peso propio durante toda la noche. Los quesos salados fueron almacenados durante 45 días a 14°C (Figura 8).



**Figura 6.-** Operaciones y parámetros tecnológicos en la elaboración de queso Cuartirolo



**Figura 7.-** Operaciones y parámetros tecnológicos en la elaboración de queso Gouda.



**Figura 8.-** Operaciones y parámetros tecnológicos en la producción de quesos de cabra

### 8.17.3. Análisis fisicoquímicos

Se estudió la evolución del pH, humedad, nitrógeno total y soluble y proteólisis de caseínas en quesos tipo Gouda elaborados con extractos de flores de alcaucil en los que se incrementó el tiempo de salado a 30 y 40 horas. Como testigos se utilizaron quesos preparados con cuajo bovino en las condiciones estándar descritas anteriormente. Se analizaron muestras maduradas durante 2, 6, 9, 16, 23, 30, 35 y 44 días.

El **pH** interno y en superficie de los quesos fue medido con un electrodo Hanna Instruments con cubierta plástica protectora.

El porcentaje de **humedad** se determinó por duplicado por el método de secado en estufa de vacío, en donde 3 gramos fueron secados a 100°C y 100 mm Hg hasta peso constante como se describe en la norma 16259 de los métodos oficiales de análisis de la AOAC (1984).

El contenido de **nitrógeno** (total y soluble) fue determinado por el semimicrométodo de Kjeldahl según lo especificado en el método 16274 de la AOAC (1984). El nitrógeno soluble en agua se evaluó previa homogeneización de las muestras de queso (x g) con 2x ml de agua durante 5 minutos, utilizando un vortex, de acuerdo al procedimiento descrito por Sousa & Malcata (1997). Después de incubar la mezcla durante 1 hora a 40°C se removió el material insoluble por centrifugación a 10000g y 4°C (Sorval) durante 30 minutos y el sobrenadante se filtró. Las fracciones solubles e insolubles en agua se congelaron a -20°C hasta su uso.

### 8.17.4. Electroforesis de quesos

El grado de proteólisis de las caseínas de los quesos se evaluó por electroforesis en gel de poliacrilamida con urea adaptando la técnica de Andrews (1983) para geles planos según Shalabi & Fox (1987).

#### *8.17.4.1. Preparación de las muestras*

**Caseínas de la leche.** Con la finalidad de utilizarla como control se precipitó la caseína de la leche fresca de vaca proveniente del tambo de la UNLu por acidificación a pH 4,2-4,3 con HCl 6 M a 37°C durante 30 minutos y se centrifugó a 6000g por 10 minutos. El precipitado fue recuperado por filtración, lavado 3 veces con agua y rediseuelto con el buffer de muestra pH 7,6 (1:2). El homogenato se centrifugó a 10000g y a 1 ml del sobrenadante se le agregaron 0,8 ml del mismo buffer.

**Caseínas del queso.** Las fracciones solubles e insolubles en agua de los quesos fueron separadas como se indicó anteriormente para la determinación del contenido de nitrógeno.

La fracción insoluble del queso fue disuelta en buffer Tris-HCl 0,6M de pH 7,6 conteniendo urea 8M (4 ml de buffer por cada 0,7 g de masa insoluble húmeda), agitando en vórtex. El homogenato colocado en tubos Eppendorf fue centrifugado a 10000g durante 5 minutos y el sobrenadante se recentrifugó en las mismas condiciones.

Se adicionaron 0,8 ml de buffer de muestra (2-mercaptoetanol, azul de bromofenol y glicerol) a cada ml de las muestras de queso.

#### *8.17.4.2. Desarrollo de la electroforesis*

Los geles (7 cm x 8 cm x 0.75 mm) se prepararon empleando los soportes del equipo Mini Protean II (Bio-Rad) con una concentración de acrilamida al 12,5 % en el gel de resolución y del 4,2 % en el gel concentrador preparada en buffer Tris-HCl-urea pH 8,9 el primero y en buffer Tris-HCl-urea de pH 7,6 el gel concentrador. Como buffer de corrida se utilizó Tris-glicina 25mM. Se sembraron 5  $\mu$ l de las muestras con jeringa Hamilton. La corrida se desarrolló en un equipo Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad) durante 60 minutos a voltaje constante (280 V), empleando una fuente PowerPac 300 (Bio-Rad). Para colorear se usó Coomassie Blue R250.

#### *8.17.4.3. Análisis de los resultados*

La cuantificación de las caseínas  $\beta$  y  $\alpha_s$  fue realizada por densitometría, escaneando los geles y utilizando el programa Scion Image (Scion Corp.) para cuantificar el área de las bandas proteicas.

#### **8.17.5. Análisis sensorial**

Para el análisis sensorial se efectuaron test discriminativos (Lawless & Heymann, 1999) de los productos elaborados a fin de detectar diferencias entre los quesos obtenidos con cuajo bovino y con extracto de flor de alcaucil. Se trabajó con un panel de 12 jueces entrenados que realizaron pruebas triangulares con dos muestra iguales y una diferente.

Se analizó la textura, cremosidad, derretibilidad y el sabor amargo de los quesos al final de la maduración. Se tomaron las precauciones necesarias para aleatorizar las muestras, enmascarar la identidad de las mismas y minimizar los contrastes y efectos de adaptación.