

9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. EXPRESIÓN DE PEPTIDASAS EN EXTRACTOS DE DIFERENTES ÓRGANOS DE LA PLANTA DE ALCAUCIL

La presencia de peptidasas en diferentes órganos de *Cynara scolymus* L. cultivar Green Globe ha sido investigada analizando el contenido de proteínas, la actividad proteolítica sobre caseína ($U_{cas} \text{ ml}^{-1}$) y la actividad coagulante de la leche ($UCL \text{ ml}^{-1}$) de los extractos acetónicos de diferentes partes de la inflorescencia, así como de hojas, raíces y rizomas. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 12* y en la *Figura 9*.

Tabla 12.- Contenido de proteínas, actividad proteolítica y coagulante de extractos acetónicos de diferentes órganos de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe.

Órganos de la planta	Proteínas ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Actividad proteolítica ($U_{cas} \text{ ml}^{-1}$)	Actividad coagulante ($UCL \text{ ml}^{-1}$)
Raíces	96±24	0,04±0,01	0
Rizomas	83±18	0,05±0,01	0
Hojas jóvenes (< 20 cm)	151±13	0,17±0,02	0
Hojas adultas (>50 cm)	128±36	0,44±0,03	1,33±0,15
Nervaduras	51±11	0,06±0,01	0
Receptáculos	110±10	0,21±0,02	0
Brácteas jóvenes (< 2 cm)	147±27	0,08±0,01	0
Brácteas adultas (> 5 cm)	73±15	0,09±0,01	0
Tallos de la Inflorescencia	125±15	0,23±0,02	0
Flores inmaduras (<10 mm)	455±45	0,66±0,03	2,67±0,15
Papus	302±8	1,48±0,12	9,20±0,30
Flores maduras (>50 mm)	801±48	5,67±0,30	30,33±3,51

UCL (unidad coagulante de la leche): cantidad de enzima necesaria para coagular 1 ml de leche en 40 minutos y a 37°C. **Ucas** (unidad caseinolítica): cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm, sobre caseína a pH 6 y 37°C. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n=5). Se indica la desviación estándar de las medias.

El contenido de proteínas de los extractos acetónicos de los diferentes órganos varió entre 50 y 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Las raíces, rizomas, hojas jóvenes y nervaduras, así como los receptáculos, brácteas y tallos de las inflorescencias mostraron baja actividad caseinolítica a pH 6. Las mayores actividades relativas fueron obtenidas en las flores maduras (100 %), en el papus (26,1 %), en las flores inmaduras (11,6 %) y en las hojas adultas (7,8 %).

Los extractos coagularon la leche de acuerdo con la actividad indicada en la *Tabla 12*, lo que representa una actividad coagulante relativa del 100 % en flores, del 30,3% en el papus, del 8,8 % en las flores inmaduras y del 4,4 % en las hojas adultas. No se detectó actividad coagulante en raíces, rizomas, hojas jóvenes ni en nervaduras, ni tampoco en receptáculos, brácteas y tallos de las inflorescencias, durante el tiempo del ensayo (300 minutos).

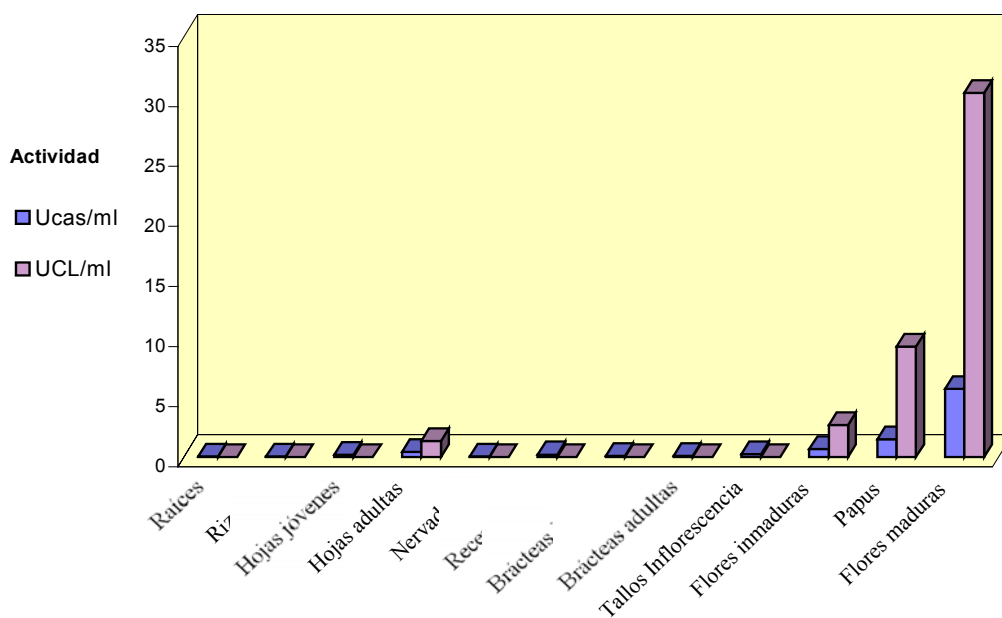


Figura 9.- Actividad proteolítica (Ucas ml^{-1}) y coagulante de la leche (UCL ml^{-1}) de diferentes órganos de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe.

La cisteína (5 mM) produjo un incremento en la actividad caseinolítica de los extractos acetónicos de raíces, hojas, nervaduras, receptáculos y tallos de las inflorescencias (*Tabla 13*), lo que sugiere la presencia de peptidasas cisteínicas en dichos órganos, principalmente en las hojas jóvenes y de la inflorescencia.

La actividad peptidásica de las muestras procedentes de las flores maduras, flores inmaduras, papus, hojas adultas y raíces fue inhibida por pepstatina A, en los porcentajes indicados en la *Tabla 13*.

La adición de E-64 (inhibidor de peptidasas cisteínicas) provocó la inactivación parcial de todas las muestras en proporciones muy variables (*Tabla 13*).

Tabla 13.- Efecto de la cisteína, pepstatina y E-64 sobre la actividad peptidásica (caseína a pH 6) de los extractos acetónicos de diferentes órganos de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe.

Órganos de la planta	Porcentaje de activación		Porcentaje de inhibición	
	Cisteína (5 mM)	Pepstatina A (1 μ M)	E-64 (10 μ M)	
Raíces	86	18	78	
Rizomas	35	0	50	
Hojas jóvenes (<10 cm)	230	0	92	
Hojas adultas (>50 cm)	45	32	45	
Nervaduras	80	0	70	
Receptáculos	36	0	50	
Tallos de la Inflorescencia	39	0	55	
Hojas de la Inflorescencia	190	0	90	
Flores inmaduras (<10 mm)	0	60	14	
Papus	0	54	16	
Flores maduras	0	95	7	

Como no se ha encontrado en la bibliografía un estudio de la actividad proteolítica y coagulante de diferentes órganos del alcaucil, estos resultados fueron comparados con los obtenidos por Cordeiro *et al.* (1994a) en otra especie del mismo género: *C. cardunculus* L. Se observó coincidencia en los órganos que tienen actividad coagulante, con excepción de los extractos de hojas adultas, en los que –contrariamente a lo observado en alcaucil– Cordeiro *et al.* (1994a) no detectaron peptidasas coagulantes de la leche, aún extendiendo el tiempo del ensayo hasta los 480 minutos.

9.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS PREPARACIONES CRUDAS DE FLORES MADURAS

Se consideró necesario caracterizar los extractos crudos de flores de alcaucil considerando el uso potencial de esa preparación enzimática en la tecnología de alimentos y que en las aplicaciones industriales la pureza de la enzima es usualmente de

importancia secundaria al costo, utilizándose extractos crudos o sólo parcialmente purificados (Illanes, 1994).

Las preparaciones crudas de las flores maduras fueron caracterizadas mediante la determinación del efecto del pH, de la temperatura y de activadores e inhibidores sobre la actividad peptidásica de un extracto de flores en buffer fosfato de potasio 0,1 M de pH 7.

9.2.1. Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de la preparación cruda de las flores se muestra en la *Figura 10*. En ella pueden observarse las variaciones que experimentó la actividad caseinolítica a lo largo del tiempo con respecto al valor inicial, para cada una de las temperaturas a las que se realizó el ensayo.

La actividad caseinolítica prácticamente no sufrió cambios después de mantener la enzima durante 3 horas a 37°C y fue aceptablemente elevada después de 3 horas a 45°C (70 % de actividad residual). La inactivación parcial de la enzima a los 55°C se tradujo en una rápida disminución de la actividad residual (56 % a los 10 minutos y 18 % a las 3 horas). La actividad a los 65°C se redujo bruscamente al 27 % en 5 minutos.

Estos resultados indican que la peptidasa de alcaucil fue más estable a 37°C que la cynarasa 3 de *C. cardunculus* estudiada por Heimgartner *et al.* (1990) y que a mayores temperaturas presentó similar estabilidad. Al comparar con el extracto crudo de tallos de *Dieffenbachia maculata* se observó una menor estabilidad de la peptidasa de alcaucil a 45 y 55°C (Padmanabhan *et al.*, 1993). Las cardosinas también presentan mayor estabilidad térmica, ya que son estables a temperaturas superiores a 60°C (Veríssimo *et al.*, 1996).

El comportamiento térmico de la peptidasa presente en flores de alcaucil representa un aspecto positivo en cuanto a su probable utilización en la fabricación de quesos, dado que la actividad peptidásica se inactiva por un calentamiento moderado.

9.2.2. Efecto del pH sobre la actividad peptidásica

Dado que la caseína precipita a pH menores de 6, se utilizaron hemoglobina y azocaseína como sustratos para realizar el ensayo del efecto del pH sobre la actividad peptidásica. El rango de pH ensayado utilizando hemoglobina bovina (Sigma) como sustrato fue de 2,7 a 10 y con azocaseína de 4 a 8.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 11*. La máxima actividad de la preparación cruda de las flores maduras fue obtenida a pH ácido, observándose más del 90 % de actividad hemoglobinolítica en el rango de pH 3,5 a 5; entre pH 3 a 6 la actividad proteolítica fue \geq al 50 % del valor máximo y el pH óptimo fue 4.

Usando azocaseína como sustrato la máxima actividad se registró a pH 4,5 – 5,0.

El comportamiento de esta preparación enzimática a diferentes valores de pH resulta así coincidente con el de las peptidasas aspárticas, en las que la máxima actividad proteolítica se expresa a pH ácido (Barret *et al.*, 1998). En el apartado 3.1 (Introducción) se presenta un cuadro comparativo de las peptidasas aspárticas vegetales, donde puede comprobarse que los valores de pH óptimo varían entre 2,2 y 5,6.

9.2.3. Efecto de activadores e inhibidores

Con la finalidad de conocer el grupo mecanístico al que pertenecen las peptidasas presentes en las flores maduras se evaluó el efecto de distintos activadores e inhibidores.

La adición de cisteína no modificó la actividad proteolítica sobre caseína a pH 6, mientras que la pepstatina produjo una inhibición prácticamente total (95 %) y el E-64 inhibió en un 7 % la actividad peptidásica. Estos resultados con los extractos crudos de flores fueron coincidentes con los obtenidos en los ensayos de inhibición-activación usando extractos acetónicos y mostrados en la *Tabla 13*.

Por otro lado, los extractos crudos de las flores fueron escasamente inhibidos (menos del 5 %) por PMSF y 1,10-fenantrolina y por lo tanto la presencia de serín- y metalopeptidasas fue considerada despreciable.

Los datos anteriores permiten concluir que las peptidasas presentes en las flores maduras de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe pertenecen al grupo de las peptidasas aspárticas.

9.2.4. Expresión de la actividad peptidásica frente a diferentes sustratos

En la *Tabla 14* se muestra la actividad de las peptidasas presentes en los extractos crudos en buffer de las flores de *C. scolymus* L. sobre caseína, azocaseína, leche descremada y hemoglobina.

Tabla 14.- Actividad peptidásica de los extractos crudos de las flores de *C. scolymus* L. cv. Green Globe sobre diferentes sustratos. En cada caso se indica el pH de la mezcla de reacción.

Sustrato	Buffer	pH	Actividad peptidásica
Caseína	Fosfato potásico 0,1 M	6	9,80 Ucas ml ⁻¹
Azocaseína	Fosfato potásico 0,1 M	6	0,81 U _{azoc} ml ⁻¹
Leche descremada	Fosfato potásico 0,1 M	6	266,67 UCL. ml ⁻¹
Hemoglobina	Acido cítrico-citrato 0,2 M	4	5,50 U _{Anson} ml ⁻¹

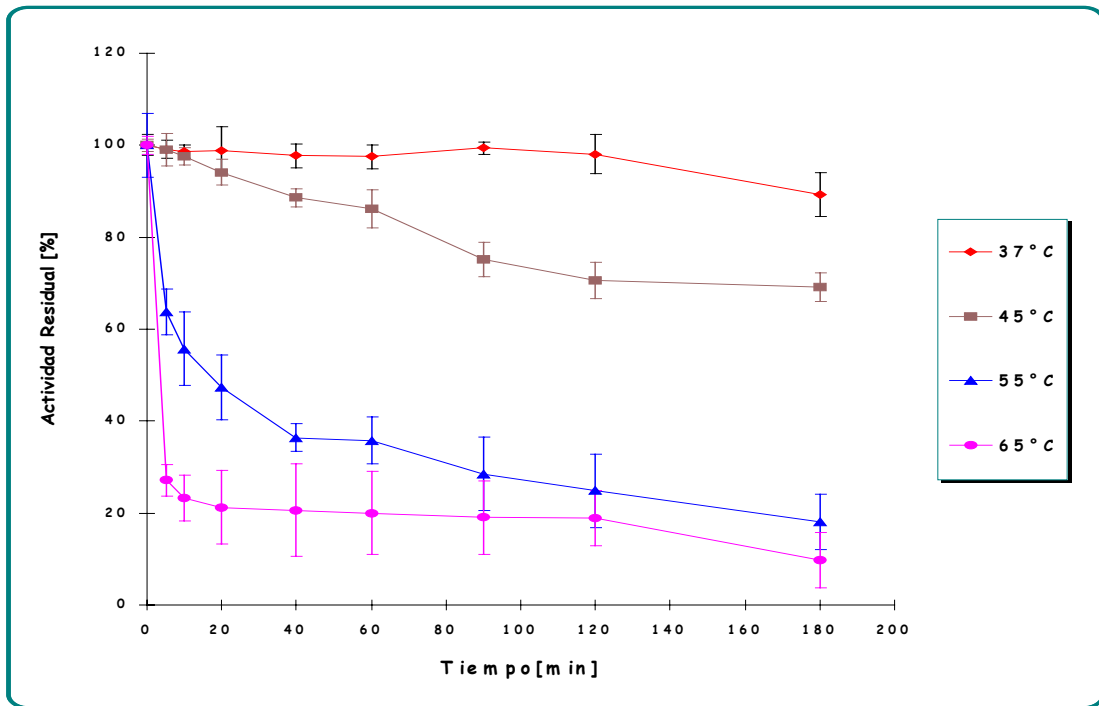


Figura 10.- Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre la actividad de la preparación cruda de las flores maduras. Se midió la actividad residual sobre caseína (pH 6) al finalizar cada período de incubación y a cada una de las temperaturas ensayadas. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n=5). Las barras representan la desviación estándar de las medias.

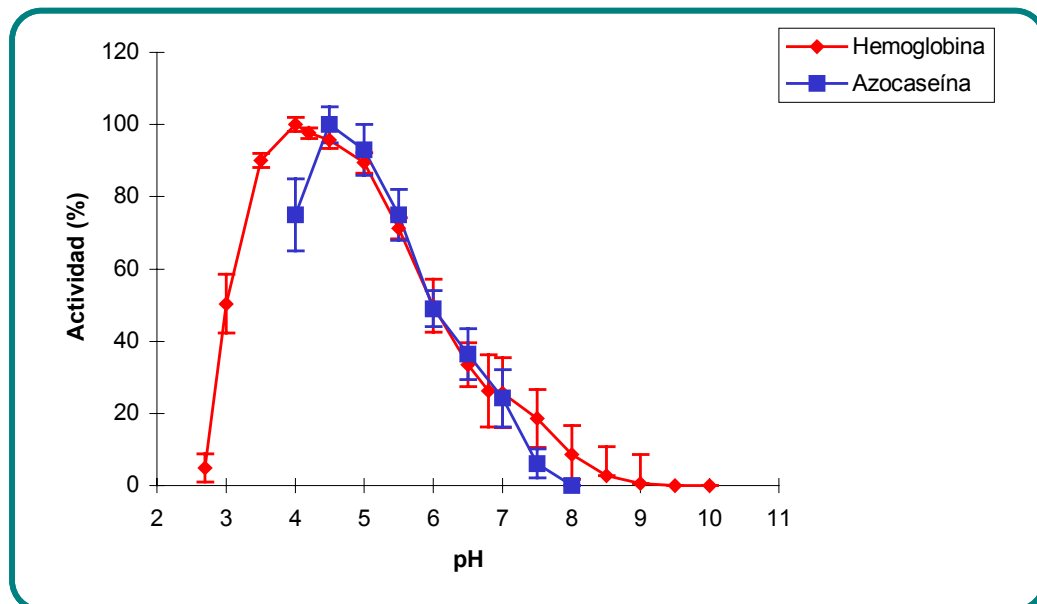


Figura 11.- Efecto del pH sobre la actividad peptidásica de la preparación cruda de las flores maduras. Los valores consignados corresponden al pH de las mezclas de reacción. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n=5). Las barras representan la desviación estándar de las medias.

9.2.5. Isoelectroenfoque y zimograma

Con la finalidad de definir la estrategia de purificación se analizaron las proteínas del extracto crudo de las flores maduras de alcaucil mediante isoelectroenfoque con anfólitos en el rango de pH 3-10. Luego se reveló la actividad peptidásica de las proteínas separadas basándose en su pI, mediante un zimograma que se desarrolló poniendo en contacto el gel de poliacrilamida del IEF con una placa de agarosa incubada con hemoglobina pH 4.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 12*. En el zimograma se observó que las proteínas con actividad peptidásica sobre hemoglobina a pH 4 se enfocaron en la zona cercana a pI= 4. Además, en el isoelectroenfoque se observaron varias bandas en esa zona de pI, hecho que puso en evidencia la heterogeneidad proteolítica de la muestra en estudio.

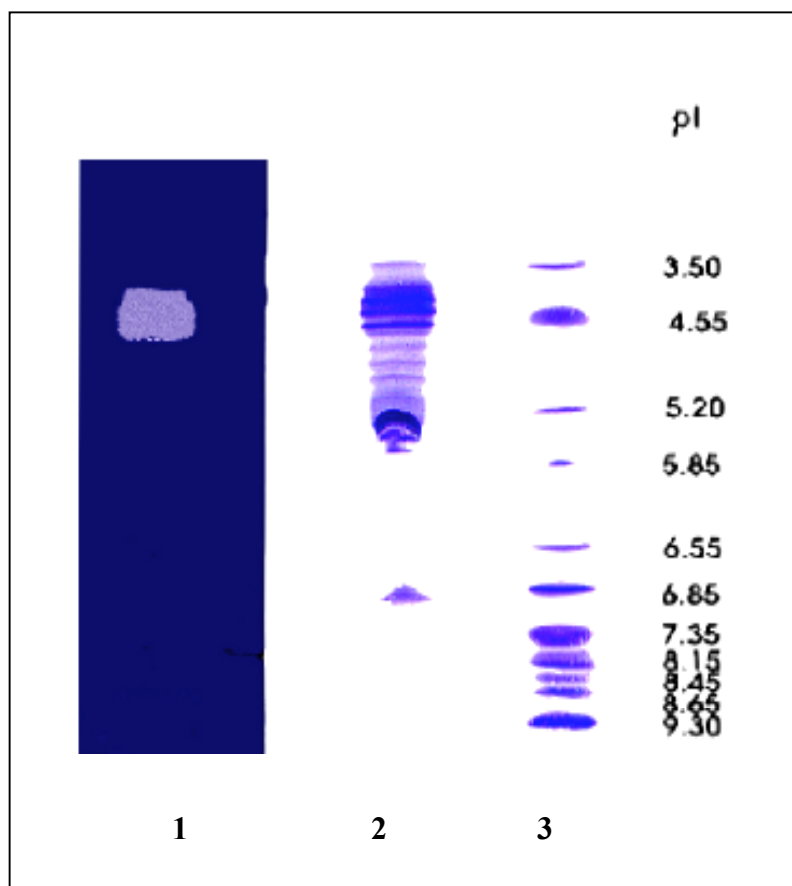


Figura 12.- Isoelectroenfoque y zimograma de las peptidasas del extracto crudo de las flores de alcaucil. Calle 1: zimograma revelado con hemoglobina a pH 4. Calle 2: IEF del extracto crudo.

Calle 3: marcadores de pI (Broad pI kit, Pharmacia).

9.3. PURIFICACIÓN DE LAS PEPTIDASAS DE FLORES DE ALCAUCIL

Se diseñaron diferentes estrategias para realizar la purificación de las proteínas coagulantes de la leche presentes en las flores de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe.

9.3.1. Precipitación con acetona

Este tratamiento permite eliminar pigmentos solubles e hidratos de carbono que podrían inactivar las peptidasas y que aumentan la viscosidad de las soluciones, dificultando la migración de las proteínas tanto en las cromatografías como en las electroforesis.

Las proteínas contenidas en las flores fueron precipitadas con 3 volúmenes de acetona y redisueltas en buffer fosfato de potasio 0,1 M de pH 6 (1:5). El contenido proteico de este extracto fue de 0,8 mg ml⁻¹, presentó una actividad proteolítica sobre caseína de 5,67 U_{cas} ml⁻¹ y una actividad coagulante de la leche de 30,33 UCL ml⁻¹.

Al comparar los datos de los extractos acetónicos con los obtenidos en los extractivos crudos en buffer se observó que con la precipitación acetónica sólo se conservó el 44 % de las proteínas y el 58 % de la actividad caseinolítica (*Tabla 15*). Más importantes aún fueron las pérdidas en la actividad coagulante de la leche, que disminuyó un 88 % (*Tabla 16*).

Dado el escaso rendimiento de este primer paso de purificación se decidió encarar otra estrategia.

Tabla 15.- Seguimiento de la purificación de los extractos acetónicos de las flores de *C. scolymus* L. cv. Green Globe, sobre la base de la actividad sobre caseína.

Extractos	Proteínas (mg)	Actividad caseinolítica (U _{cas})	Actividad caseinolítica específica (U _{cas} mg ⁻¹)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Crudo	54	294	5,44	1	100
Acetónico	24	170	7,08	1,3	58

Tabla 16.- Seguimiento de la purificación de los extractos acetónicos de las flores de *C. scolymus* L. cv. Green Globe, basándose en la actividad coagulante de la leche.

Extractos	Proteínas (mg)	Actividad coagulante (UCL ml ⁻¹)	Actividad coagulante específica (UCL mg ⁻¹)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Crudo	54	8000	148,15	1	100
Acetónico	24	910	37,91	0,26	12

9.3.2. Primera estrategia de purificación

9.3.2.1. Extracto crudo en buffer

Las proteínas de las flores de alcaucil fueron extraídas por trituración en frío con buffer fosfato de potasio 0,1 M de pH 7.

Estos extractos crudos tuvieron una concentración proteica de 1,8 mg ml⁻¹. La actividad peptidásica sobre caseína (pH 6) fue de 9,8 U_{cas} ml⁻¹, sobre hemoglobina (pH 4) de 5,5 U_{Anson} ml⁻¹ y la actividad coagulante de la leche fue de 266,7 UCL ml⁻¹.

9.3.2.2. Cromatografía de intercambio iónico

El análisis del isoelectroenfoque y del zimograma del extracto crudo (*Figura 12*), que mostró un pI cercano a 4 de la fracción proteolíticamente activa sobre hemoglobina, nos orientó sobre el intercambiador iónico a utilizar. Por tal motivo se eligió DEAE-Sepharose para realizar una cromatografía de intercambio aniónico en columna.

Al eluir 10 ml de los extractos de las flores con un gradiente lineal de NaCl (0 a 0,4 M) en buffer fosfato 50 mM de pH 6 se obtuvieron seis picos de absorbancia a 280 nm, de los cuales sólo uno (pico 6) presentó actividad proteolítica sobre hemoglobina (*Figura 13A*).

Teniendo en cuenta la concentración de cloruro de sodio a la que eluyó el pico 6, dicha fracción fue recromatografiada en la misma columna con un gradiente salino de 0.20 a 0.35 M. En estas condiciones la cromatografía de intercambio aniónico permitió resolver dos fracciones proteolíticamente activas (*6a* y *6b*) que eluyeron de la columna cuando la concentración del NaCl alcanzó valores entre 0,24 y 0,28 M (*Figura 13B*).

Las actividades proteolíticas específicas de las fracciones *6a* y *6b* fueron de 19,8 y de 3,2 U_{Anson} por mg de proteína, respectivamente.

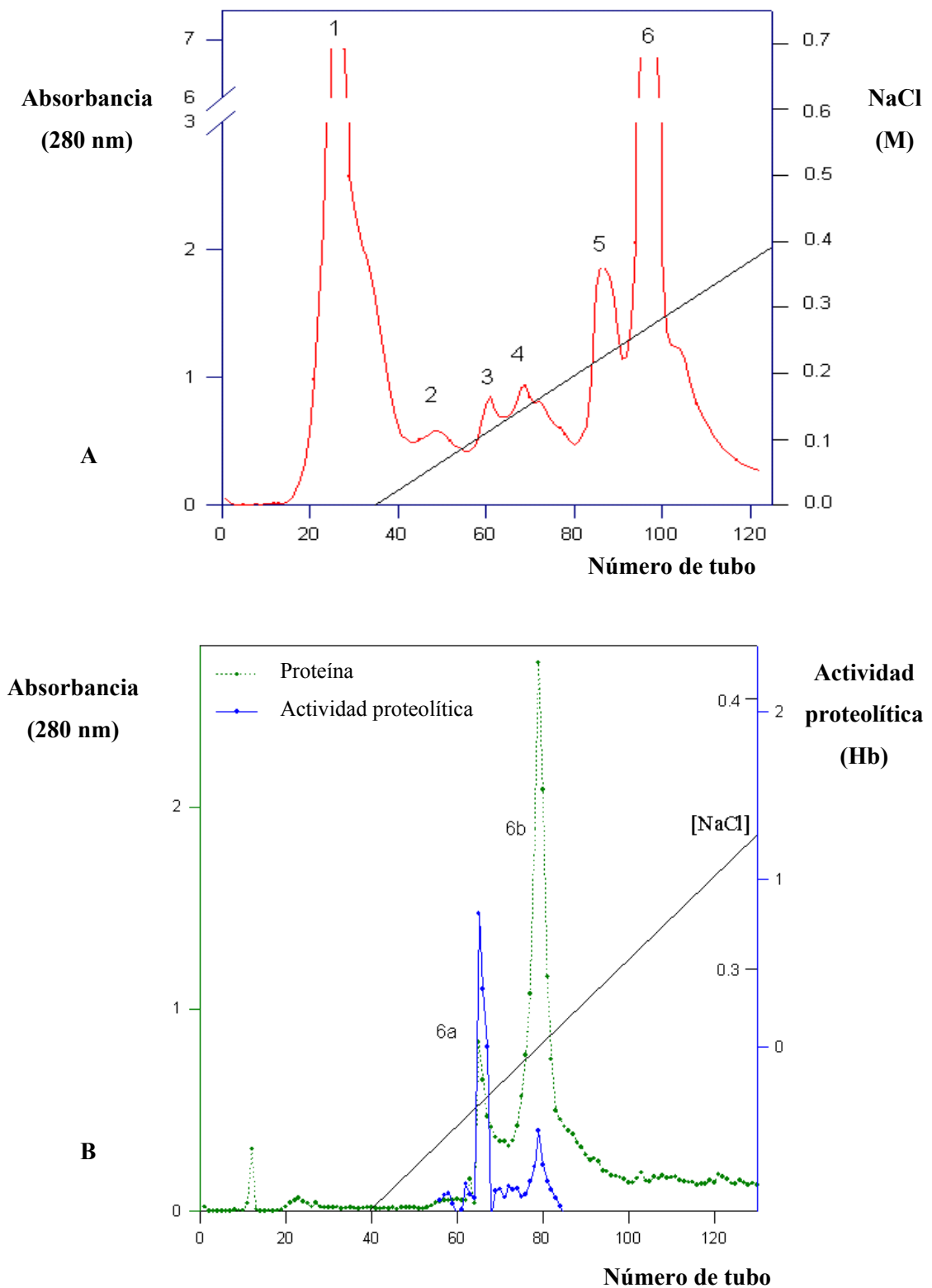


Figura 13.- Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose). A) Extracto crudo de las flores de alcaucil. B) Recromatografía del pico 6.

9.3.2.3. Electroforesis, isoelectroenfoque y zimograma

Los pesos moleculares estimados por el densitograma de la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las dos fracciones purificadas (6a y 6b) fueron de 28,5 y 29,6 kDa, respectivamente (*Figura 14*).

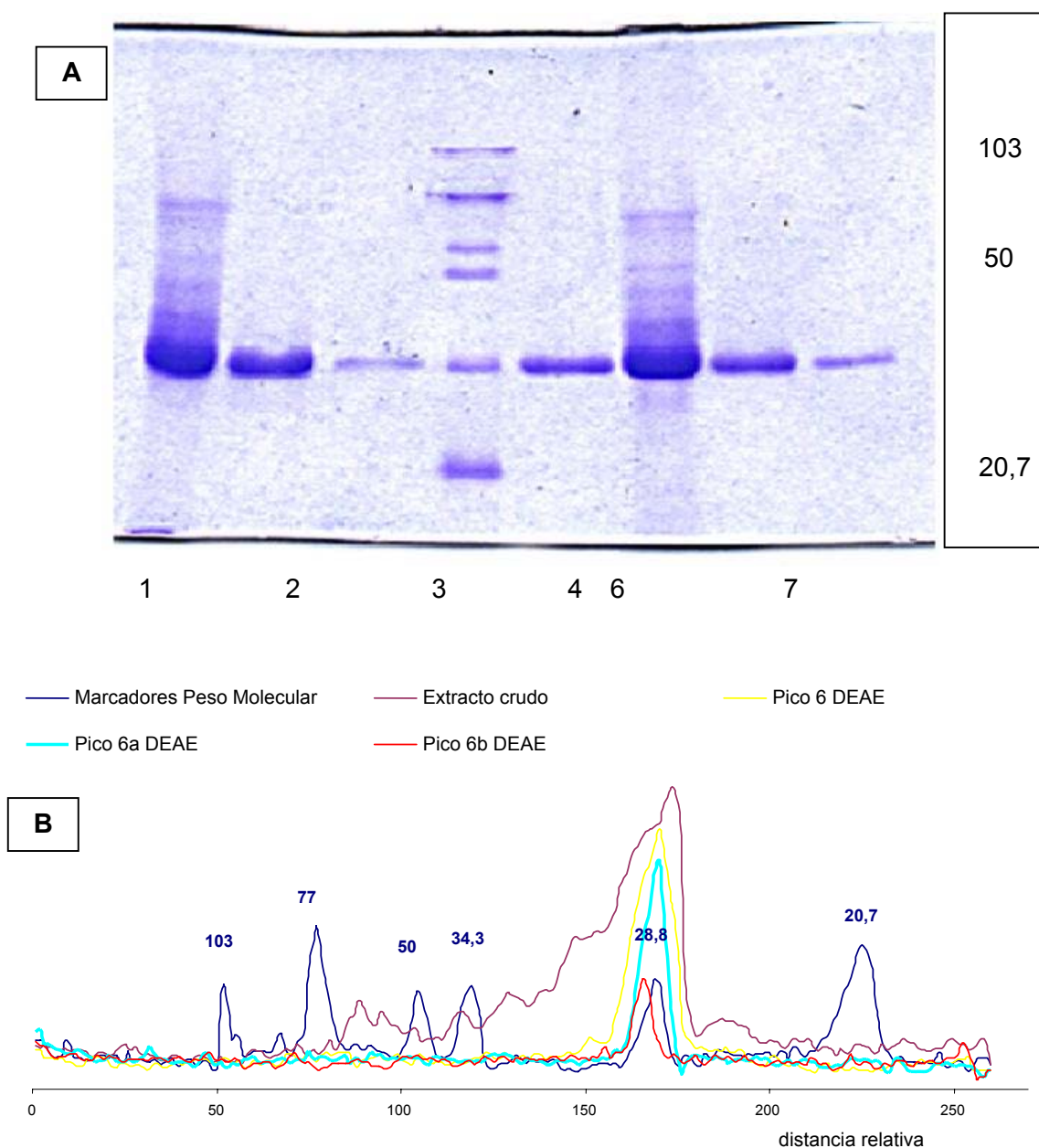


Figura 14.- (A) SDS-PAGE (14 %) y (B) densitograma de las peptidasas de *C. scolymus* L. Calles 1 y 6: extracto crudo. Calle 2: pico 6 (Fig. 13A). Calles 3 y 8: pico 6b (Fig. 13B). Calle 4: marcadores de peso molecular (Bio-Rad low range). Calles 5 y 7: pico 6a (Fig. 13B)

La fracción purificada con mayor actividad proteolítica específica (6a) fue analizada por isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida utilizando un gradiente de pH de 3 a 10 (Figura 15). El pI de la/s proteína/s de dicha fracción, calculado por densitometría, fue de 4,2 (Figura 16).

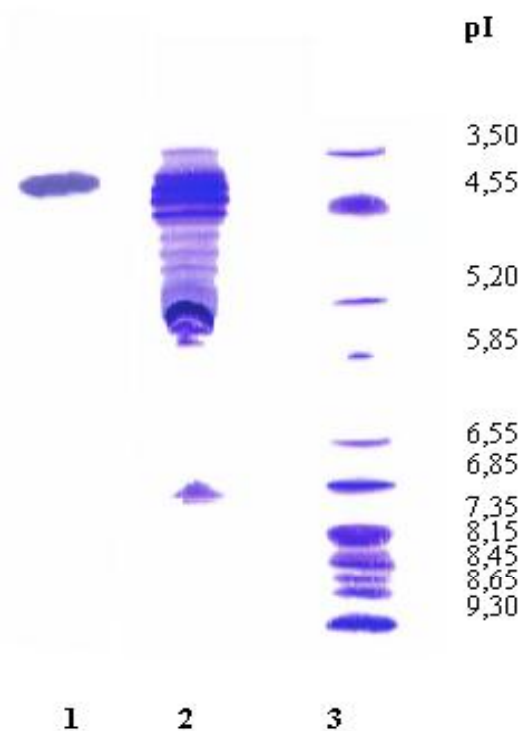


Figura 15.- Isoelectroenfoque de las peptidasas de *C. scolymus* L. Calle 1: Fracción 6a (Fig. 13B). Calle 2: Extracto crudo de flor. Calle 3: Marcadores de pI (Broad pI kit, Pharmacia).

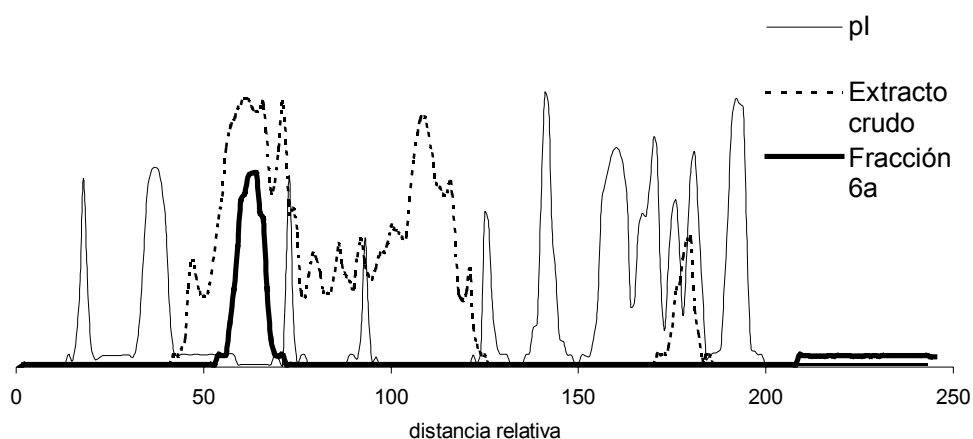


Figura 16.- Densitograma del isoelectroenfoque del extracto crudo de las flores de alcaucil y de la fracción 6a purificada por cromatografía de intercambio iónico.

No se observó actividad proteolítica en los zimogramas obtenidos de los SDS-PAGE bajo condiciones no desnaturalizantes de las fracciones 6a y 6b. Este resultado sugirió la probable naturaleza polimérica de las proteínas aisladas de las flores de alcaucil. Con la finalidad de confirmar esta hipótesis se diagramaron otras estrategias de purificación.

9.3.3. Segunda estrategia de purificación

Otra estrategia de purificación de las proteínas presentes en las flores de alcaucil consistió en realizar una precipitación fraccionada con sulfato de amonio del extracto crudo y en separar las proteínas de la fracción que presentara mayor actividad proteolítica por medio de cromatografía de intercambio aniónico.

9.3.3.1. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

Dado que en el extracto crudo de las flores se detectan pigmentos y otras sustancias que obstaculizan la purificación, dificultando la repetibilidad e inutilizando las columnas de intercambio iónico, se ensayó otra estrategia de purificación que consistió en realizar en primera instancia una precipitación fraccionada con sulfato de amonio de las proteínas presentes en el extracto crudo.

Los extractivos en buffer fosfato de pH 7 de las flores maduras fueron precipitados fraccionadamente con sulfato de amonio al 30, 45, 60 y 80 %. Los precipitados obtenidos con la sal al 30, 45 y 60 % fueron de color marrón-negruzco con sobrenadantes azul-violáceos y una película blanquecina, mientras que en el precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80 % sedimentó un pigmento azul-violáceo junto con las proteínas y el sobrenadante presentó un tinte ligeramente amarillo.

La actividad proteolítica específica sobre hemoglobina a pH 4 mostrada en la *Tabla 17* indicó que en las cuatro fracciones separadas por el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se encuentran peptidasas activas a pH ácido. Además, sólo al precipitar con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80 % se logró una preparación con mayor actividad específica que el extracto crudo.

Tabla 17.- Actividad proteolítica sobre hemoglobina (pH 4) del extracto crudo de flores de alcaucil y de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio.

Muestra	Actividad proteolítica (U_{Anson})	Proteínas (mg)	Actividad específica ($U_{Anson} \text{ mg}^{-1}$)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	55,0	18,0	3,06	1	100
(NH_4)₂SO₄ 30 %	6,0	2,0	3,00	0,98	10,9
(NH_4)₂SO₄ 30-45 %	5,5	2,1	2,62	0,86	10,0
(NH_4)₂SO₄ 45-60 %	12,6	4,7	2,68	0,88	22,9
(NH_4)₂SO₄ 60-80 %	24,2	6,5	3,72	1,22	44,0

Similares resultados se obtuvieron al analizar la actividad coagulante de la leche. La *Tabla 18* muestra que las cuatro fracciones exhibieron actividad coagulante y que esa actividad fue totalmente inhibida por pepstatina. Solamente la fracción precipitada con (NH_4)₂SO₄ al 80 % presentó mayor actividad específica que la contenida en el extracto crudo, con un 44 % de rendimiento.

Tabla 18.- Actividad coagulante de la leche (pH 6) del extracto crudo de flores de alcaucil y de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio, sin y en presencia de pepstatina (0,1 mM).

Muestra	Actividad coagulante de leche (UCL)	Actividad coagulante leche + pepstatina (UCL)	Proteínas (mg)	Actividad específica ($UCL \text{ mg}^{-1}$)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	2666,7	0	18,0	148,15	1	100
SO₄(NH₄)₂ 30 %	266,7	0	2,0	133,35	0,90	10
SO₄(NH₄)₂ 30-45 %	173,9	0	2,1	82,81	0,56	6,52
SO₄(NH₄)₂ 45-60 %	500,0	0	4,7	106,38	0,72	18,75
SO₄(NH₄)₂ 60-80 %	1333,3	0	6,5	205,12	1,38	50

En la *Tabla 19* se muestra la relación entre la actividad coagulante y la actividad proteolítica, que es de importancia en la elección de las peptidasas como sustitutos del cuajo bovino. En ella se observa que la única fracción en la que se incrementa dicha relación con respecto al extracto crudo es la que resulta de la precipitación fraccionada con (NH_4)₂SO₄ al 80 %.

Tabla 19.- Relación entre actividad coagulante (UCL mg^{-1}) y proteolítica ($U_{\text{Anson}} \text{mg}^{-1}$) de los extractos crudos de alcaucil y de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio.

Muestra	UCL U_{Anson}^{-1}	Purificación (veces)
Extracto crudo	48,49	1
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 30 %	44,45	0,92
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 30-45 %	31,62	0,65
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 45-60 %	39,68	0,82
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 60-80 %	55,10	1,14

El análisis por SDS-PAGE revela que los cuatro precipitados presentan en común bandas de aproximadamente 15 y 29 kDa (*Figura 17*).

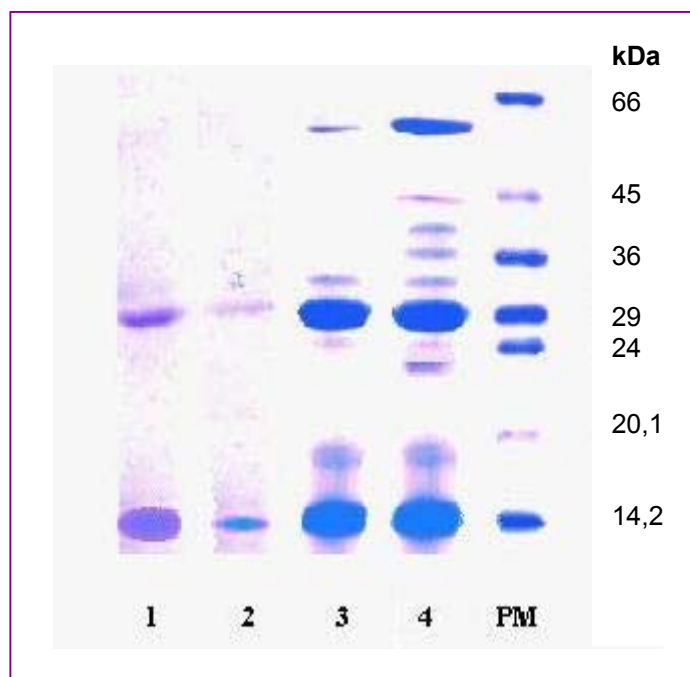


Figura 17.- SDS-PAGE (14%-5%) del extracto crudo de flores de alcaucil precipitado con sulfato de amonio. Calle 1- 30 %; Calle 2- 45 %; Calle 3- 60 %; Calle 4- 80 %; **PM**: marcadores de peso molecular (Sigma MW-SDS-70L)

9.3.3.2. Cromatografía de intercambio iónico

Dado que la mayor actividad coagulante de la leche se obtuvo al precipitar el extracto crudo de las flores con sulfato de amonio entre 60 y 80 %, se procedió a purificar dicha fracción en columna de DEAE-Sepharose Fast Flow eluyendo con un gradiente lineal de NaCl (0 a 0,9 M) en buffer fosfato de pH 6. Se obtuvieron seis picos de proteína (1 a 6)

(Figura 18A). Sólo los picos 3, 4 y 5 presentaron actividad coagulante, con los rendimientos mostrados en la *Tabla 20*. El pigmento azulado eluyó en la fracción 5 junto con la mayor proporción de proteína coagulante de la leche.

El pico 5 fue recromatografiado en las mismas condiciones con un gradiente de NaCl 0,3-0,6 y se obtuvieron tres picos (Figura 18B). Solamente el pico II que eluyó con 0,40 M de NaCl manifestó actividad coagulante (*Tabla 20*).

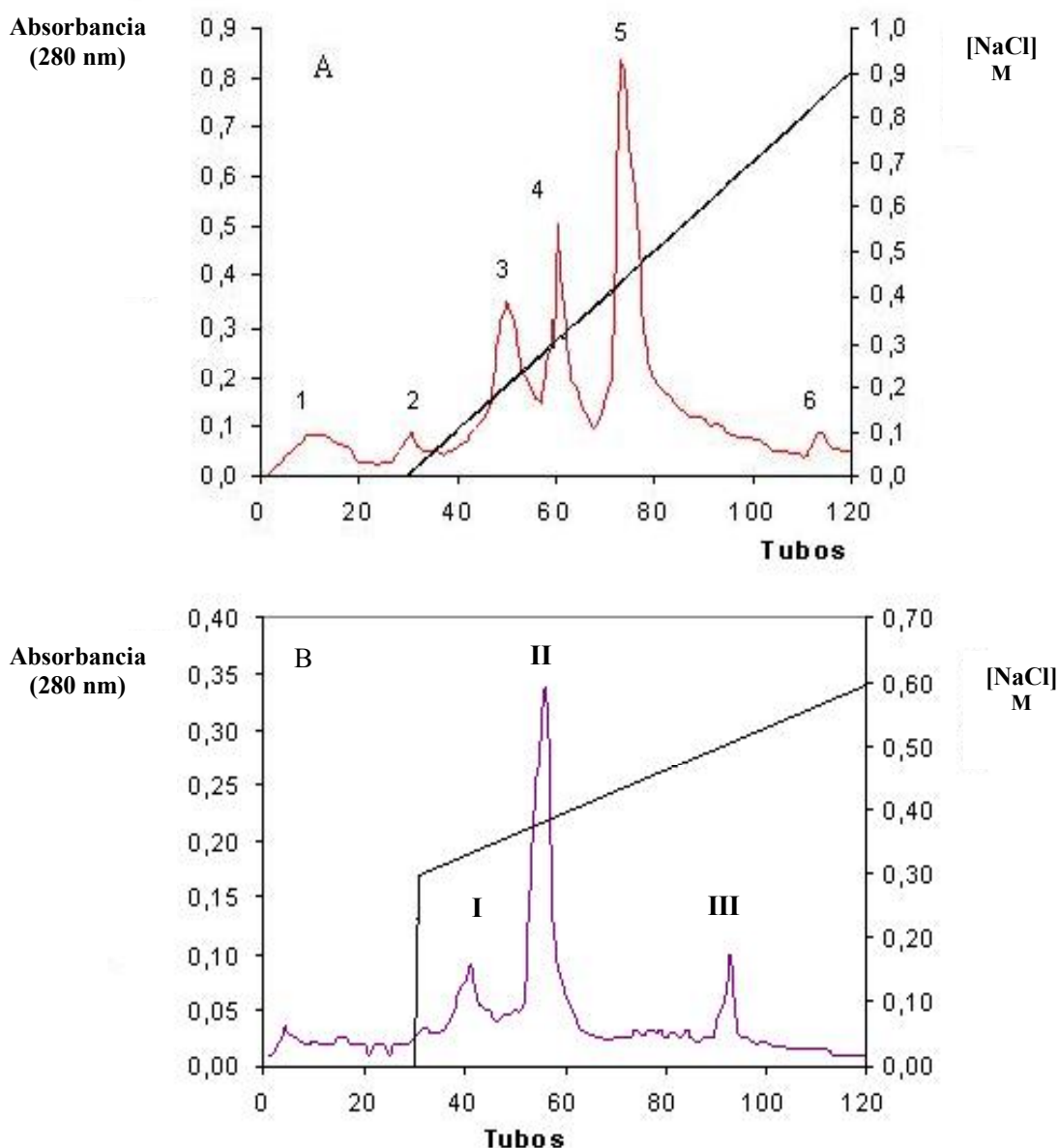


Figura 18.- A.- Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose) del extractivo de flores precipitado con sulfato de amonio 60-80 % con gradiente de cloruro de sodio: 0-0,9 M.

B.- Recromatografía del pico 5 con gradiente de cloruro de sodio 0,3-0,6 M.

Tabla 20.- Actividad coagulante de la fracción precipitada con sulfato de amonio 60-80 % del extracto crudo de flores de alcaucil y de los picos obtenidos por cromatografía de intercambio aniónico (picos 1 a 6) y por recromatografía del pico 5 (picos I a III).

Muestra	Actividad coagulante de la leche (UCL)	Proteínas (mg)	Actividad específica (UCL mg⁻¹)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
SO₄(NH₄)₂ 60-80 %	1333,3	6,5	205,12	1	100
Pico 1	0	0,2	0	0	0
Pico 2	0	0,2	0	0	0
Pico 3	66,7	0,9	74,11	0,36	5
Pico 4	222,2	1,2	185,17	0,90	16,67
Pico 5	580	2,0	290	1,14	43,50
Pico 6	0	0,2	0	0	0
Pico I	0	0,2	0	0	0
Pico II	400	0,7	571,43	2,79	30
Pico III	0	0,1	0	0	0

El resumen y los rendimientos de la estrategia de purificación de las flores de *C. scolymus* L. aquí descrita se presenta en la *Tabla 21*. La precipitación con sulfato de amonio 60-80 % ocasiona la pérdida del 50 % de las peptidasas coagulantes de la leche pero remueve el material viscoso presente en el extracto crudo e incrementa la actividad coagulante específica en un 38 %. La cromatografía y recromatografía en columna de intercambio aniónico hizo posible purificar la enzima 3,9 veces con un rendimiento del 15 % de la actividad del extracto crudo.

Si bien este procedimiento de purificación permitió una baja recuperación de la peptidasa coagulante de la leche de alcaucil, la mayor pérdida (50 %) se produjo al precipitar fraccionadamente con sulfato de amonio para eliminar compuestos que inutilizaban los rellenos cromatográficos y distorsionaban las corridas electroforéticas. Es de destacar que los extractos acetónicos ensayados con la misma finalidad rindieron sólo el 11,4 % de la actividad coagulante inicial, como se muestra en la *Tabla 16*.

Tabla 21.- Resumen y seguimiento de la segunda estrategia de purificación

Muestra	Actividad coagulante de la leche (UCL)	Proteínas (mg)	Actividad específica (UCL mg⁻¹)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	2666,7	18,0	148,15	1	100
(NH₄)₂SO₄ 60-80 %	1333,3	6,5	205,12	1,38	50
Pico 5	580	2,0	290	1,95	21,7
Pico II	400	0,7	571,43	3,86	15

9.3.3.3. Análisis de pureza: electroforesis

La electroforesis nativa del pico II obtenido por cromatografías de intercambio aniónico de los extractos precipitados con sulfato de amonio 60-80 % presentó una única banda de proteína (Figura 19A).

En SDS-PAGE, la banda proteica del pico II se resolvió en dos bandas bien definidas con PM 28,6 y 14,1 kDa. La banda de 28,6 kDa coincidió con la más abundante del extracto crudo de flor (Figura 19B y C).

Además, en el SDS-PAGE del pico 5 se observaron dos bandas tenues cuyos pesos moleculares calculados por densitometría fueron 58 y 34 kDa (dato no mostrado).

Estos resultados sugieren que la peptidasa aislada de flores de alcaucil está formada por dos subunidades de 28,6 y 14,1 kDa. Otras APs de plantas presentan cadenas de pesos moleculares similares tales como las fitepsinas (31 y 15 kDa) de raíces de *Hordeum vulgare* (Glathe *et al.* (1998), las APs (30 y 16 kDa) de flores de *Centaurea calcitrapa* (Domingos *et al.*, 1998) y las de semillas (30 y 11 kDa) de *Cucurbita ficifolia* (Stachowiak *et al.*, 1994). También presentan similitud con el peso molecular de las subunidades de las ciprosinas (Heimgartner *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992, 1994a, b) y de las cardosinas (Faro *et al.*, 1992, 1998; Macedo *et al.*, 1993, Veríssimo *et al.*, 1996) de flores de *Cynara cardunculus* L., cuyas subunidades mayores tienen pesos moleculares entre 31 y 35,5 y los péptidos menores varían entre 13,5 a 16,5 kDa.

La presencia de otras bandas (58 y 34 kDa) podría deberse a que la enzima se produzca como una proenzima y que dichas bandas se correspondan con diferentes grados de procesamiento de esa proenzima. Esta posibilidad se discute más adelante.

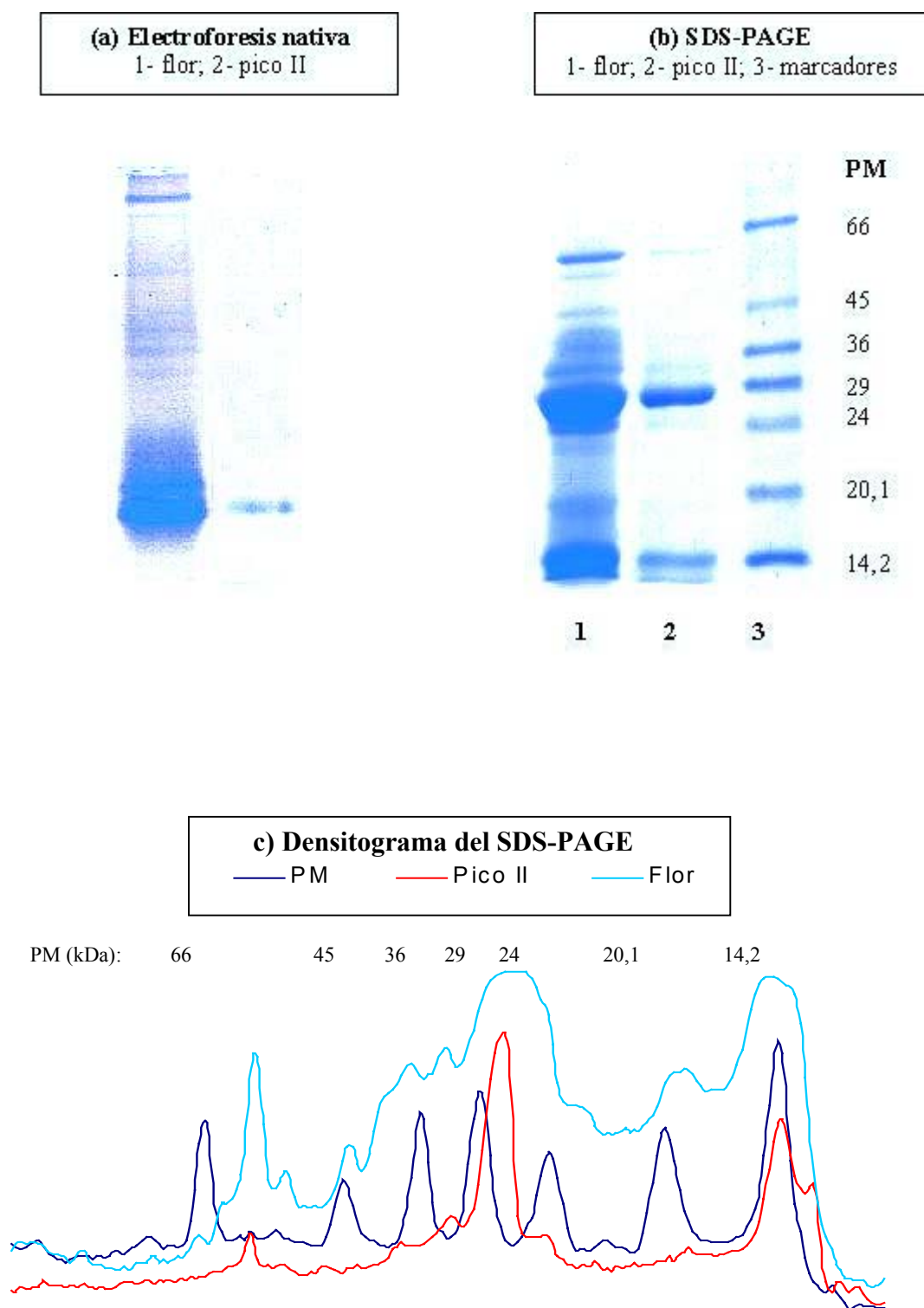


Figura 19.- (A) Electroforesis nativa, **(B)** electroforesis desnaturalizante y **(C)** densitograma del SDS-PAGE del extracto crudo de flores de alcaucil y del pico II de la recromatografía de intercambio aniónico. PM: marcadores de peso molecular (Sigma MW-SDS-70L).

9.3.4. Tercera estrategia de purificación

Los pasos involucrados en esta estrategia de purificación del extractivo de las flores de *C. scolymus* L. cv. Green Globe fueron: adsorción con carbón activado y cromatografías de intercambio aniónico y de afinidad.

9.3.4.1. Adsorción con carbón activado

Los extractivos florales fueron tratados con diferentes concentraciones de carbón activado con la finalidad de eliminar compuestos fenólicos y otras sustancias que podrían interferir con la actividad enzimática y que aumentaban la viscosidad de la muestra. Se usó carbón al 2.5 %, 5 % y 10 % (p/v).

Sólo el tratamiento con 10 % de carbón produjo extractivos translúcidos, recuperándose del extracto crudo el 60 % de la actividad proteolítica sobre hemoglobina y el 69 % de la actividad coagulante y de las proteínas (Tabla 22).

El análisis por IEF (Figura 20) mostró que con 10 % de carbón se eliminaron las proteínas del extracto crudo con pI mayores de 6 y se retuvieron las de pI ácido. El zimograma permitió observar que se conserva la actividad proteolítica.

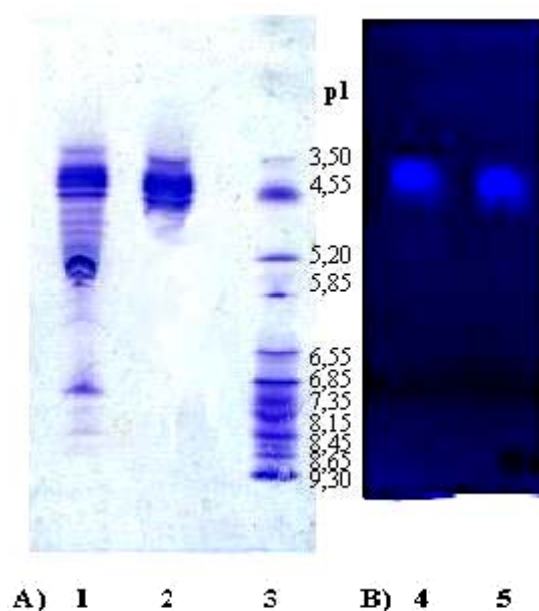


Figura 20.- A) Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida de los extractos de flores de alcaucil. Calle 1: extracto crudo. Calle 2: extracto crudo tratado con carbón. Calle 3: patrones de pI 3,5-9,3 (Farmacia). **B)** Zimograma. Calle 4: extracto crudo tratado con carbón. Calle 5: extracto crudo.

9.3.4.1.1. Caracterización espectrofotométrica UV y visible

En la *Figura 21* se muestran los espectros UV y visible de los extractivos de las flores antes y después del tratamiento con carbón activado al 10 %.

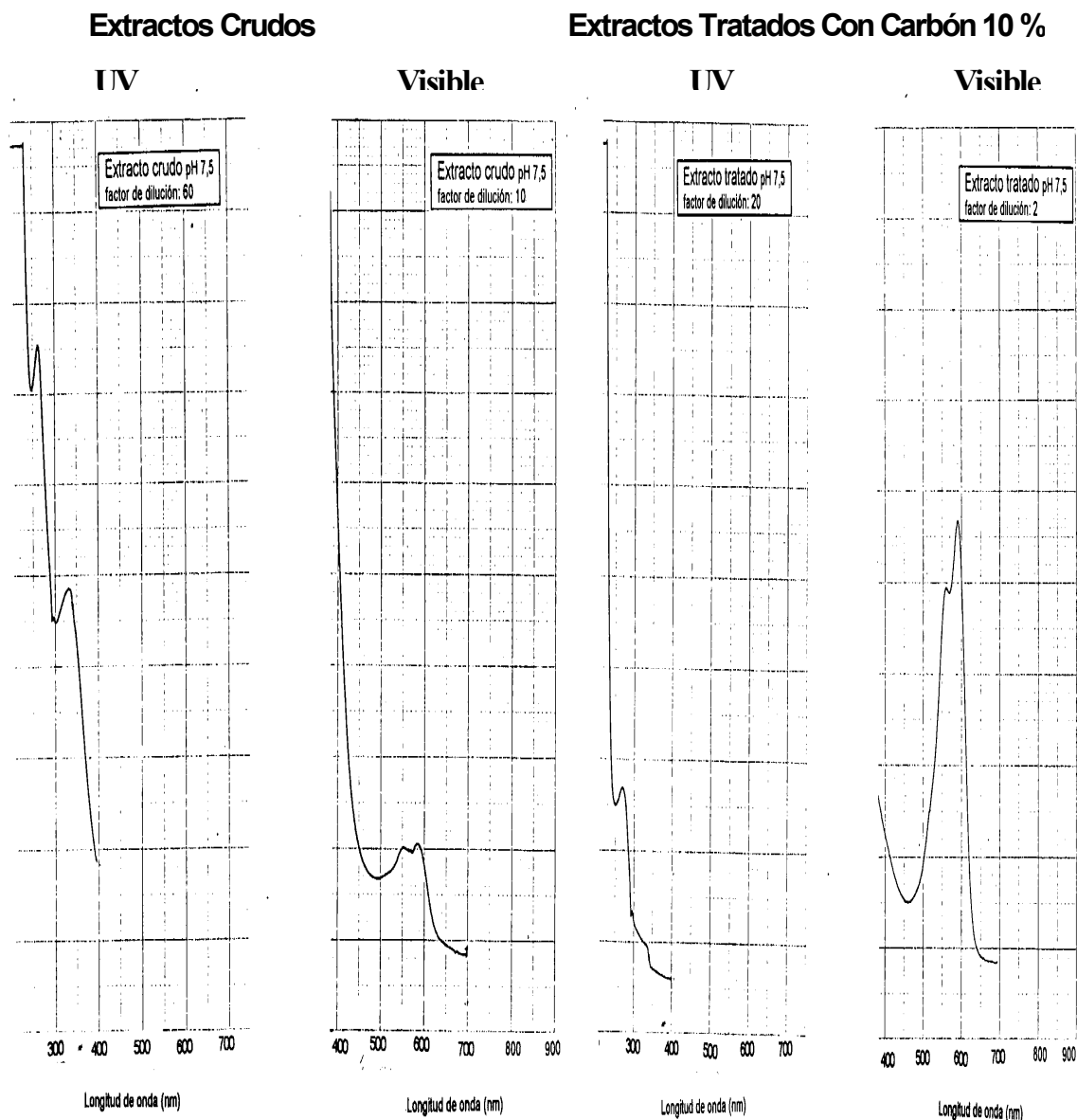


Figura 21.- Espectros UV y visibles de los extractivos de flores antes y después de tratarlos con carbón activado al 10 %.

En el espectro visible del extracto crudo se observaron dos máximos de absorbancia (585 y 550 nm) que corresponden a las longitudes de onda de absorción del pigmento violeta-azulado de dicho extracto y una elevada absorción a 400 nm. Al UV se detectaron tres picos, cuyos máximos a 330, 260 y 220 nm concuerdan con la absorbancia de fenoles, ácidos nucleicos y uniones peptídicas, respectivamente.

El espectro del extractivo tratado con 10 % de carbón activado presentó al visible un pico con dos máximos, coincidentes con los observados en el extracto sin tratar y una importante reducción de la absorbancia a 400 nm. En el espectro UV sólo se observó máxima absorbancia a 280 y 220 nm, coincidente con la de las proteínas.

Por lo tanto, con este método se constató la eliminación de fenoles y otras sustancias que absorben al UV al tratar el extracto crudo de las flores con carbón activado al 10 %.

9.3.4.2. Cromatografía de intercambio iónico

Con la finalidad de resolver la mezcla de proteínas presentes en la preparación enzimática parcialmente purificada por adsorción con carbón, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico eluyendo con un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,35 M en buffer fosfatos 50 mM (pH 6,5). Como se observa en la *Figura 22* se obtuvieron tres fracciones con actividad proteolítica a las que denominamos fracciones III, IV y V.

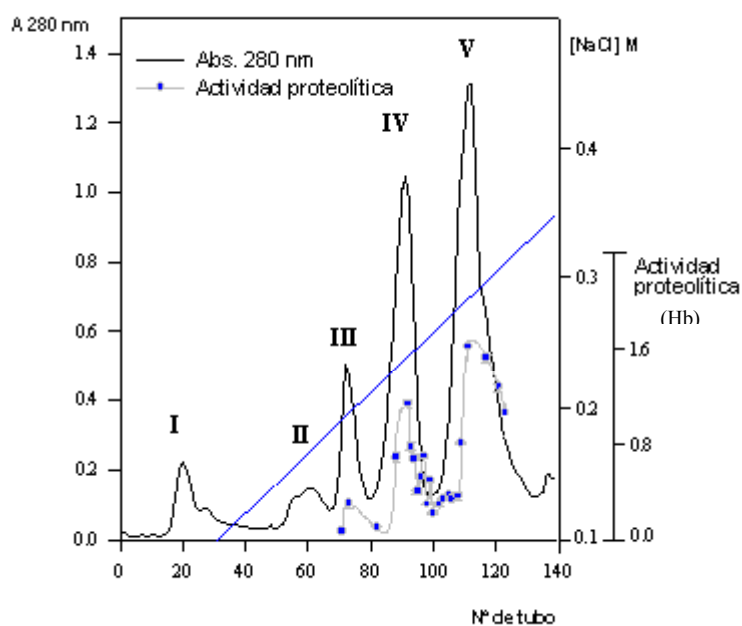


Figura 22.- Cromatografía de intercambio aniónico del extracto crudo de flor tratado con carbón al 10 %. III, IV y V: fracciones proteolíticas sobre hemoglobina a pH 4.

En la *Tabla 22* se muestran los datos de proteínas y actividades de este paso de purificación. Se observó que si bien la fracción III tuvo una alta actividad específica sobre hemoglobina, no coaguló la leche. Los picos IV y V presentaron valores similares de

actividad específica sobre ambos sustratos, con un leve incremento de la actividad coagulante específica en el pico V.

Tabla 22.- Actividad proteolítica y coagulante de los extractos crudos de flores de alcaucil, de los tratados con carbón y de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico

Muestra	Proteínas (mg ml⁻¹)	Actividad hemoglobinolítica (U_{Anson} ml⁻¹)	Actividad hemoglobinolítica específica (U_{Anson} mg⁻¹)	Actividad coagulante (UCL ml⁻¹)	Actividad coagulante específica (UCL mg⁻¹)
Crudo	1,800	5,500	3,06	266,67	148,15
Carbón	1,250	3,300	2,64	184,62	147,70
Pico III	0,030	0,285	9,50	0	0
Pico IV	0,389	1,017	2,61	61,54	158,20
Pico V	0,624	1,633	2,62	104,35	167,23

9.3.4.2.1. Electroforesis, isoelectroenfoque y zimograma

Las fracciones IV y V fueron analizadas mediante electroforesis desnaturante (SDS-PAGE), observándose que las dos fracciones corrieron como bandas únicas con pesos moleculares aproximados de 30 kDa (*Figura 23*).

Los picos IV y V concentrados por precipitación con acetona y redissueltos en agua bidestilada fueron analizados por isoelectroenfoque. En la *Figura 24* se presenta el IEF a pH 3-10 de las fracciones IV y V y el zimograma correspondiente obtenido por inmersión del gel en una solución de hemoglobina pH 4. Ambas fracciones presentaron un pI cercano a 4.

Con la finalidad de lograr una mayor resolución en la zona de pH ácido se realizaron isoelectroenfocos con anfolitos de pH entre 4 y 6,5. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 25*. Las fracciones IV y V presentaron bandas de pI 4,0 que resultaron proteolíticamente activas en los zimogramas con hemoglobina como sustrato.

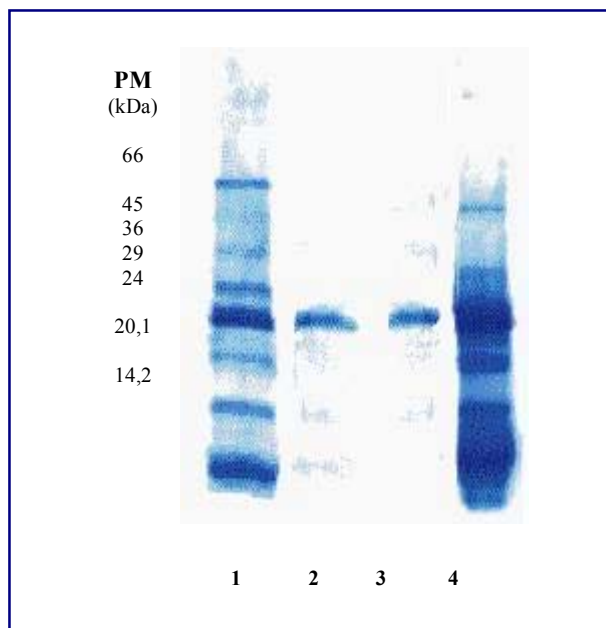


Figura 23.- SDS-PAGE. (14 % - stacking al 5 %) Calle 1: marcadores de peso molecular (Sigma MW-70L). Calle 2: fracción IV. Calle 3: fracción V. Calle 4: extracto crudo de flor de alcaucil.

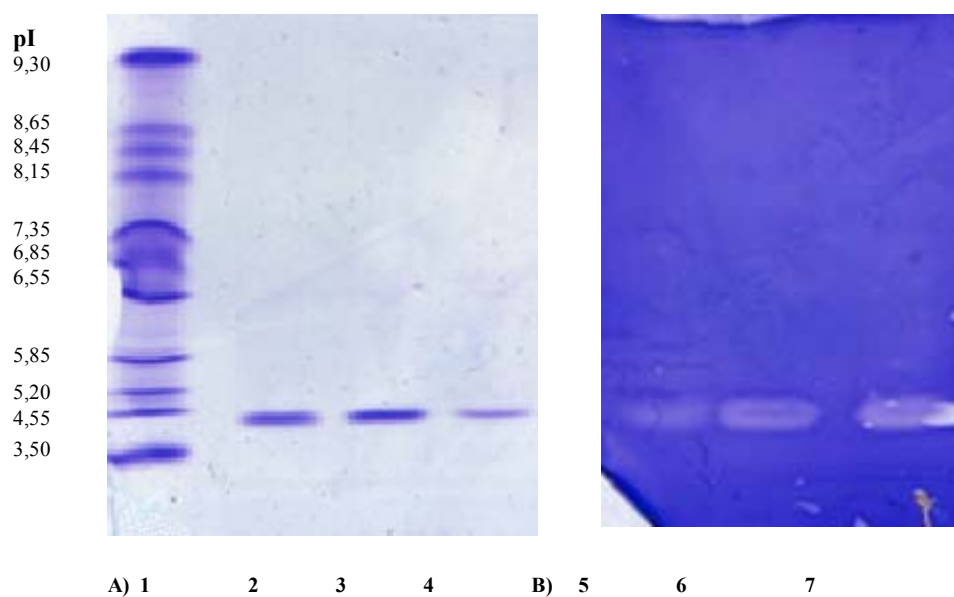


Figura 24.- A) Isoelectroenfoque a pH 3-10. Calle 1: patrones de punto isoeléctrico (Pharmacia). Calle 2 y 3: fracción V. Calle 4: fracción IV. **B)** Zimograma. Calle 5: fracción IV. Calle 6: fracción V. Calle 7: extracto crudo tratado con carbón activado

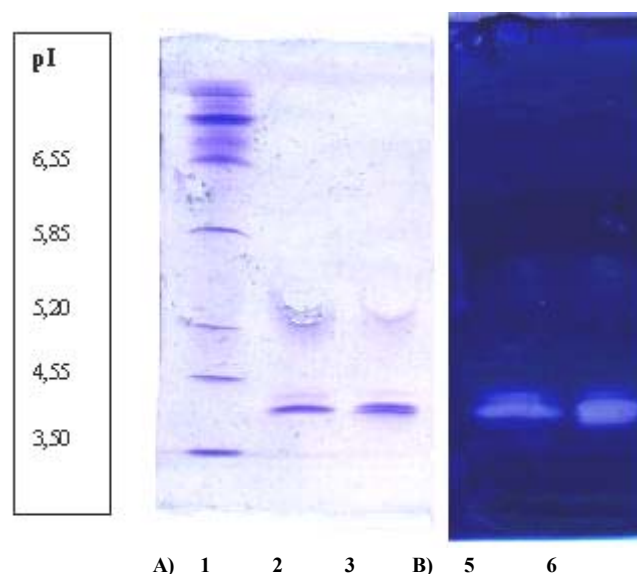


Figura 25.- A) Isoelectroenfoque a pH 4-6,5. Calle 1: patrones de punto isoeléctrico (Pharmacia). Calle 2: fracción IV. Calle 3: fracción V. **B)** Zimograma. Calle 5: fracción IV. Calle 6: fracción V.

9.3.4.3. Cromatografía de exclusión molecular

La filtración por gel permite resolver una mezcla de proteínas por su tamaño molecular. El fraccionamiento se basa en la difusión diferencial de las diferentes moléculas dentro de los poros del gel. Las proteínas con tamaño molecular mayor al de los poros no penetran dentro de los mismos, pasando a través del fluido más rápidamente que las partículas de menor peso molecular. Por lo tanto, las proteínas eluyen de la columna en orden decreciente de su peso molecular.

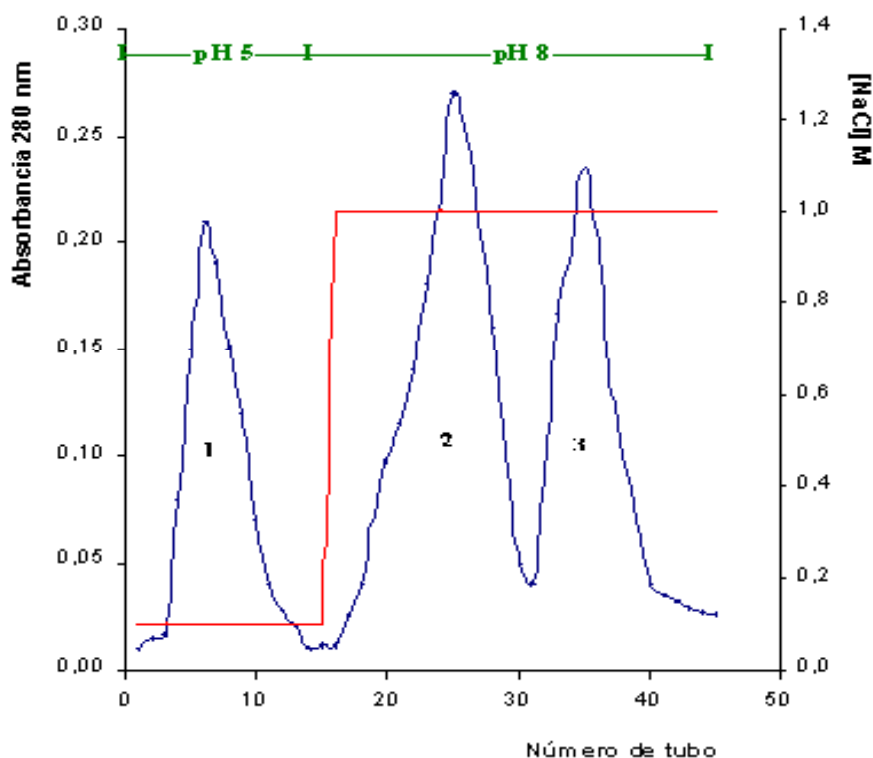
La fracción V obtenida en la cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose del extracto de las flores adsorbido con carbón al 10 % se analizó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75. La determinación se realizó por triplicado y el peso molecular fue de 61 ± 4 kDa.

9.3.4.4. Cromatografía de afinidad

El *pool* del pico V obtenido por cromatografía de intercambio aniónico se analizó por cromatografía de afinidad utilizando pepstatina-agarosa. Se obtuvieron tres fracciones (Figura 26). Fueron necesarios 30 ml de buffer ácido acético-acetato de sodio 0,1 M de pH 5-NaCl 0,1 para eluir las proteínas que no se unieron a la pepstatina y obtener valores de absorbancia (280 nm) próximos a cero (fracción 1). Para que eluyera totalmente el pigmento azulado asociado a la proteína de interés se utilizaron seis volúmenes de

relleno de columna (30 ml) del buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8 con NaCl 1 M (fracción 2) y una cantidad igual de buffer se necesitó para eluir la fracción 3. Las actividades coagulantes de los picos (10 ml) de las fracciones 3 y 2 fueron de 88,9 UCL ml⁻¹ y de 22,2 UCL ml⁻¹, respectivamente. La fracción 1 no coaguló la leche dentro de los 120 minutos de ensayo (Tabla 23).

Figura



26.-

Cromatografía de afinidad en pepstatina-agarosa de la fracción V de las flores de alcaucil purificadas con carbón e intercambio iónico.

Tabla 23.- Actividad proteolítica y coagulante de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad del pico V del intercambio aniónico.

Muestra	Proteínas (mg ml ⁻¹)	Actividad coagulante (UCL ml ⁻¹)	Actividad coagulante específica (UCL mg ⁻¹)	Actividad hemoglobinolítica específica (UAnson mg ⁻¹)	UCL UAnson ⁻¹
Pico 1	0,10	0	0	0,100	0
Pico 2	0,25	22,22	88,88	1,152	77,15
Pico 3	0,20	88,89	444,45	1,685	263,77

La cromatografía de afinidad permitió purificar 2,7 veces y con un rendimiento del 85 % la enzima coagulante de la leche obtenida como pico 5 en la cromatografía de intercambio iónico (Tabla 24).

En la Tabla 24 se resumen los resultados finales de la estrategia de purificación descrita en este punto.

Tabla 24.- Resumen y seguimiento de la tercera estrategia de purificación

<i>Muestra</i>	<i>Proteínas (mg)</i>	<i>Actividad coagulante (UCL)</i>	<i>Actividad coagulante específica (UCL mg⁻¹)</i>	<i>Purificación (veces)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
<i>Extracto crudo</i>	18,00	2666,7	148,15	1	100
<i>Carbón</i>	12,50	1846,2	147,70	1	69
<i>Pico V DEAE</i>	6,24	1043,5	167,23	1,13	39
<i>Pico 3 afinidad</i>	2,00	888,9	444,45	3	33

9.3.4.4.1. Electroforesis e inmunoblotting

El SDS-PAGE de la fracción 3 con actividad coagulante obtenida por cromatografía de afinidad de los extractos de flores de alcaucil purificados con carbón e intercambio iónico presentó dos bandas proteicas bien definidas de 14,5 y 28,5 kDa (Figura 27).

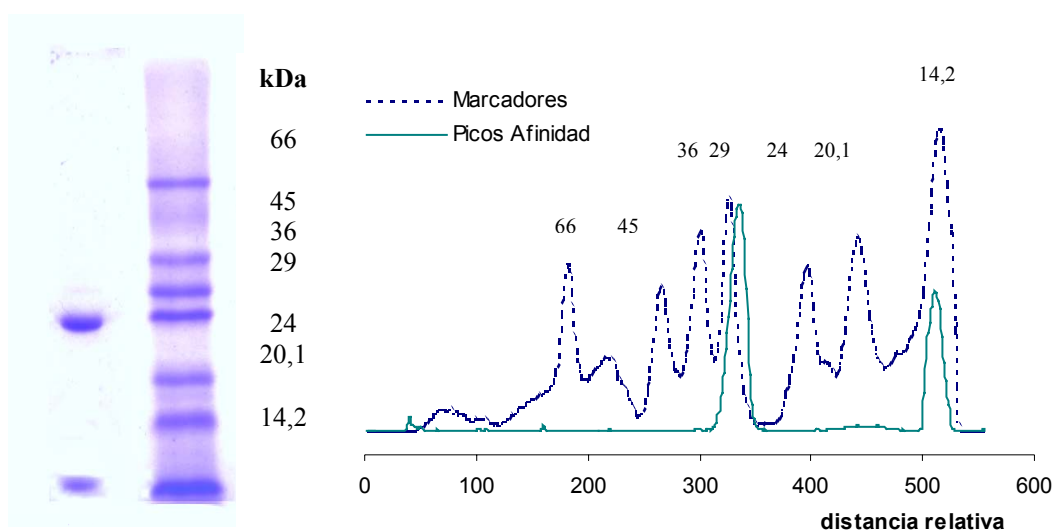


Figura 27.- SDS-PAGE (14%-5%) de la fracción 3 obtenida por cromatografía de afinidad. Marcadores de peso molecular Sigma (MW-SDS-70L).

Se obtuvieron además diferentes patrones de bandas en el SDS-PAGE según el grado de manipulación de la muestra (congelamiento/descongelamiento), que indicaron un autoprocesamiento de la subunidad menor de la peptidasa. En la *Figura 28* se muestra la electroforesis en condiciones desnaturalizantes de muestras frescas y almacenadas durante 3 y 7 días a 4°C. En el primer caso se observa que con la cromatografía de afinidad se obtiene una fracción proteica que se visualiza como una banda gruesa de aproximadamente 30 kDa. A los 3 días de almacenamiento se observa además una banda delgada en la zona de 15 kDa y después de 7 días se obtiene la proteína dimérica.

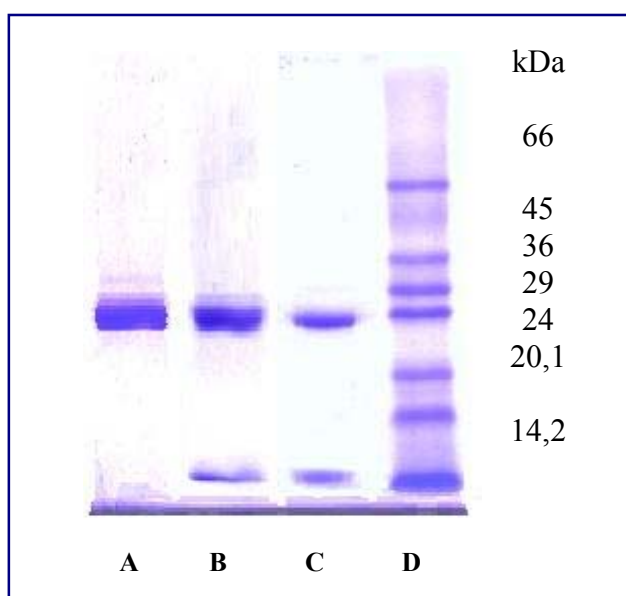


Figura 28.- SDS-PAGE (14%-5%) que evidencia el procesamiento de la proteína obtenida por cromatografía de afinidad (fracción 3) **A)** muestra sin manipular, mantenida a 4°C durante **B)** 3 días y **C)** 7 días. **D)** patrones de peso molecular (Sigma MW-SDS-70L)

En los inmunoblots de los SDS-PAGE anteriores, la reacción de la anti-peptidasa contra la subunidad menor de flor confirmó el procesamiento de esta subunidad. Por otro lado en el extracto crudo de las flores maduras se observó reacción antígeno-anticuerpo en bandas de aproximadamente 58, 29 y 15 kDa (*Figura 29*).

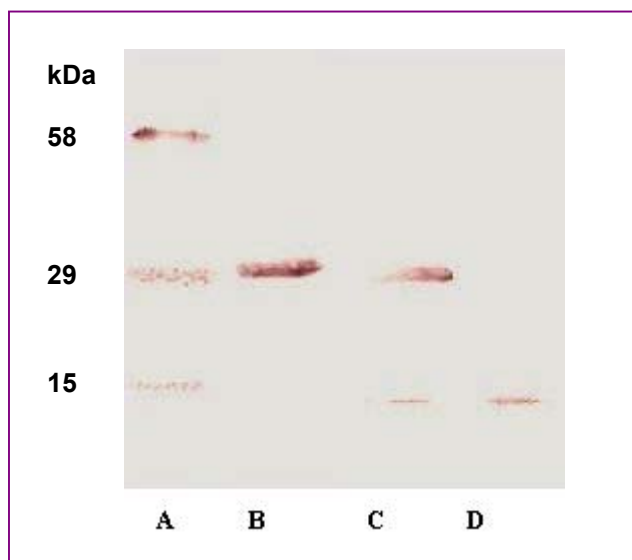


Figura 29.- Inmunodetección de la subunidad menor de la peptidasa de alcaucil en extractos crudos de flores maduras (**A**) y en la muestra purificada por cromatografía de afinidad y almacenada **B**) 0 días; **C**) 3 días; **D**) 7 días.

La presencia de las bandas mencionadas en la peptidasa aspártica de las flores de *C. scolyms* L. sugiere la posibilidad de que la enzima se produzca como una proenzima y que dichas bandas se correspondan con diferentes grados de procesamiento de la proenzima.

Este tipo de comportamiento coincide con lo expresado por Glathe *et al.* (1998) y Khan & James (1998), quienes afirman que todas las APs no virales son sintetizadas como zimógenos inactivos que mantienen unido el N-terminal al sitio activo, lo que permite la regulación temporal y espacial de la actividad peptidásica. Es así que la fitepsina (HvAP) de cebada es sintetizada y traslocada dentro del retículo endoplásmico como una pre-proenzima que sufre varios clivajes proteolíticos para producir la forma bicatenaria madura presente en granos, hojas y raíces. En primer lugar se remueve la secuencia señal de 25 aminoácidos, originando un precursor glicosilado de 54 kDa que es procesado en el compartimiento de Golgi produciendo polipéptidos de 31 y 15 kDa por la remoción del propéptido y luego de 26 y 9 kDa al eliminar el inserto específico de plantas (PSI) (Glathe *et al.*, 1998).

En las flores de cardo también fue identificada una procardosina A de 64 kDa como precursora de la cardosina A con el prosegmento y el PSI. La remoción del PSI y posteriormente del prosegmento produce los polipéptidos de 31 y 15 kDa que constituyen la enzima madura. El esquema de procesamiento proteolítico propuesto por Ramalho-Santos *et al.* (1998a y b) consta de un primer sitio de clivaje entre la subunidad de 31 kDa y el PSI, produciendo dos péptidos de 35 y 30 kDa. De este último se separaría el PSI

liberando la cadena de 15 kDa y por último se eliminaría el prosegmento unido a la fracción de 35 kDa originando la subunidad de 31 kDa.

El patrón de conducta reseñado ha sido bien caracterizado en las APs animales como el pepsinógeno A humano, en donde se produce el clivaje autocatalítico del propéptido a pH ácido para producir la pepsina estomacal y en la procathepsina D, que madura por la acción de peptidasas cisteínicas lisosomales que liberan 44 aminoácidos del N-terminal (Barrett *et al.*, 1998).

Según Glathe *et al.* (1998) los mecanismos de procesamiento de las preproenzimas permiten observar diferentes patrones de proteínas dependiendo del grado de transformación, que a su vez resulta de la interacción de varios factores como el pH y la presencia de peptidasas en el compartimiento intracelular atravesado por la AP en el camino a su localización final en la célula.

9.4. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

9.4.1. Obtención y titulación de anticuerpos anti-peptidasa de alcaucil

Los anticuerpos anti-peptidasa de alcaucil obtenidos por inmunización de dos conejos con el polipéptido menor de la proteína purificada por cromatografía de afinidad fueron analizados por inmunoelectroforesis y ELISA.

9.4.1.1. Inmunoelectroforesis

La inmunoelectroforesis combina una separación electroforética de los componentes de una muestra con su posterior reacción con un inmunosuero específico contra alguno de los componentes de la muestra. Debido a la especificidad y sensibilidad de la técnica se pueden detectar impurezas en concentraciones muy bajas (menores de 0,1 %), permitiendo un análisis cualitativo de las muestras.

Los resultados presentados en la *Figura.30* demuestran que los anticuerpos obtenidos con ambos conejos reaccionan específicamente con la subunidad menor de la peptidasa de alcaucil.

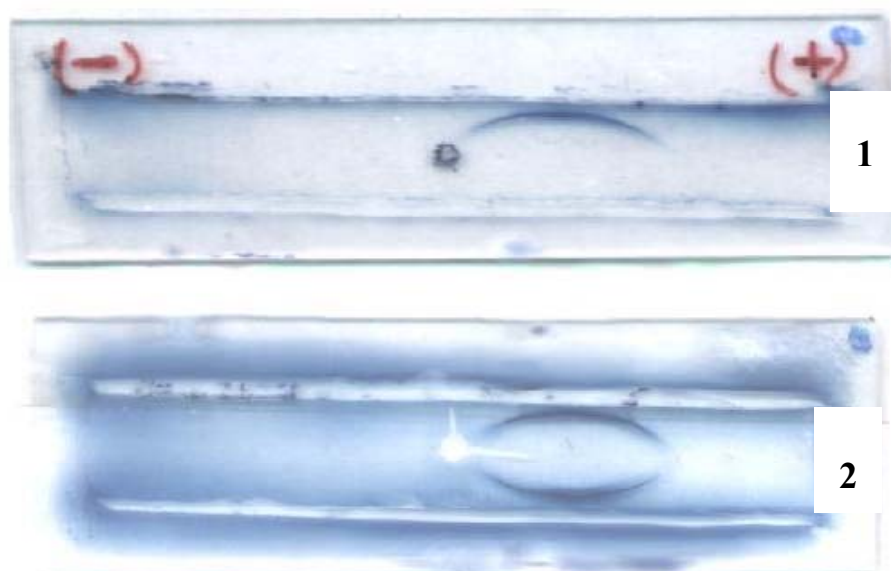


Figura 30.- Inmunoelectroforesis de la peptidasa aspártica de alcaucil.

En la inmunoelectroforesis 1 se enfrentó el antígeno (0,6 mg ml⁻¹) con un *pool* de los sueros de los dos conejos inmunizados (canal superior) y con el suero no inmune en el canal inferior. En la inmunoelectroforesis 2 se observa la reacción del suero inmune del

conejo 1 (canal superior) y del conejo 2 (canal inferior) con la subunidad menor de la peptidasa de alcaucil.

9.4.1.2. ELISA

Mediante la utilización de esta técnica se dosaron los anticuerpos anti-peptidasa de alcaucil obtenidos en conejos.

En la *Tabla 25* se muestran los valores de densidad óptica de la reacción de las diferentes diluciones del anticuerpo con la peptidasa en estudio y reveladas por ELISA utilizando un anticuerpo de cabra contra IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano como anticuerpo secundario.

Del análisis de los resultados resulta que el título de anticuerpos obtenidos fue mayor de 512.000.

Tabla 25.- Dosaje de anticuerpos anti-peptidasa de alcaucil mediante ELISA

Título	Densidad óptica conejo 1	Densidad óptica conejo 2	Densidad óptica conejo preinmune
1/4.000	2,58	2,60	0,51
1/8.000	2,57	2,50	0,36
1/16.000	2,54	2,53	0,27
1/32.000	2,51	2,47	0,21
1/64.000	2,36	2,23	0,21
1/128.000	1,83	1,53	0,14
1/256.000	1,19	0,92	0,10
1/512.000	0,62	0,58	0,10

9.4.1.3. Western blotting

La técnica Western blotting permite identificar una proteína específica dentro de una mezcla proteica utilizando un anticuerpo dirigido contra ella.

A tal fin las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol y electrotransferidas a una membrana de PVDF. Los sitios de pegado remanentes de la membrana fueron bloqueados con caseína para evitar reacciones inespecíficas del anticuerpo. Se agregó el anticuerpo anti-peptidasa obtenido en conejo y la unión antígeno-anticuerpo fue detectada por el agregado de un

anticuerpo secundario (anti-Ig G de conejo) conjugado con la enzima peroxidasa. La presencia y ubicación de la peptidasa fue revelada por la reacción de la peroxidasa con el sustrato cromogénico DAB en presencia de peróxido de hidrógeno.

El anticuerpo obtenido permitió localizar la subunidad menor de la peptidasa de alcaucil con diferentes grados de procesamiento tanto en las flores maduras como en los cultivos de tejidos indiferenciados, tal como se describe en 9.3.4.4.1, 9.7.2.3 y 9.8.3.

9.5. SECUENCIA AMINO TERMINAL

La secuencia N-terminal del péptido de menor peso molecular de la peptidasa aspártica aislada de flores maduras de alcaucil fue comparada con secuencias amino terminales y secuencias internas de propéptidos (deducidas del cDNA) de otras peptidasas aspárticas de plantas (*Tabla 26*).

Tabla 26.- Secuencia N-terminal de la subunidad menor de la peptidasa de alcaucil comparada con secuencias N-terminales y secuencias internas de propéptidos deducidas del cDNA de peptidasas aspárticas de plantas.

Especie	Secuencia	Homología (%)	Referencia
AMINO TERMINAL			
<i>Cynara scolymus</i> L. (subunidad menor)	SSEELQVDCNTLSRMPNVSFTIGGKKF 1 27		
<i>C. cardunculus</i> L. (cadena B de cardosina A)	TSSEELQVDCNTLSRMPNVSFTIGGKKF 1 28	96	Veríssimo <i>et al.</i> (1996)
<i>C. cardunculus</i> L. (cadena B de cardosina A)	EELQVDCNTLSSMPNVSFTIGGKKF 1 25	89	Frazao <i>et al.</i> (1999)
<i>C. cardunculus</i> L. (cadena B de cardosina B)	SAESTIVDCNGLSSMPNTAFTIGGKKL 1 26	63	Veríssimo <i>et al.</i> (1996)

<i>Brassica oleracea</i>	SPMGE SAVDCAQLSTMPITVSLTIGGKVF	59	Fujikura & Karssen (1995)
	1 28		
<i>Hordeum vulgare</i> (subunidad 11 kDa fitepsina)	ESAVDCGSLGSMPTDIEFTIGGKKF	56	Runeberg-Ross <i>et al.</i> (1991)
	1 24		
SECUENCIAS DEDUCIDAS DE cDNA			
<i>C. cardunculus</i> L. (precardosina A)	SSEELQVDCNTLSSMPNVSFTIGGKKF	96	Faro <i>et al.</i> (1999)
	416 442		
<i>Helianthus annuus</i>	PMGE SAVDCQTLNMPNIAFTIGGKTF	63	Park <i>et al.</i> (1990) no publicado
	420 446		
<i>Centaurea calcitrapa</i>	PMGE SAVDCNDLSSMPNIAFTIGGKVF	63	Domingos <i>et al.</i> (1998)
	420 446		
<i>Brassica napus</i>	PMGE SAVDCAQLSTMPITVSLTIGGKVF	59	D'Hondt <i>et al.</i> (1997)
	417 443		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMGE SAVDCAQLSTMPITVSLTIGGKVF	59	D'Hondt <i>et al.</i> (1997)
	395 423		
<i>C. cardunculus</i> L. (ciprosina)	PMGE SAVDCSSLSSMPNIAFTVGGKTF	56	Cordeiro <i>et al.</i> (1994b)
	382 410		
<i>Oryza sativa</i> (orizasina1)	PMGE SSVDCGSLASMPETISFTIGAKKF	56	Asakura <i>et al.</i> (1995b)
	420 446		
<i>Hordeum vulgare</i> (cadenas A de profitepsina)	PMGE SAVDCGSLGSMPTDIEFTIGGKKF	56	Kervinen <i>et al.</i> (1999)
	389 415		
<i>Hordeum vulgare</i> (profitepsina)	PMGE SAVDCGSLGSMPTDIEFTIGGKKF	56	Runeberg-Ross <i>et al.</i> (1991)
	419 445		
<i>Cucurbita pepo</i>	PMGQSAVDCGQLSSMPITVSLTIGGKVF	52	Hiraiwa <i>et al.</i> (1997)
	424 450		

Los veintisiete aminoácidos identificados del N-terminal de la cadena menor de la peptidasa aspártica purificada de las flores de alcaucil presentan 96 y 89 % de homología con la secuencia de aminoácidos del N-terminal de la cadena B de la cardosina A aislada de flores de cardo (Veríssimo *et al.*, 1996; Frazao *et al.*, 1999). Las homologías con otras APs fueron del 63% con cardosina B de *C. cardunculus* L., del 59% con *Brassica oleracea* y del 56% con *Hordeum vulgare*.

Al comparar con las secuencias de aminoácidos deducidas de los cDNA, la *scolymina* presentó homologías del 96% con la preprocardosina y entre el 63 y 52% con las APs de *Helianthus annuus*, *Centaurea calcitrapa*, *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *C. cardunculus* L.(ciprosina), *Oryza sativa* (orizasina1), *Hordeum vulgare* (profitepsina) y *Cucurbita pepo*.

El ácido glutámico (E) de la cuarta posición de la peptidasa de alcaucil y los motivos VDC (7-9), MP (15-16) y TIGGK (21-25) están presentes en todas las secuencias de las peptidasas aspárticas de plantas analizadas con pocas excepciones: en *Cucurbita pepo* el ácido glutámico es reemplazado por glutamina (Q) mientras que en *Oryza sativa* el motivo TIGGK es sustituido por TIGAK y en la ciprosina por TVGGK.

9.6. ESPECTROMETRIA DE MASAS MALDI-TOF

La masa molecular de la subunidad menor de la peptidasa de flores de alcaucil obtenida por espectrometría fue de 15.358 Da, utilizando para la calibración tripsinógeno de MW 23.981 (*Figura 31*).

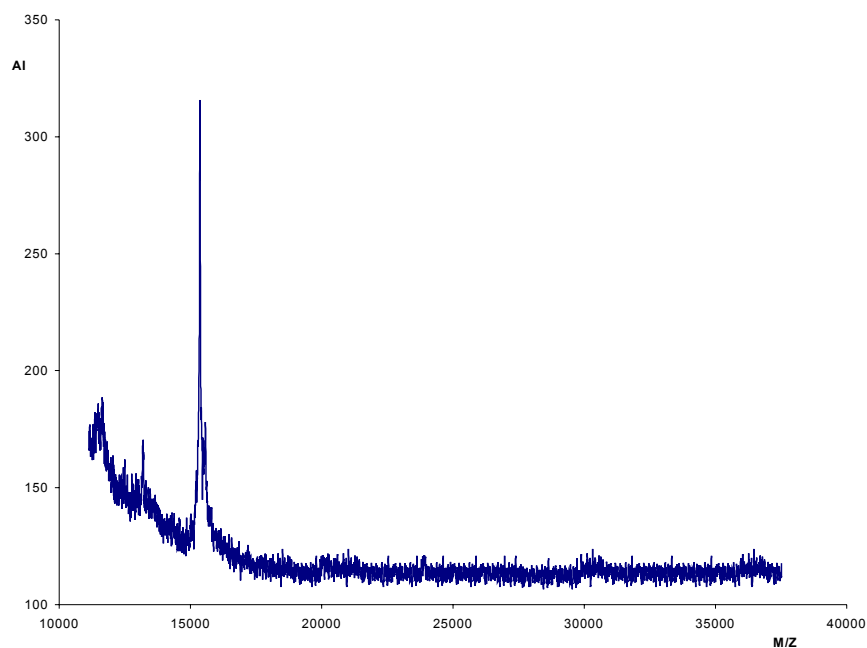


Figura 31.- Espectrometría de masas MALDI de la subunidad menor de scolymina.

9.7. CULTIVOS IN VITRO INDIFERENCIADOS: CALLOS

Con la finalidad de producir peptidasas coagulantes de la leche en forma independiente de las condiciones climáticas, estacionales y de la acción de fitopatógenos que pudieran incidir en la calidad del material vegetal y de sus productos derivados, se realizaron cultivos *in vitro* de tejidos indiferenciados de *Cynara scolymus* L.

Si bien la formación de callos de alcaucil ha sido abordado por varios investigadores utilizando diferentes cultivares, tejidos y condiciones de cultivo (*ver* 6.3.2), no se han encontrado en la literatura trabajos que desarrollen el cultivo *in vitro* de tejidos indiferenciados de los cultivares Francés Precoz y Green Globe de alcaucil. Con respecto a la producción de peptidasas no se ha hallado ninguna referencia bibliográfica sobre la producción por algún tipo de cultivo de *C. scolymus* L.

9.7.1. Cultivos de callos de *C. scolymus* L. cv. Francés Precoz

9.7.1.1. Efecto de ANA y BA

9.7.1.1.1. Crecimiento

La proliferación de callos en las yemas caulinares de *C. scolymus* L. cv. Francés Precoz sembrados en el medio MS modificado y suplementado con 5 mg l⁻¹ de ANA y 2 mg l⁻¹ de BA (8.2.1.1) se observó al cabo de 2-3 semanas de cultivo. Los callos producidos se caracterizaron por ser medianamente friables y amarillentos. Luego de dos subcultivos (cada cuatro semanas) en el mismo medio, los callos producidos se repicaron en los medios suplementados con BA (0,1 mg l⁻¹) y concentraciones variables de ANA (0,1; 2,5 y 5 mg l⁻¹), que constituyeron los tratamientos A, B y C, respectivamente.

Los resultados obtenidos (*Figura 32*) muestran que la mejor respuesta, en términos de producción de biomasa, se obtuvo utilizando el medio suplementado con ANA 1 mg l⁻¹ y BA 0,1 mg l⁻¹ (medio A). En este medio se detectaron tres fases en el período (35 días) de crecimiento evaluado: una fase adaptativa o *lag* (0-7 días) en donde el peso se incrementó lentamente, una fase logarítmica (7 a 21 días) con una velocidad de crecimiento (μ) del peso seco de 0,09 días⁻¹ y un tiempo de duplicación (t_d) de 7,7 días y una tercera fase en donde a partir de los 21 días disminuyó la velocidad de crecimiento de la biomasa ($\mu=0,01$ días⁻¹).

En el medio B (ANA/BA 2,5:0,1) el crecimiento presentó un comportamiento diáuxico alcanzándose las fases estacionarias a los 7 y 28 días de cultivo con μ (peso fresco) de 0,08 y 0,07 días⁻¹, respectivamente.

Analizando las curvas de crecimiento de los callos en el medio C (ANA/BA 5:0,1) se observó que si bien la acumulación del peso fresco continuó hasta los 35 días con μ de $0,045 \text{ d}^{-1}$, el incremento del peso seco cesó a partir del día 21. Esto está indicando que el aumento de la biomasa después de 21 días de cultivo es exclusivamente debido a la captación de agua por las células. De acuerdo a lo expresado por Warren (1992), la exposición no controlada de las células vegetales a las auxinas puede conducir a un crecimiento anormal de la pared que permite la expansión celular por captura de agua. Es de destacar que este comportamiento se presentó en el medio de cultivo con mayor proporción de auxina.

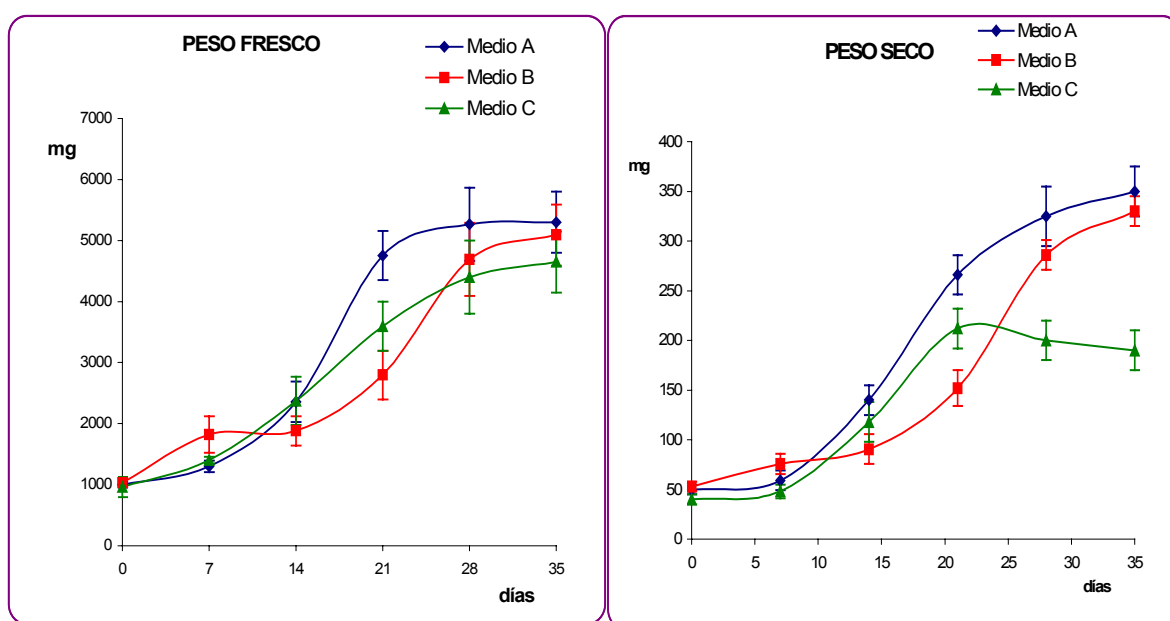


Figura 32.- Evolución de la biomasa en función del tiempo de callos de *C. scolymus* L. cv. Francés Precoz en medios de cultivo suplementados con diferentes relaciones de ANA/BA (mg l^{-1}). Medio A: 1/0,1 - Medio B: 2,5/0,1 - Medio C: 5/0,1. Las barras indican la desviación estándar de 3 experimentos.

9.7.1.1.2. Producción de peptidasas

El análisis del contenido de proteínas y de la actividad proteolítica de los callos del cultivar Francés Precoz fue realizado a los 7, 14, 21 y 28 días de cultivo. La concentración proteica total presentó una dependencia con el tiempo en los tres tratamientos: fue máxima a los 14 días, con valores que oscilaron entre $77,7$ y $88,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ y luego decayó rápidamente durante el período de cultivo. Sólo se obtuvo diferencia

significativa ($p \leq 0,05$) en el contenido proteico de los callos cultivados 28 días en el medio A (*Figura 33*).

También se observó dependencia en función del tiempo de la actividad proteolítica sobre caseína a pH 6, en los tres tratamientos. Los datos tomados a los 14 días mostraron que con el tratamiento A se obtuvo el doble de actividad que con el tratamiento B y el cuádruple que con el C. En el tratamiento A el hecho característico fue que la actividad proteolítica específica (U_{cas}/mg proteína) a lo largo de los 28 días de cultivo alcanzó valores sustancialmente mayores que en los tratamientos B y C, donde se observó escasa producción de enzimas con actividad caseinolítica (*Figura 33*).

Por otro lado, los callos de tercera generación de *C. scolyms* L. cv. Francés Precoz no presentaron actividad coagulante de la leche dentro de los 300 minutos del ensayo.

Los resultados obtenidos indican que el medio MS suplementado con 1 mg l^{-1} ANA y $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BA fue capaz de soportar el crecimiento *in vitro* de tejidos indiferenciados de *C. scolyms* L. cv. Francés Precoz y que en este medio las células produjeron enzimas proteolíticas que no coagularon la leche en las condiciones ensayadas.

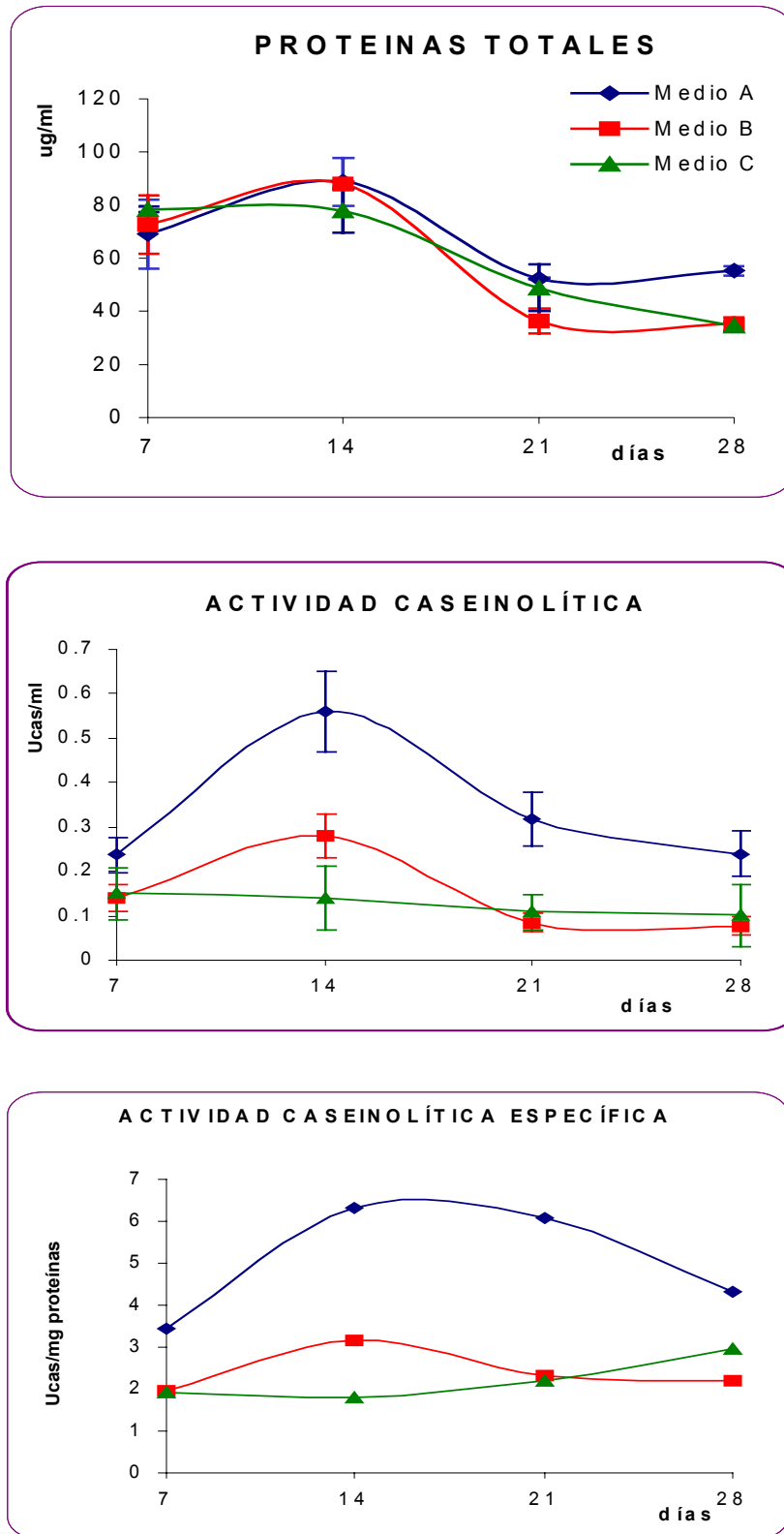


Figura 33.- Proteínas totales y actividad proteolítica sobre caseína a pH 6 de los callos de *C. scolymus* L. cv. Francés Precoz en función del tiempo, en medios de cultivo suplementados con diferentes relaciones de ANA/BA (en mg l^{-1}). Medio A: 1/0,1 - Medio B: 2,5/0,1 - Medio C: 5/0,1.

Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos.

9.7.2. Cultivos de callos de *C. scolyms* L. cv. Green Globe

9.7.2.1. Efecto de ANA y BA

9.7.2.1.1. Crecimiento

El establecimiento de los cultivos de callos del cultivar Green Globe se realizó utilizando brácteas jóvenes en los seis medios de cultivo descritos en 8.2.2.1 (Figura 34).



Figura 34.- Establecimiento de los cultivos de callos a partir de brácteas de *C. scolyms* L.

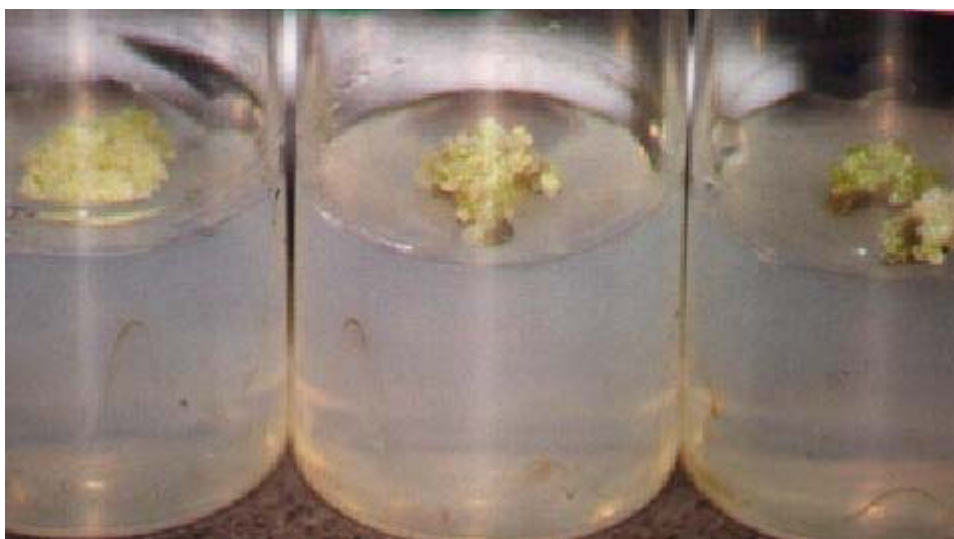


Figura 35.- Cultivo de callos de *C. scolyms* L. en medio suplementado con ANA 10 : BA 1 (mg l⁻¹)

Los reguladores de crecimiento utilizados (ANA y BA en diferentes concentraciones y combinaciones) fueron capaces de inducir la desdiferenciación de los explantos. Si bien en todos los tratamientos se obtuvo crecimiento, los medios con relación auxina/citocinina 10:1 (medios 2 y 6) produjeron callos de mayor biomasa, al igual que con el cultivar Francés Precoz. Sólo los callos establecidos en el medio 6 fueron friables (*Figura 35*).

La *figura 36* muestra la evolución de la biomasa, representada por el peso fresco y seco de los callos de tercera generación del cultivar Green Globe, durante 35 días de cultivo. En ella se puede observar que en el medio suplementado con 10 mg l⁻¹ de ANA y 1 mg l⁻¹ de BA (medio 6) se produjo mayor crecimiento. El análisis de la varianza y el método de comparaciones múltiples de las medias de Duncan indicaron que a los 21 días se produjeron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) del peso fresco y seco de los callos cultivados en el medio 6 con respecto al logrado con los otros tratamientos.

El crecimiento en el medio 6 presentó un comportamiento diáuxico, alcanzándose las fases estacionarias a los 7 y 28 días de cultivo. La primera fase exponencial se extendió hasta el día 7 con una velocidad de crecimiento (μ) de 0,13 días⁻¹ y la segunda entre los días 14 al 28 con μ de 0,04 días⁻¹; los tiempos de duplicación (t_d) fueron de 5 y 18 días, respectivamente (*Figura 36*).

La relación entre el peso fresco y seco de los callos cultivados en el medio 6 fue aproximadamente constante hasta los 28 días de cultivo y luego se incrementó, debido al descenso del peso seco con constancia del peso fresco (*Figura 37*). Este patrón de crecimiento es típico de las células vegetales cultivadas *in vitro* y se explica debido a que en la última etapa del crecimiento sólo se produce expansión celular con grandes vacuolas que captan el agua (Scragg, 1992; Warren, 1992).

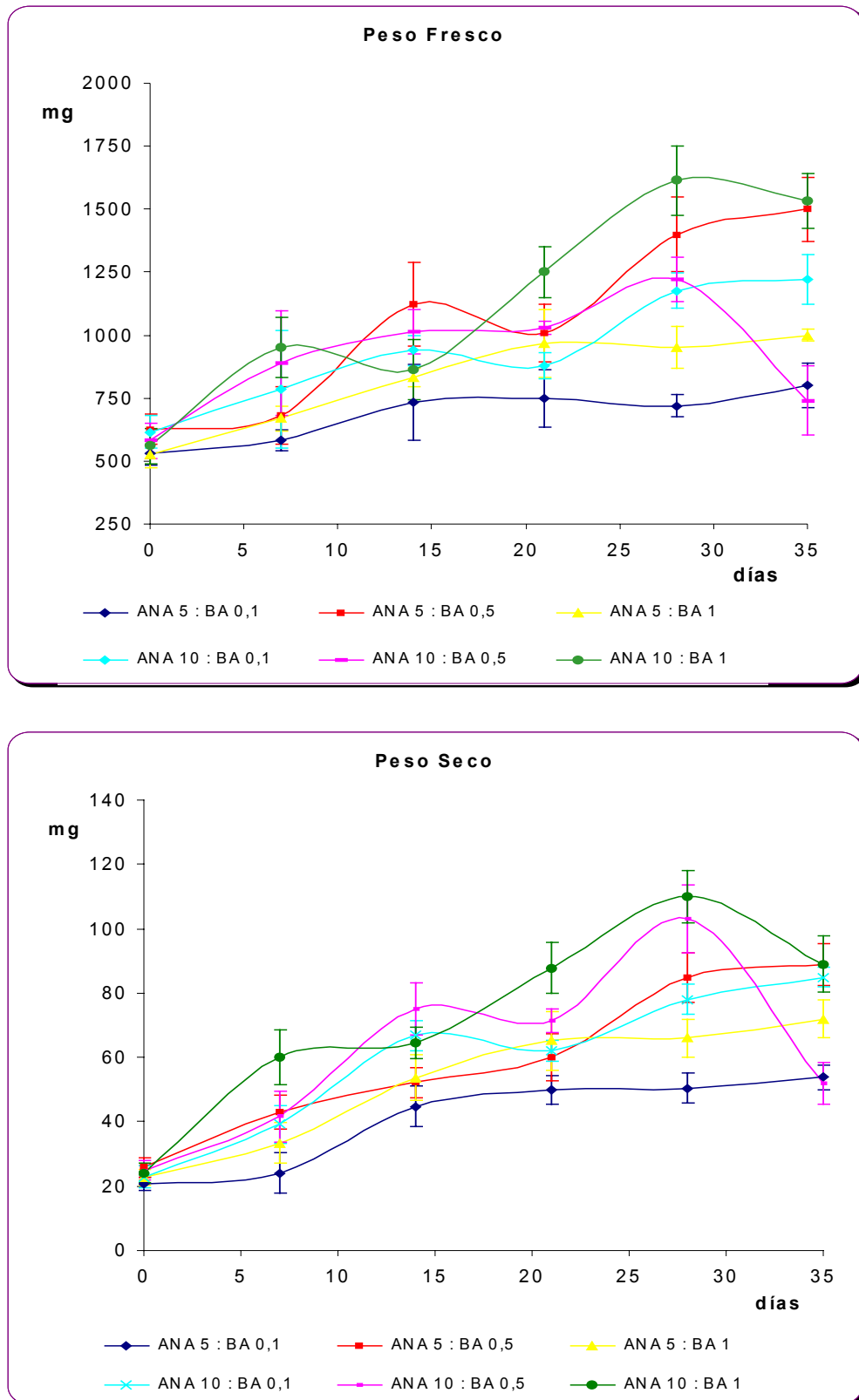


Figura 36.- Biomasa, representada por mg de peso fresco y seco, de los callos (tercera generación) de *C. scolyms* L. cv. Green Globe en función del tiempo, en los medios de cultivo suplementados con diferentes relaciones de ANA/BA (mg l^{-1}). Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos

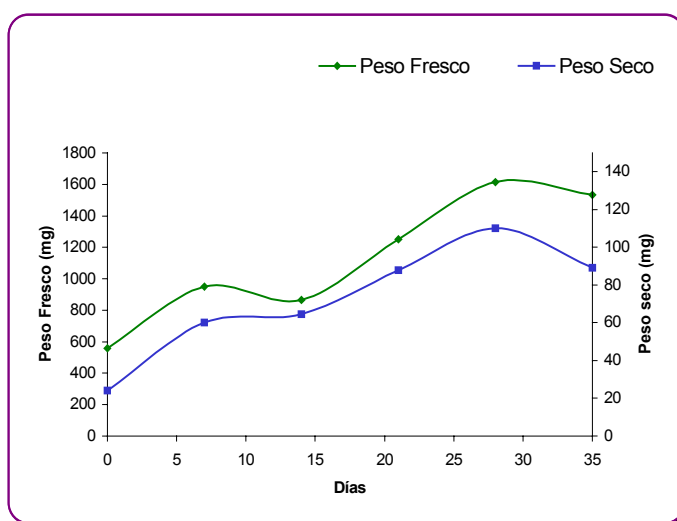


Figura 37.- Peso fresco y peso seco de los callos de *C. scolymus* L. cv. Green Globe crecidos en medio 6 [ANA 10 : BA 1 (mg l^{-1})] durante 35 días

La cinética de crecimiento fue similar en las sucesivas generaciones de los callos de alcaucil (cv. Green Globe) cultivados en el medio 6, presentando igual longitud de la fases *lag* y estacionaria, pero con un índice de crecimiento decreciente que recién llegó a estabilizarse a partir de la octava generación (Tabla 27). Si bien son pocos los autores que indican cuál es el tiempo necesario para obtener cultivos de tejidos vegetales estables, Bouque *et al.* (1998) mencionan que logran equilibrar los callos de cinco especies de *Psoralea* a las 48 semanas de cultivo y Fett-Neto *et al.* (1994) reportan dos años como el tiempo requerido para estabilizar los cultivos en suspensión de *Taxus cuspidata*.

Los callos de alcaucil estabilizados fueron más compactos y blancuzcos que los de subcultivos anteriores (Figura 38).



Figura 38.- Callos de alcaucil de la duodécima generación

9.7.2.1.2. Producción de peptidasas

Dado que la actividad caseinolítica a pH 6 fue escasa (valores menores a 0.12 U_{cas}) en todos los medios y en todos los tiempos evaluados, se utilizó hemoglobina a pH 4 para cuantificar la actividad proteolítica de los extractivos de los callos del cultivar Green Globe. La curva de producción de peptidasas en función del tiempo de los callos de tercera generación cultivados en los distintos medios fue similar a la que se obtuvo con los callos del cv. Francés Precoz, presentando el máximo a los 21 días de cultivo. La actividad hemoglobínica de los cultivos en el medio 6 fue significativamente mayor ($p \leq 0,01$) entre los 21 y 35 días que la obtenida con los callos crecidos en los otros cinco medios (Figura 39).

La máxima actividad sobre hemoglobina a pH 4 de las enzimas producidas por las células de los callos cultivados en medio 6 se manifestó mientras la biomasa crecía exponencialmente (Figuras 36 y 39). Este resultado coincide con el obtenido por Tamer y Mavituna (1996) en callos y suspensiones de *Onopordum turcicum* y por Lima Costa *et al.* (1996) en células en suspensión de *Cynara cardunculus* L. Es de destacar que las enzimas proteolíticas activas a pH ácido que se produjeron en la fase de crecimiento exponencial de los callos de alcaucil no presentaron actividad coagulante de la leche y que los autores anteriormente nombrados no midieron esa capacidad en las especies que estudiaron.

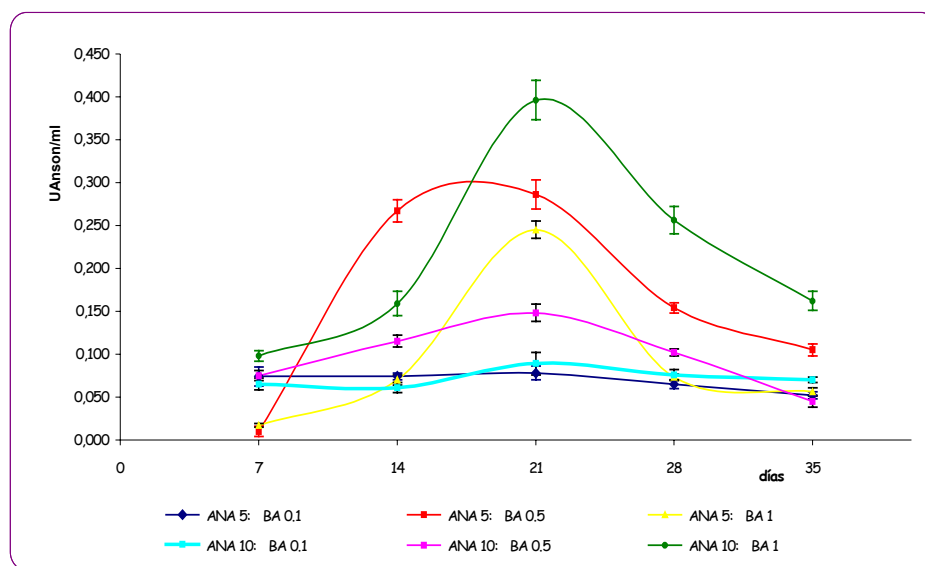


Fig. 39.- Actividad hemoglobínica de los callos de tercera generación de *C. scolymus* L. cv. Green Globe en función del tiempo en medios de cultivo suplementados con diferentes relaciones ANA/BA (en $mg\ l^{-1}$). Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos.

El análisis de la actividad proteolítica sobre hemoglobina, de la biomasa y de las características de los callos obtenidos en los diferentes medios de cultivo investigados determinó que se seleccionara el medio 6 para continuar con los ensayos.

Los extractivos de las primeras generaciones de callos no manifestaron actividad coagulante de la leche durante los 35 días de cultivo *in vitro*. Sin embargo, a partir de la octava generación los callos crecidos en el medio 6 presentaron la biomasa estabilizada en un 20 % de los pesos iniciales y expresaron capacidad coagulante. Los callos de octava generación coagularon la leche en 135 minutos, mientras que en las sucesivas generaciones (9^a a 20^a), el tiempo de coagulación se mantuvo entre 25 y 35 minutos que corresponden a actividades entre 8 y 5,7 UCL ml⁻¹ (Figura 40 y Tabla 27).

Con respecto a la liberación de la enzima coagulante de la leche al medio de cultivo de los callos, se observó que la secreción fue aumentando hasta la generación 16^a y a partir de allí se estabilizó con una actividad 5,2-5,6 UCL ml⁻¹, que coaguló la leche en alrededor de 30 minutos en las condiciones del ensayo (Figura 40 y Tabla 27).

Tabla 27.- Biomasa, proteínas totales y tiempo de coagulación de la leche intra- y exocelular de callos de *C. scolyms* L. cultivados en el medio 6 (ANA 10 mg l⁻¹ / BA 1 mg l⁻¹), en diferentes subcultivos, al cabo de 35 días de cultivo.

Generación	Biomasa (mg de peso fresco) ¹	Proteínas totales (mg/ml)	Tiempo de coagulación intracelular (min ⁻¹)	Tiempo de coagulación exocelular (min ⁻¹)
3 ^a	1615 ± 137 a	1,5	>300	>300
5 ^a	1153 ± 164 a	1,4	>300	>300
8 ^a	322 ± 97 b	1,3	135	>300
9 ^a	316 ± 63 b	1,3	34	150
10 ^a	271 ± 43 b	0,9	33	70
12 ^a	315 ± 110 b	1,4	35	56
16 ^a	347 ± 60 b	1,2	30	32
17 ^a	323 ± 102 b	1,0	35	32
18 ^a	282 ± 72 b	0,9	25	30
19 ^a	325 ± 73 b	1,3	30	30
20 ^a	321 ± 103 b	1,1	25	31

¹ Valores ± SD con letras diferentes indican diferencias significativas a $p \leq 0.05$ con el test de Duncan. ² ND: no determinado.

Las peptidasas coagulantes de la leche obtenidas en los cultivos de callos fueron inhibidas por pepstatina 0,1 mM, demostrando la presencia de peptidasas aspárticas en los extractos crudos de los callos.

Por otro lado es de destacar que la concentración de proteínas en las diferentes generaciones varió entre 0,9 y 1,5 mg ml⁻¹, valores superiores a los detectados en los callos del cv. Francés Precoz (Figura 33 y Tabla 27)

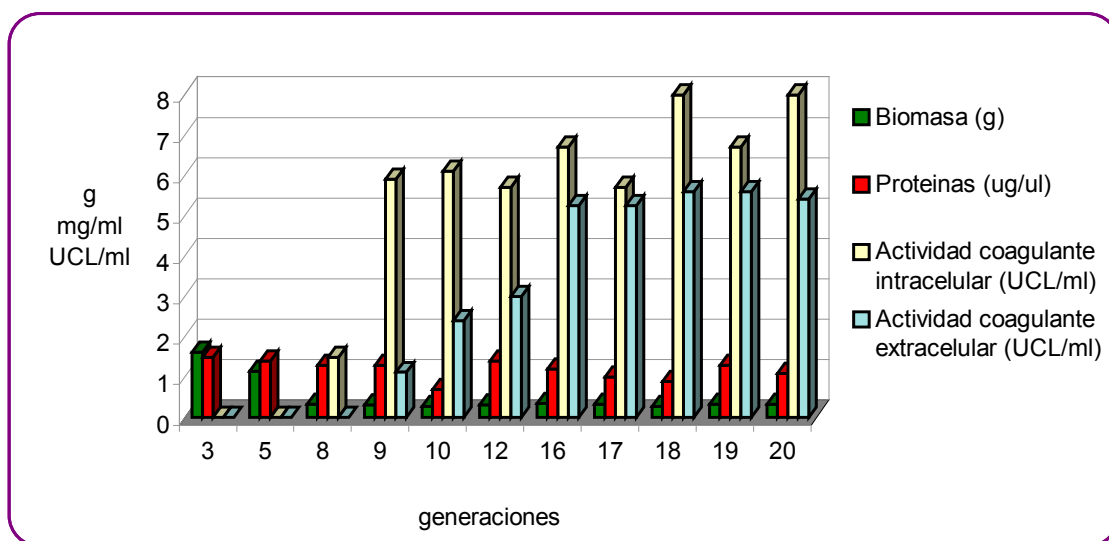


Figura 40.- Biomasa, proteínas totales y actividad coagulante de la leche intra- y exocelular de callos de *C. scolymus* L. cv. Green Globe cultivados en el medio 6 (ANA 10 mg l⁻¹ / BA 1 mg l⁻¹), en diferentes subcultivos, al cabo de 35 días de cultivo.

9.7.2.2. Efecto de GA₃ y ABA

El ácido giberélico es un regulador de crecimiento vegetal que interviene en el proceso de floración y el ácido abscísico está vinculado a la senescencia (Salisbury & Ross, 1994).

Dado que el contenido de peptidasas coagulantes de la leche es muy elevado en las flores del alcaucil (ver 9.1) se estudió la influencia del ácido giberélico en la producción de peptidasas coagulantes de la leche por callos de alcaucil en cultivo durante 30 días. También se evaluó el efecto de la incorporación de ABA en los tratamientos anteriores, ya que podría existir relación entre la producción de peptidasas aspárticas y la senescencia de distintos órganos, como lo sugieren Heimgartner *et al.* (1990), Cordeiro *et al.* (1994a) y Ramalho-Santos *et al.* (1997) en las flores de cardo, García-Martínez & Moreno (1986) en las hojas de naranjo, Kervinen *et al.* (1995) en las hojas de cebada y Runeberg-Roos & Saarma (1998) en la raíz de cebada.

9.7.2.2.1. Crecimiento

La incorporación de GA₃ en concentraciones de 5 y 10 mg l⁻¹ (medios 8 y 9) promovió el crecimiento respecto del tratamiento testigo (medio 7, básico sin reguladores del crecimiento), siendo la biomasa significativamente mayor ($p \leq 0,05$) al emplear 10 mg l⁻¹ de GA₃. El agregado de ABA (medios 11 y 12) amortiguó el efecto del GA₃, reduciendo el incremento de la biomasa producido por este regulador de crecimiento (*Tabla 28*).

9.7.2.2.2. Producción de peptidasas

Si bien en todos los callos tratados con GA₃ y/o ABA se verificó la presencia de peptidasas coagulantes de la leche, se observó disparidad en cuanto al tiempo requerido por las diferentes muestras para producir la coagulación. Aquellos tratamientos que produjeron menor biomasa al cabo de 30 días de cultivo (medios 10, 11 y 12) presentaron mayor actividad, tanto sobre hemoglobina a pH 4 como coagulante de la leche (*Tabla 28*). La actividad hemoglobinolítica de los callos de todos los tratamientos que contenían ABA fue mayor de 0,300 U ml⁻¹, independientemente de la concentración de GA₃ empleada, y los tiempos de coagulación variaron entre 18 y 28 minutos.

Tabla 28.- Efecto del GA₃ y ABA sobre el crecimiento y la actividad peptidásica de callos (octava generación) de *C. scolyms* L. cv. Green Globe, al cabo de 30 días de cultivo.

Medios de cultivo	GA ₃ (mg l ⁻¹)	ABA (mg l ⁻¹)	Peso fresco (mg) ¹	Actividad Hb pH 4 (U ml ⁻¹)	Actividad coagulante intracelular (UCL ml ⁻¹)	Actividad coagulante exocelular (UCL ml ⁻¹)
7	0	0	185 ± 33 ^b	0,489	13,3	5,6
8	5	0	297 ± 74 ^b	0,260	6,2	3,2
9	10	0	448 ± 109 ^a	0,196	5,3	2,4
10	0	0,1	195 ± 79 ^b	0,321	11,1	4,4
11	5	0,1	240 ± 97 ^b	0,383	7,1	3,6
12	10	0,1	280 ± 98 ^b	0,388	7,1	4,1

¹ Valores ± SD con letras diferentes indican diferencias significativas a $p \leq 0,05$ con el test de comparaciones múltiples de Duncan.

Por otra parte, los extractivos de callos sin tratamiento con reguladores de crecimiento manifestaron alta actividad sobre hemoglobina (0,489 U ml⁻¹) y coagulante de la leche (13,3 UCL ml⁻¹).

Los resultados mostrados indican que la expresión y producción de las enzimas coagulantes de la leche están vinculadas al balance hormonal empleado, observándose que la mayor actividad se presenta en los cultivos con bajo crecimiento. La mencionada relación inversa entre crecimiento y actividad coagulante se observó también en los extractivos de callos cultivados en medio libre de reguladores de crecimiento (medio 7) y en los tratamientos con ANA y BA (medios 1 a 6), en donde se logró la producción de esas enzimas sólo después de siete generaciones en cultivo, coincidiendo con una menor biomasa (Tablas 27 y 28).

Esto parece indicar que la expresión de la peptidasa coagulante de la leche por callos de *C. scolyms* L. no está asociada al crecimiento *in vitro*. Dicho comportamiento concuerda con lo expresado por Yeoman *et al.* (1990), Fowler & Stafford (1992), Constabel & Tyler (1994) y Ertola *et al.* (1994) respecto a que las condiciones culturales que promueven una alta tasa de división celular generalmente no conducen a una elevada formación de metabolitos secundarios.

Por otro lado, también se detectó actividad coagulante en el agar circundante de los callos en cultivo, lo cual indica la liberación exocelular de la enzima. Con respecto a esta liberación podría especularse que es el resultado de la muerte celular con la consiguiente salida del contenido vacuolar o debida a un mecanismo de secreción que se podría activar en condiciones de estrés, como sucede con la producción de varios alcaloides (Williams & Mavituna, 1992). Es de destacar que la liberación exocelular resulta importante para el probable uso industrial de las enzimas coagulantes de la leche obtenidas por cultivo *in vitro* de células de alcauil.

La actividad coagulante de la leche de las peptidasas extraídas de los cultivos de callos fue inhibida por pepstatina 0,1 mM, indicando la presencia de una peptidasa aspártica.

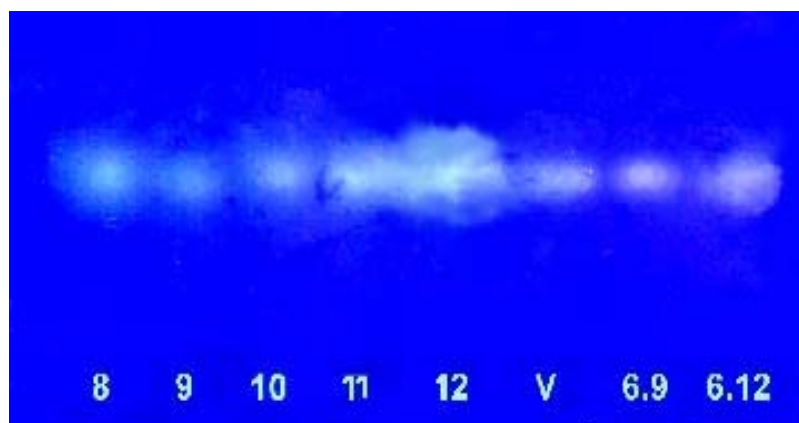
Como se indica en párrafos anteriores, la incorporación de GA₃ en concentraciones de 5 y 10 mg l⁻¹ no incrementó la producción de peptidasas aspárticas coagulantes de la leche. Esto coincide con los resultados de Bethke *et al.* (1996), quienes encontraron que si bien la actividad de las peptidasas cisteínicas (CPs) y aspárticas (APs) almacenadas en las vacuolas de células de cebada están bajo control hormonal, el GA₃ sólo incrementa significativamente la actividad de CPs. También Kim & Minamikawa (1997) obtienen un incremento lineal que llega a triplicar la actividad inicial de las endopeptidasas serínicas y cisteínicas producidas por células en suspensión de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Goldstar en un medio de cultivo con GA₃

9.7.2.3. Análisis electroforético, zimogramas e inmunoblotting

Con el fin de comparar los patrones electroforéticos con la actividad proteolítica de los extractos de callos cultivados en distintos medios y de las flores se efectuaron los zimogramas presentados en la *Figura 41*.

Los patrones proteicos obtenidos por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE) y revelados en zimogramas con gelatina a pH 4 (overlay e incluida) indican que en todos los tratamientos se expresa al menos una proteína con actividad proteolítica (*Figura 41*). Los resultados obtenidos con extractivos de callos de alcaucil indican que con el balance hormonal ANA: BA del medio 6 y con GA₃ y/o ABA se logró la expresión *in vitro* de una peptidasa con movilidad electroforética similar a la que estudiáramos previamente en las flores de alcaucil. Esto también fue corroborado por la presencia en los SDS-PAGE de bandas comunes entre los extractivos de callos y de flores (*Figura 42*).

ZIMOGRAMA GELATINA OVERLAY



- V: Flores maduras.
- 6.9: Callos de 9^a generación en medio 6 con ANA y BA.
- 6.12: Callos de 12^a generación en medio 6 con ANA y BA.
- 7 a 12: Callos en medios AG₃-ABA.

ZIMOGRAMA GELATINA INCLUIDA

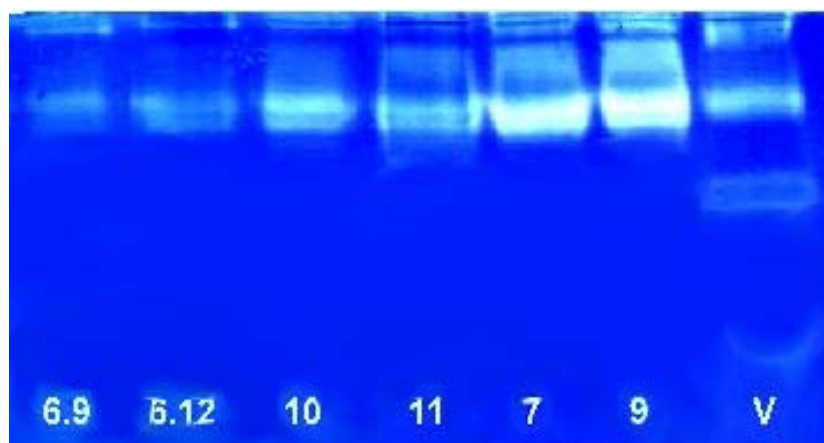
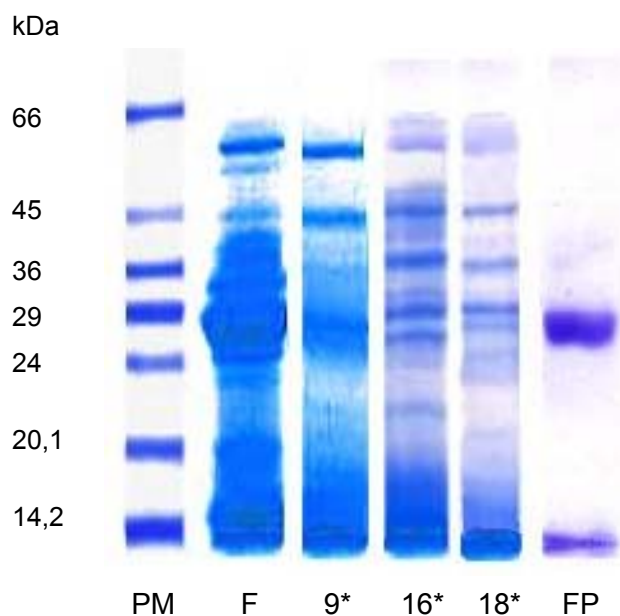


Figura 41.- Zimogramas de los extractivos de las flores maduras y de callos de *C. scolytus* L. cv. Green Globe obtenidos por electroforesis nativa (PAGE) y usando gelatina como sustrato.



En el inmunoblot del SDS-PAGE de los callos del cv. Green Globe cultivados en medio ANA/BA 10:1 de novena generación, la anti-peptidasa contra la subunidad menor de flor reaccionó fuertemente con polipéptidos de masa molecular aparente de 29 y 14 kDa. También se detectaron bandas en la zona de 60 kDa que presumiblemente corresponden al propéptido (*Figura 43*).



Figura.43.- Western blotting de peptidasas de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe.
 Calle 1: peptidasa purificada de flor.
 Calle 2: extracto crudo de flor.
 Calle 3: extracto crudo de callos de novena generación

9.8. SUSPENSIONES CELULARES

9.8.1. Crecimiento

Los cultivos en suspensión de células de *C. scolymus* L. cv. Green Globe se establecieron a partir de un clon de callos seleccionados basándose en su velocidad de crecimiento y contenido de peptidasas coagulantes de la leche y cultivados en el medio 6 descrito en 8.2.2.1.

Se realizaron cultivos de suspensiones finas y cultivos de agregados celulares.

Las suspensiones finas exhibieron escaso crecimiento ($\mu < 0,01 \text{ días}^{-1}$), no produjeron peptidasas coagulantes de la leche y al microscopio óptico las células estaban colapsadas. Por lo anteriormente mencionado no se continuó con su estudio.

Todos los cultivos en medio líquido presentaron color amarillento y tendencia a formar agregados (*Figura 44*). Esto coincide con lo observado por Ordas *et al.* (1991) en las suspensiones de *C. scolymus* L. cv. Romanesco.

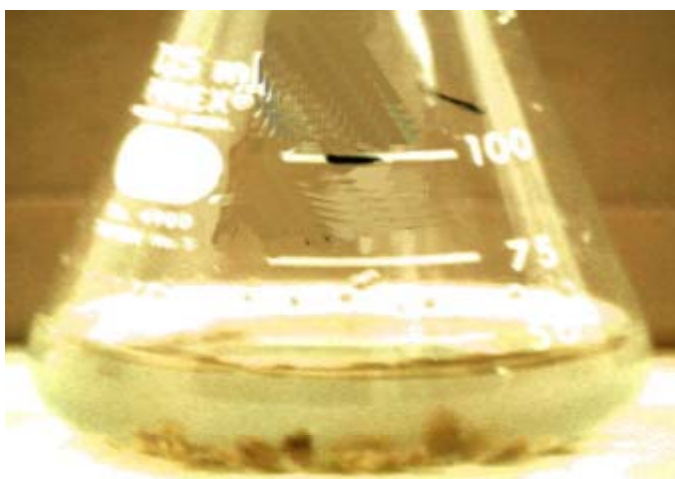


Figura 44.- Cultivo de agregados celulares de alcaucil en medio con ANA 10 : BA 1.

La curva de crecimiento de la biomasa de los cultivos de agregados celulares obtenidos a partir de callos en fase estacionaria se muestra en la *Figura 45A*. La cinética de crecimiento del peso fresco presentó un comportamiento diaúxico similar al de los cultivos de callos. La primera fase exponencial se extendió entre los 4 y 7 días con una μ de $0,21 \text{ días}^{-1}$ y la segunda entre los días 11 al 14 con μ de $0,1 \text{ días}^{-1}$; los tiempos de duplicación (t_d) fueron de 3,3 y 6,9 días, respectivamente.

Los cultivos de agregados celulares iniciados con callos en fase exponencial presentaron un crecimiento significativamente menor ($p \leq 0,05$) que los inoculados con callos en fase estacionaria, alcanzando biomásas de 26 y 69 g l^{-1} , respectivamente. En

esos cultivos la fase exponencial se observó entre los días 4 y 7, la μ fue $0,15 \text{ días}^{-1}$ y la t_d de 4,6 días (*Figura 45B*).

Los tiempos de duplicación de los agregados celulares de alcaucil fueron comparables a los obtenidos por Figueredo *et al.* (1987) con callos (4,2 días) y con suspensiones (5,7 días) de *C. cardunculus* L. y menores que el t_d de 8 días obtenido por Fevereiro *et al.* (1986) con callos de *Sylibum marianum*, ambas especies relacionadas con el alcaucil.

El crecimiento de los agregados celulares se mantuvo a lo largo de ocho generaciones realizando los subcultivos a medio fresco (1:1) cada 20 días.

9.8.2. Producción de peptidasas

Los cultivos en suspensión fina no presentaron actividad coagulante de la leche, pero las pruebas de coagulación realizadas con suspensiones con agregados celulares fueron positivas, indicando la necesidad de una cierta organización morfológica para producir estas peptidasas. Coincidente con esto, Warren (1992) cita varios compuestos celulares cuya tasa de síntesis depende del tamaño del agregado celular: tal es el caso de la producción de citocromo oxidasa, peroxidasa, catalasa y diversos metabolitos secundarios.

En los cultivos obtenidos a partir de callos en fase estacionaria la actividad coagulante exocelular se mantuvo entre 3,2 y 5,5 UCL ml^{-1} durante los días 7 a 21 de iniciado el cultivo. La relación entre la actividad coagulante y el peso fresco (*Figura 46A*) mostró variaciones en función del tiempo: en los primeros cuatro días de cultivo se produjo un incremento exponencial que luego decayó y se estabilizó a partir del décimo día en alrededor de $0,08 \text{ UCL g}^{-1}$.

Los medios exocelulares de los cultivos que se obtuvieron a partir de callos en activo crecimiento presentaron un incremento mayor de la producción de este tipo de peptidasas por unidad de masa durante la fase *lag* y esta relación se estabilizó alrededor de $0,25 \text{ UCL g}^{-1}$ a partir del cuarto día (*Figura 46B*). En estos cultivos la actividad enzimática exocelular varió entre 3,6 y 6,3 UCL ml^{-1} entre los 4 y 21 días con máxima actividad coagulante a los 7 días de cultivo (*Figura 45B*).

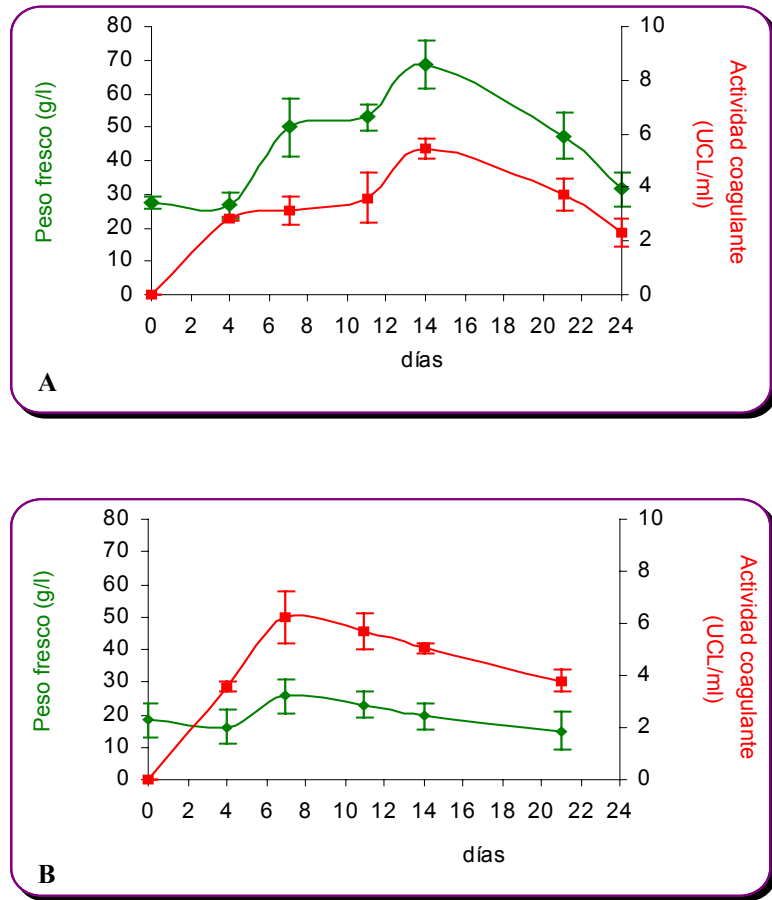


Figura 45.- Cinética de crecimiento y de liberación exocelular de peptidasas por los cultivos de agregados celulares de *C. scolyms* L. cv. Green Globe obtenidos a partir de callos en **A)** fase estacionaria y **B)** fase exponencial. Las barras indican la desviaciones estándar de 4 mediciones.

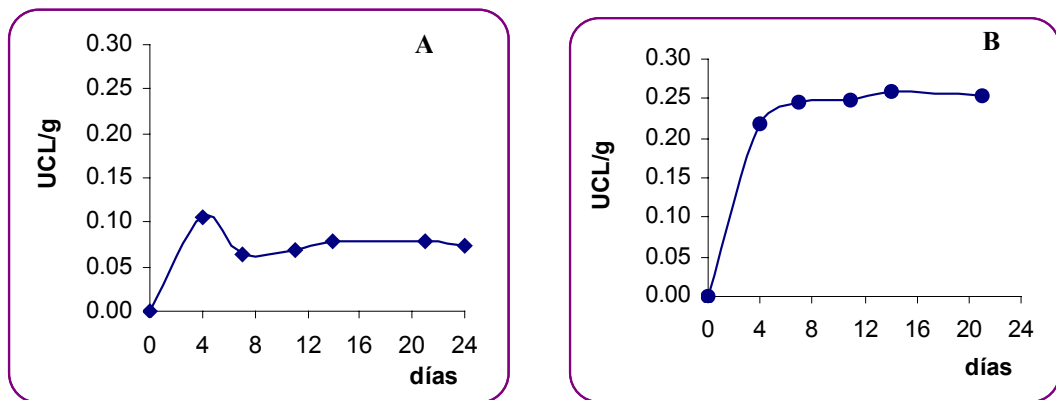


Figura 46.- Actividad peptidásica exocelular por gramo de peso fresco de los cultivos de agregados celulares de *C. scolyms* L. cv. Green Globe obtenidos a partir de callos en **A)** fase estacionaria y **B)** fase exponencial.

El incremento inicial de la actividad peptidásica en el medio de cultivo puede atribuirse a la liberación de enzimas intracelulares, pero la presencia ininterrumpida durante los 21 días de cultivo podría obedecer a alguna de estas razones: a) en las condiciones de cultivo utilizadas las células continúan sintetizando peptidasas coagulantes de la leche, b) dichas enzimas son muy estables o c) estas peptidasas no están sometidas a ningún mecanismo de inhibición por retroalimentación

Los resultados anteriores indican que los cultivos de agregados de células de alcaucil con bajo crecimiento de la biomasa presentaron mayor actividad exocelular coagulante de la leche. Esta relación inversa entre crecimiento y actividad se observó también en los extractivos de los callos.

9.8.3. Electroforesis, zimogramas e inmunoblotting

En el SDS-PAGE del medio de cultivo de las suspensiones celulares se observaron proteínas con igual movilidad electroforética que las de extractos de flor parcialmente purificados (*Figura 47*). El peso molecular determinado por densitometría de las bandas comunes fue de 55, 32 y 28,5 kDa. Esta última banda que en el extractivo de flor se presentó como única y gruesa se corresponde con una o dos bandas delgadas producidas por los agregados celulares de 11 y 7 días de cultivo, respectivamente. La presencia de esas dos bandas en el medio de cultivo de los agregados celulares podría indicar la presencia de isoformas de la peptidasa en estudio tal como observa Yanagawa *et al.* (1999) en el proteosoma 26S de las suspensiones de arroz y de las hojas de espinaca.

En la zona del péptido más liviano presente en la flor (15 kDa) se observó un chorreado proteico que probablemente se corresponda con productos de hidrólisis.

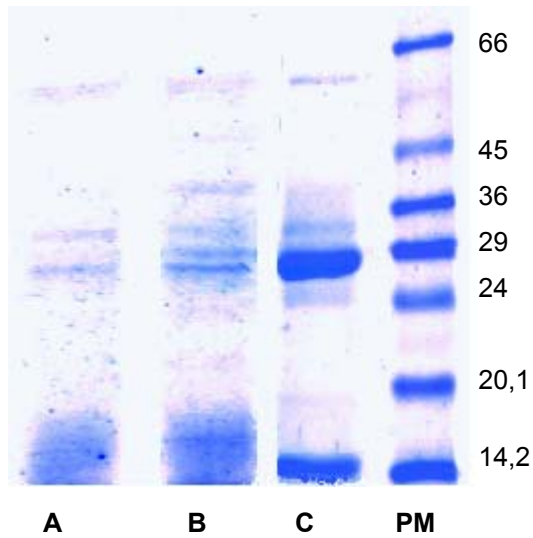


Figura 47.- SDS-PAGE de las proteínas liberadas al medio exocelular por agregados celulares de *Cynara scolymus* L.

A cultivo de 11 días

B cultivo de 7 días

C peptidasa de flor parcialmente purificada

PM marcadores de peso molecular (Sigma MW-SDS-70L)

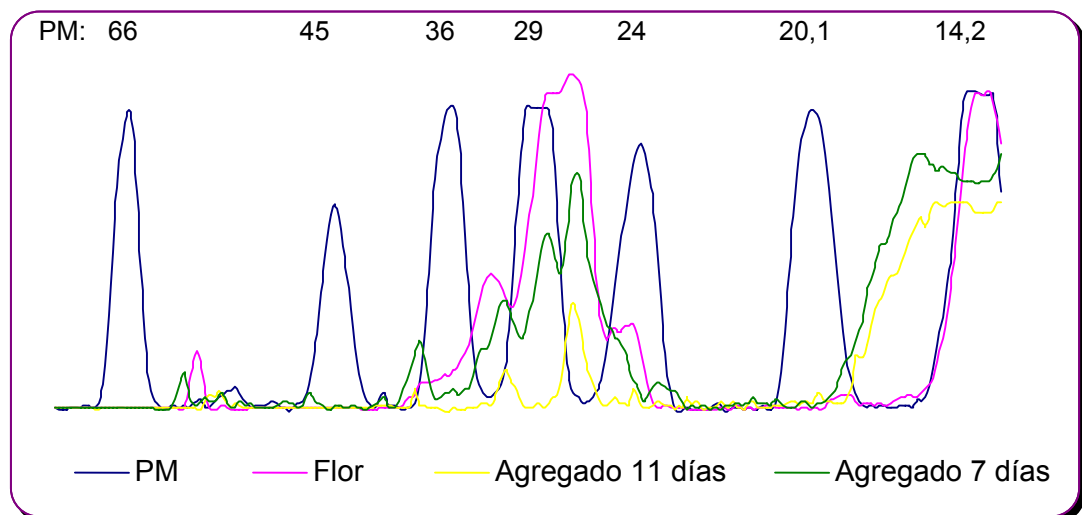


Figura 48.- Densitograma del SDS-PAGE de la Figura 47.

El patrón de proteínas obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE) y revelados en zimogramas con gelatina incluida en la poliacrilamida mostraron que en el medio de cultivo de los agregados celulares se liberan enzimas proteolíticas coincidentes con las de flores y callos (*Figura 49*).

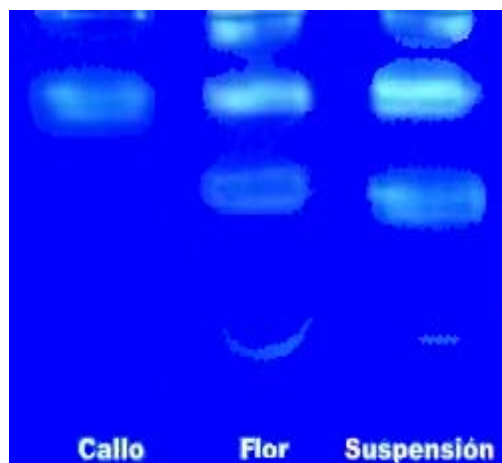
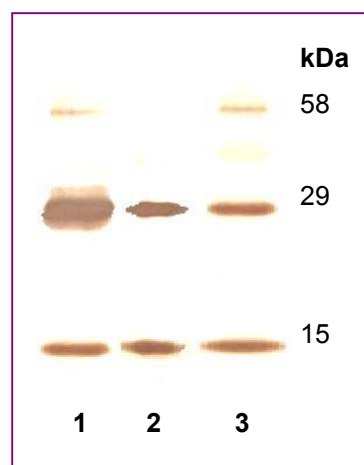


Figura 49.- Zimograma de los extractivos de callos y flores maduras y del medio exocelular de los cultivos de agregados celulares por electroforesis nativa usando gelatina incluida como sustrato.

Los Western blotting utilizando anticuerpos contra la subunidad de 15 kDa de la peptidasa de flor indican que los agregados de células en suspensión sintetizan y liberan al medio la misma enzima que se extrae de flores y callos de alcaucil. (Figura 50).

Figura 50.- Western blotting de cultivos de agregados celulares de *Cynara scolymus* L.
Calle 1.- Extracto crudo de flor.
Calle 2.- Peptidasa de flor purificada.
Calle 3.- Medio exocelular del cultivo de agregados celulares.



Es importante destacar que éste es el primer informe de la producción de proteinasas aspárticas coagulantes de la leche mediante cultivo *in vitro* de células indiferenciadas de *Cynara spp.* Cordeiro et al (1993) estudiaron la producción de proteinasas en suspensiones de *Cynara cardunculus* L., especie cuyas flores contienen una alta concentración de APs coagulantes de la leche, pero obtuvieron una gran heterogeneidad de proteinasas, con predominio de peptidasas cisteínicas. También Lima Costa et al.(1996) lograron la producción de peptidasas por suspensiones de *C. cardunculus* L., pero ellas no fueron caracterizadas en cuanto al grupo catalítico, por lo que no es posible conocer si se trata de APs.

9.9.- ELABORACION Y ANÁLISIS DE QUESOS

Con la finalidad de evaluar la factibilidad de utilizar las proteinasas presentes en flores de alcaucil cv. Green Globe como sustitutos del cuajo bovino se elaboraron quesos de pasta blanda y semidura con leche de vaca y de cabra y se analizaron sensorialmente al final de la maduración. Además se estudió la evolución del pH, la humedad, el nitrógeno total y soluble en agua y la hidrólisis de las α_s - y β -caseínas durante la maduración del queso Gouda.

Dado que la elaboración de los quesos con cuajo animal y vegetal se realizó simultáneamente, utilizando el mismo equipamiento y reactivos, las diferencias observadas pueden atribuirse principalmente a la acción del coagulante.

El extracto floral coaguló la leche en alrededor de 30 minutos, tiempo adecuado para su empleo a escala industrial. El cuajo obtenido fue firme y elástico en todos los casos y el suero producido fue límpido, lo que indicó una alta eficiencia de la enzima en coagular la caseína. La variación de pH de la masa obtenida fue leve, permitiendo realizar un prensado correcto. El rendimiento en peso de los quesos obtenidos con el extracto de flores de alcaucil fue igual o superior al logrado con cuajar bovino.

Para el análisis sensorial se efectuaron *test* discriminativos (Lawless & Heymann, 1999) de los productos elaborados, utilizando pruebas triangulares con un panel de 12 evaluadores entrenados.

9.9.1. Quesos de pasta blanda

El queso de pasta blanda tipo Cuartirolo se elaboró utilizando leche de vaca y el fermento TH3 (CHR Hanse's Lab.). El extracto floral coaguló la leche en 30 minutos y el cuajo bovino en 27 minutos. La acidez del suero al corte fue de 10°Dornic y el pH de la masa de 6,5. Estos parámetros se mantuvieron dentro de los valores usuales en la elaboración de queso Cuartirolo (Scott, 1992). El rendimiento de los quesos obtenidos con el extracto de flores de alcaucil fue un 17 % superior al logrado con cuajar bovino, pues se obtuvieron 1,35 kg por cada 10 litros de leche, mientras que con igual cantidad de leche y cuajo bovino se obtuvieron 1,15 kg de masa. Los quesos obtenidos presentaron buena textura y color antes y después de la maduración. Aunque el queso Cuartirolo obtenido presentó atributos de cremosidad y derretibilidad adecuados, no se realizaron pruebas sensoriales discriminatorias ni análisis fisicoquímicos, ya que se detectó un gusto amargo residual.

9.9.2. Quesos de pasta semidura (leche de vaca)

Se elaboró queso tipo Gouda de pasta semidura utilizando leche de vaca y el fermento CHN11 (CHR Hansen's Lab.). El extracto floral y el cuajo bovino coagularon la leche en 30 minutos a 35°C. La acidez del suero al corte fue de 11°Dornic y el pH de la masa de 6,37 con el cuajo vegetal y de 6,49 con el animal. Después del lirado, paleado y lavado, la acidez en el primero fue de 9°Dornic (pH 6,44) y de 8,5°D (pH 6,58) cuando se utilizó cuajo bovino. El rendimiento de los quesos obtenidos con el extracto de flores de alcaucil fue similar al logrado con cuajar bovino (9 % al final de la maduración). Los quesos tipo Gouda obtenidos con el extracto vegetal y leche de vaca no presentaron diferencias con el control (cuajo animal) en la textura ni el color al comienzo de la maduración, pero al finalizar la maduración se detectó un leve gusto amargo residual.

Según Eck (1990) la hidrólisis de las α_s - y β -caseínas podría reducirse aumentando la concentración de sal durante el afinado de los quesos, debido a que el descenso de la actividad del agua disminuye la actividad de las enzimas proteolíticas. Con la finalidad de evaluar si la actividad proteolítica del extracto de flores de alcaucil es afectado por la sal se elaboraron quesos Gouda aumentando el tiempo de inmersión en NaCl a 30 y 40 horas. En estos quesos se estudió la evolución del pH, humedad, nitrógeno total y soluble y la hidrólisis de α_s - y β -caseínas. Como testigos se utilizaron quesos preparados con cuajo bovino en condiciones estándar (salado durante 24 horas).

9.9.2.1. pH y humedad

En la *Figura 51* se muestran las variaciones en el pH (centro y superficie) y de la humedad durante la maduración de los quesos Gouda elaborados con cuajo animal (CA) en condiciones estándar y con cuajo vegetal (CV) y salados durante 30 o 40 horas.

A los 44 días de maduración el pH en el centro de los quesos elaborados con CV y salados 30 y 40 horas fue de 5,1 y 5, respectivamente, mientras que el pH exterior fue 5,17 y 5,05. Los quesos elaborados con CA presentaron valores mayores de pH : 5,30 en el centro y 5,37 en el exterior (*Figura 52*).

La evolución del pH durante la maduración se mantuvo en el rango recomendado (FAO, 1986; Choisy *et al.*, 1990) para permitir la acción de las bacterias lácticas e inhibir el desarrollo de una flora perjudicial (coliformes, bacterias de putrefacción, anaerobios esporulados). Por otra parte no se observaron grandes variaciones en el curso de la maduración, lo que indica que las proteínas y el fosfato de calcio ejercieron un adecuado efecto tampón. Valores similares de pH han sido reportados por Sousa & Malcata (1997)

y Fernández-Salguero & Sanjuán (1999) al estudiar la evolución bioquímica de los quesos preparados con extractos de flores de cardo.

El contenido de humedad al final de la maduración (*Figura 52*) fue de 42,5 % cuando se utilizó CV y se saló durante 30 horas y de 40 % cuando el salado se extendió a 40 horas. Los quesos elaborados con CA presentaron un menor porcentaje de humedad (38 %). Estos resultados indican que los quesos elaborados con CV retienen más agua y que el incremento en el tiempo de salado permite disminuir su contenido y aproximarse al valor del queso testigo. El contenido de humedad promedio para los quesos tipo Gouda mencionado en el Manual de elaboración de quesos (FAO, 1986) es de 40,5%.

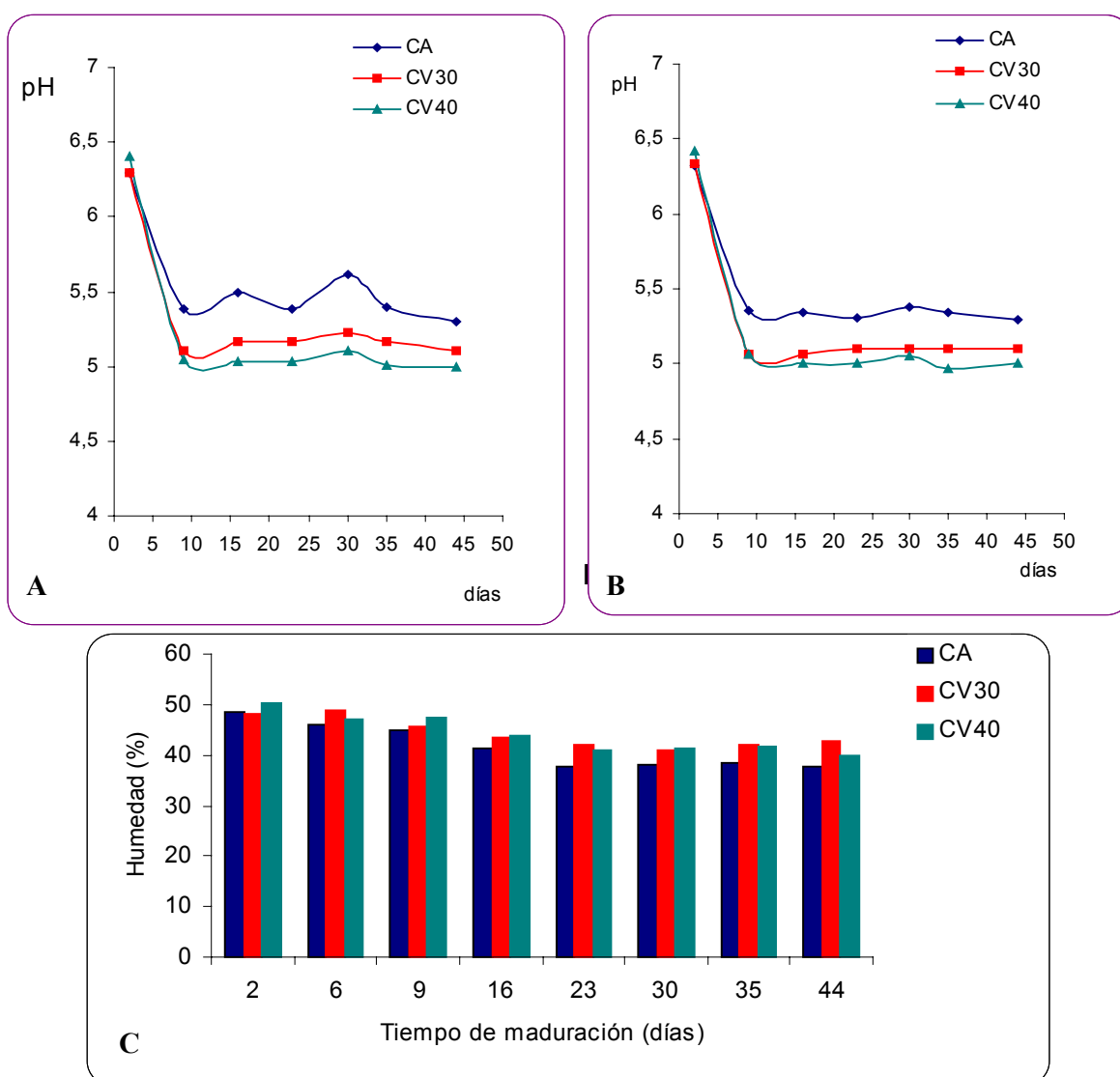


Figura 51.- Evolución de: (A) pH en la superficie, (B) pH en el centro y (C) la humedad (C) durante la maduración de quesos tipo Gouda elaborados con cuajo animal (CA) en condiciones estándar y con cuajo vegetal salado durante 30 horas (CV30) o 40 horas (CV40).

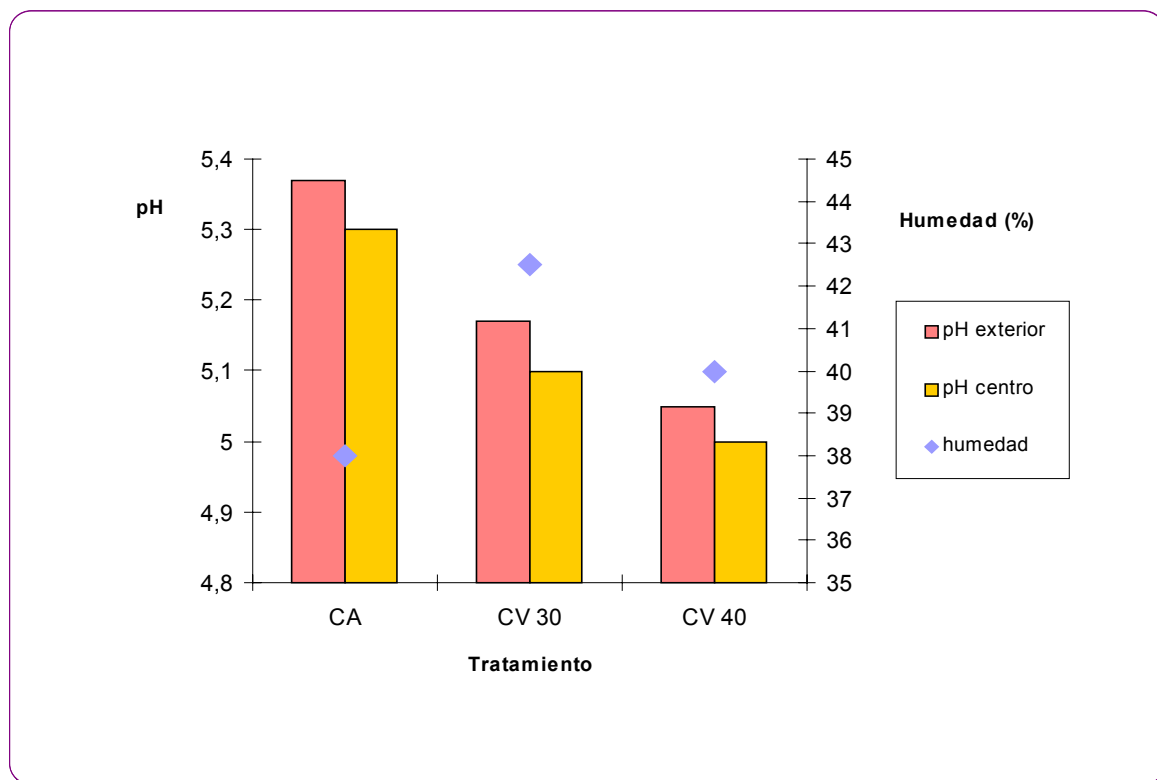


Figura 52.- Porcentaje de humedad y pH en la superficie y en el centro de los quesos Gouda elaborados con cuajo animal (CA) y con cuajo vegetal salados durante 30 horas (CV30) y 40 horas (CV40), al final de la maduración (44 días)

9.9.2.2. Evolución del nitrógeno total y soluble

Durante la maduración de los quesos se produce la digestión de la masa por la acción del cuajo, de las enzimas presentes en la leche y de las adicionadas con el cuajo y los *starters* y por las producidas por microorganismos del ambiente. Estas transformaciones bioquímicas modifican la composición y estructura de la cuajada y en consecuencia su aspecto, consistencia, color, sabor y aroma.

Diferentes tipos de degradación se dan simultánea o sucesivamente en la pasta de un queso en maduración, tales como la fermentación de la lactosa y la hidrólisis de las proteínas y de la materia grasa. Si bien el queso en vías de curación representa un ecosistema y un biorreactor no conocido en la totalidad de sus dimensiones, la actividad peptidásica es de particular importancia en la calidad del queso (Choisy *et al.*, 1990).

La acción del cuajo representa una parte importante en la degradación de las proteínas, dado que las condiciones fisicoquímicas del queso permiten su actividad a lo largo de la etapa de maduración. Además de su acción específica sobre la κ -caseína, las enzimas utilizadas en la coagulación ejercen acción proteolítica sobre las α_s - y β -caseínas, produciendo péptidos de menor tamaño. La formación de compuestos

nitrogenados solubles en agua es una consecuencia de esa acción (Choisy *et al.*, 1990).

Por lo anteriormente expresado y con la finalidad de estudiar la proteólisis durante la maduración de los quesos Gouda se determinó el contenido de nitrógeno total (NT) y soluble en agua (NS) por el método de Kjeldahl.

A lo largo de la maduración se observó mayor degradación de las caseínas en los quesos elaborados con CV que en los preparados con CA. Esto se tradujo en que el contenido de NS (como porcentaje del NT) fue aproximadamente el doble en los quesos elaborados con CV respecto que en los coagulados con CA. Así, el promedio de NS en las últimas tres muestras analizadas (30, 35 y 44 días) fue un 80,5% mayor en los quesos obtenidos con CV (21,3% de NT) que en los provenientes de utilizar CA (11,8% de NT). La proteólisis del CV también fue influenciada por la concentración de sal (*Figura 53*), observándose a partir del sexto día de maduración que la relación NS/NT fue menor en los quesos salados durante más tiempo respecto de los que permanecieron 30 horas en NaCl.

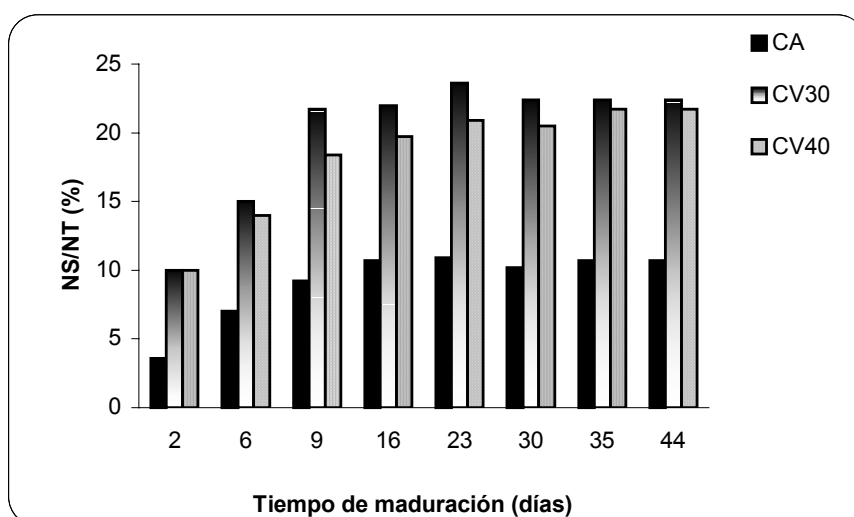


Figura 53.- Relación del nitrógeno soluble en agua (NS) como proporción del nitrógeno total (NT) en los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y vegetal con 30 horas (CV30) o 40 horas (CV40) de salado, durante la maduración de quesos tipo Gouda.

Los resultados obtenidos coinciden con los de Sousa & Malcata (1997), quienes observaron altos porcentajes en la relación NS/NT al utilizar extractos de flores de cardo como cuajo para preparar quesos tradicionales portugueses utilizando leches bovina, ovina y caprina.

9.9.2.3. Hidrólisis de α_s - y β -caseínas

Dado que los productos de la degradación de las caseínas tienen efecto sobre el rendimiento, consistencia y sabor del queso, al estudiar nuevos coagulantes de la leche es de fundamental importancia conocer su acción sobre estas proteínas. Para ello se estudió la degradación de las α_s - y β -caseínas bovinas mediante electroforesis de la fracción insoluble en agua de los quesos en geles de poliacrilamida con urea.

Las electroforesis muestran la degradación de α_s - y β -caseínas con la concomitante aparición de bandas de mayor movilidad que corresponden a los productos de hidrólisis (Figura 54).

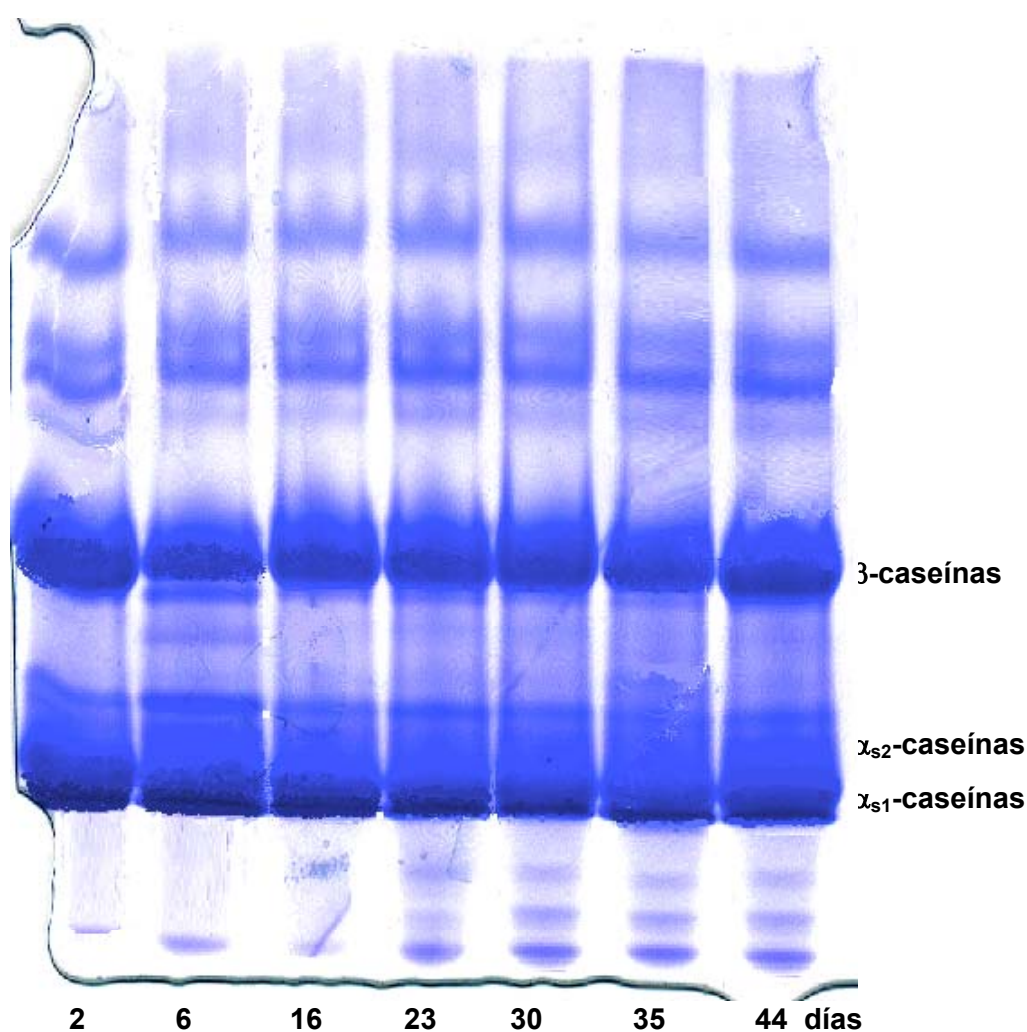


Figura 54.- Electroforesis urea-PAGE de la fracción insoluble en agua de quesos tipo Gouda elaborados con cuajo animal, a lo largo de la maduración.

En la *Figura 55* se muestra la evolución a lo largo de la maduración del área de las bandas de α_s - y β -caseínas (como porcentaje de las proteínas totales) de la fracción insoluble en agua de los quesos elaborados con ambos tipos de cuajo y separadas por urea-PAGE. En ella se observa que el porcentaje de α_s - y β -caseínas decrece con el tiempo y que la hidrólisis fue más intensa al comienzo de la maduración. En los quesos preparados con CV la proteólisis continuó durante los 44 días, mientras que en las muestras hechas con CA la hidrólisis se estabilizó a partir de los 16 días.

La actividad caseinolítica también fue afectada por el tratamiento de salado. Los quesos salados durante 30 horas presentaron mayores porcentajes de degradación que los salados 40 horas. Así, en los quesos preparados con CV y salados durante 30 horas se produjo, al final de la maduración, porcentajes de degradaciones (referidos al contenido inicial) similares de α_s - y β -caseínas (40,5 y 41,9%) que fueron 55 y 93% mayores que los producidos en los quesos elaborados con CA (26,1 y 21,7%).

Al aumentar el tiempo de salado a 40 horas en los quesos con CV, si bien la hidrólisis de las α -caseínas (32,5%) fue mayor que en los quesos hechos con CA (26,1%), la degradación de β -caseínas (21 y 21,7%) fue similar al final de la maduración en ambos tipos de quesos (*Figura 56*).

Los resultados obtenidos permiten concluir que la actividad caseinolítica de los extractos de flores de alcaucil puede atenuarse aumentando el tiempo de salado de la masa en la elaboración de quesos tipo Gouda.

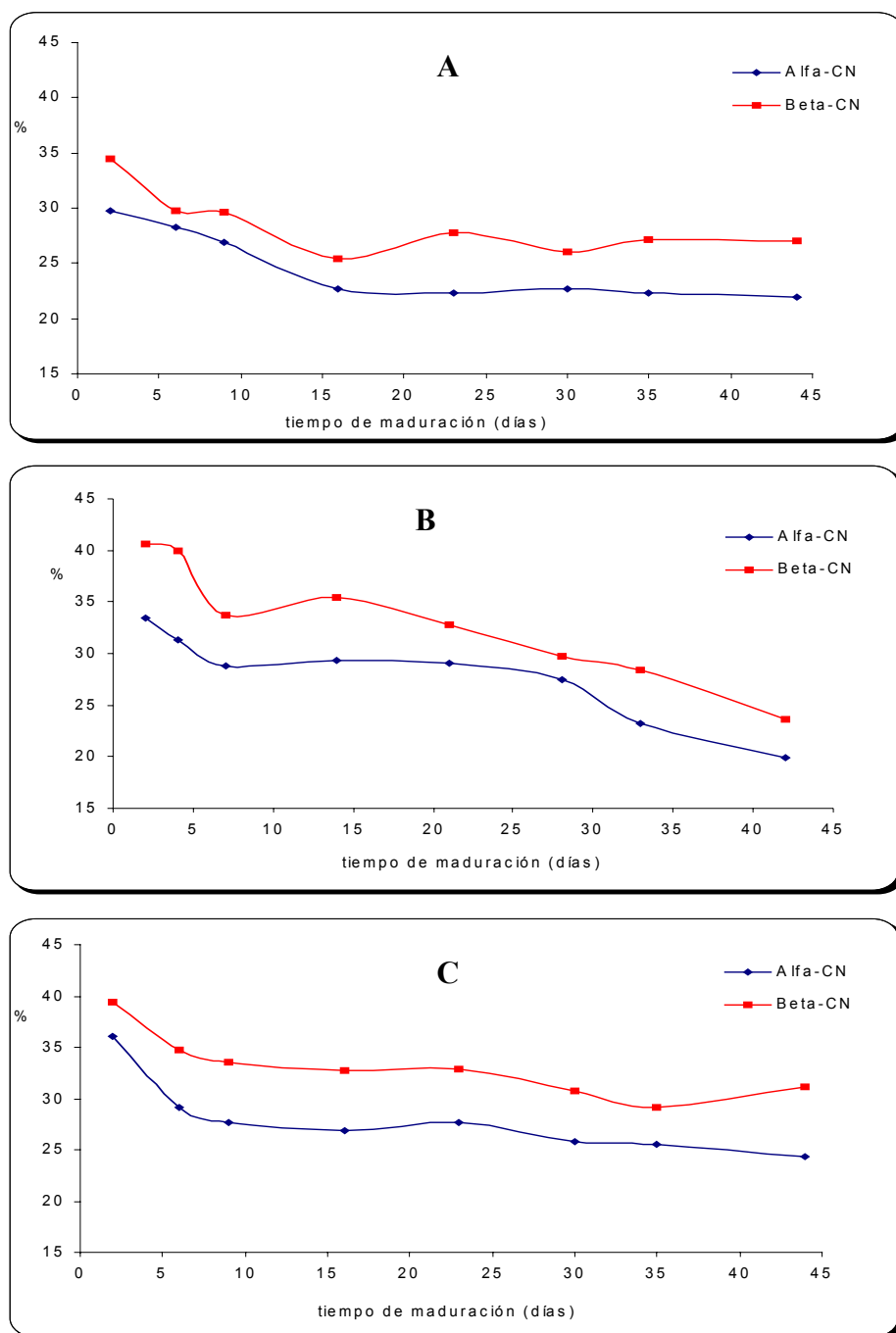


Figura 55.- Evolución durante la maduración de α_s - y β -caseínas (como porcentaje de las proteínas totales) de la fracción insoluble en agua de los quesos Gouda preparados con (A) cuajo animal en condiciones estándar, (B) cuajo vegetal-30 horas de salado y (C) cuajo vegetal-40 horas de salado.

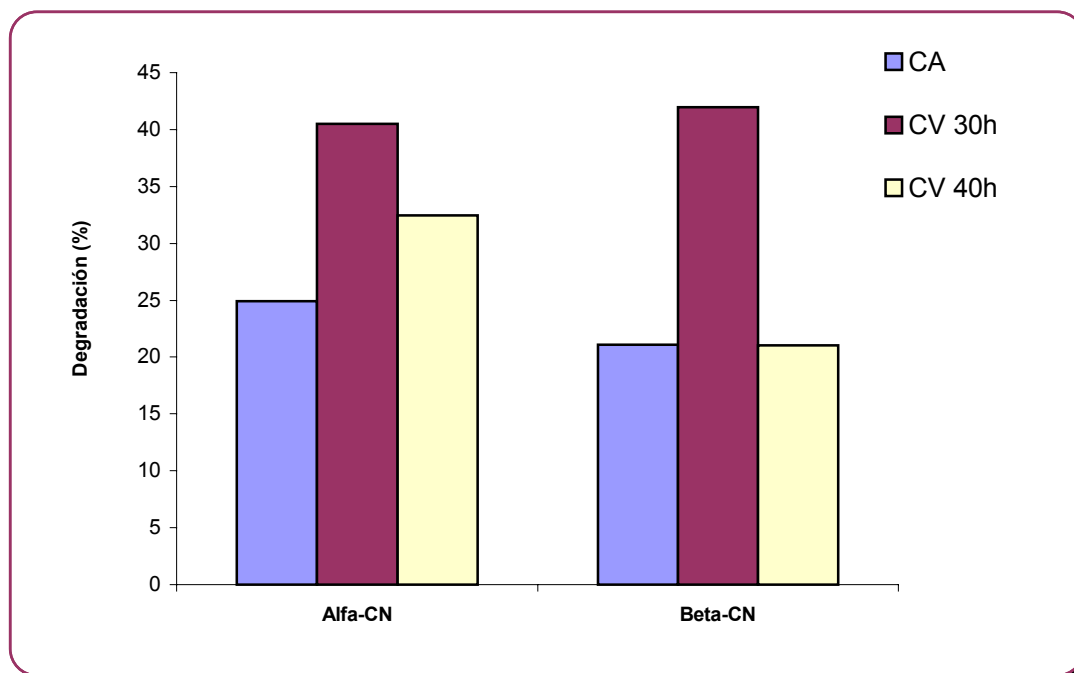


Figura 56.- Porcentajes de degradación de α - y β -caseínas (CN) [referido al contenido inicial de cada caseína] al cabo de 44 días de maduración de los quesos Gouda elaborados con cuajo animal (CA) y cuajo vegetal (CV) con 30 y 40 horas de salado, respectivamente.

9.9.3. Quesos de pasta semidura (leche de cabra)

La leche caprina presenta ventajas dietéticas y tecnológicas que aconsejan estimular su consumo. Entre ellas cabe destacarse la alta digestibilidad debida al menor tamaño de los glóbulos grasos y a la cuajada fibrosa y fina que se forma en el estómago humano, hechos que facilitan la acción de las lipasas y peptidasas gastrointestinales. Desde el punto de vista tecnológico la utilización de la leche de cabra en la producción de quesos es de sumo interés, tanto por los altos rendimientos que se obtienen como por la buena aptitud en la coagulación y fermentación, a lo que se suma su sabor y aroma *sui-generis*, debido principalmente a la producción de ácidos grasos volátiles como cáprico, caprílico y caproico (Brito, 1986).

Se elaboró queso de pasta semidura utilizando leche de cabra y el fermento TH4 (CHR Hansen's Lab.). Incubando a 35°C, el extracto de flores de alcaucil coaguló la leche en 37 minutos y el cuajo bovino en 25 minutos. La acidez del suero al corte fue de 14°Dornic. El rendimiento de los quesos obtenidos con el extracto de flores de alcaucil fue 8 % superior al logrado con cuajar bovino obteniéndose 1,69 kg por cada 10 litros de leche.

En las pruebas triangulares discriminativas del análisis sensorial no se detectaron diferencias significativas (5%) entre los quesos de cabra elaborados con cuajo bovino y extracto floral.

Los resultados obtenidos indican la factibilidad del uso de los extractivos de flores de alcaucil en la industria quesera y señalan la importancia de tener una producción continua de la enzima por medio de células en cultivo.