

## 10.- CONCLUSIONES

Las peptidasas son utilizadas en variados procesos tecnológicos, tales como la tiernización de carnes, la elaboración de cerveza y de quesos, la panificación, la industria de polvos detergentes y el procesado de fibras textiles y cueros, además de su utilización en la industria farmacéutica y en el tratamiento de efluentes industriales. Desde el punto de vista económico representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial.

El número de peptidasas vegetales que han sido aisladas y caracterizadas es muy bajo, siendo más escaso aún el conocimiento del que se dispone sobre especies de plantas nativas o cultivadas en Argentina potencialmente productoras de peptidasas, hecho que impide el probable aprovechamiento tecnológico de nuestros recursos naturales renovables.

El estudio de las propiedades bioquímicas y estructurales de nuevas fitopeptidasas representa un aporte al conocimiento científico básico, que a su vez provee información valiosa para el análisis de los procesos bioquímicos que transcurren en los vegetales de los que se las obtiene, así como de los posibles roles fisiológicos (movilización de reservas, senescencia, respuesta a estrés, polinización) que dichas peptidasas cumplen en los mismos.

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales permite la producción de metabolitos con independencia de las condiciones climáticas, edafológicas y sanitarias, por lo que constituye una importante herramienta para la producción continua de peptidasas y para realizar estudios celulares y metabólicos.

Para producir quesos se usa tradicionalmente el cuajo obtenido del estómago de mamíferos lactantes, que contiene principalmente quimosina, la endopeptidasa aspártica responsable de la hidrólisis específica del enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la  $\kappa$ -caseína bovina. Debido tanto a la escasez y al alto costo del cuajo obtenido de terneros lactantes como al incremento mundial del consumo de quesos, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de nuevos coagulantes de la leche. Esto ha llevado a explorar la capacidad coagulante de extractos de plantas, tejidos animales, bacterias y hongos (Eck, 1990). El empleo de fitopeptidasas es particularmente interesante en el caso de aquellas comunidades que por razones culturales o religiosas no consumen quesos elaborados con proteinasas bovinas ni microbianas. En algunos países como Portugal se utilizan peptidasas aspárticas de origen vegetal en la producción de quesos blandos (tipos Serpa y Serra) con características organolépticas particulares (Heimgartner et al., 1990).

En el presente trabajo se estudiaron las peptidasas coagulantes de la leche presentes en plantas de alcaucil (*Cynara scolymus* L. cv. Green Globe). Las peptidasas de flores maduras fueron aisladas, purificadas y caracterizadas. Con el propósito de lograr una fuente continua de enzimas se indujo su expresión en cultivos *in vitro* indiferenciados. Además se evaluó la factibilidad de obtener quesos con los extractos crudos de las flores.

### **Aislamiento, purificación y caracterización de peptidasas de alcaucil**

El estudio de la expresión de peptidasas en extractos crudos de diferentes órganos de plantas de alcaucil cultivadas en Argentina reveló que las enzimas con actividad proteolítica y coagulante de la leche se localizan principalmente en las flores maduras, siendo menores al 30 % las actividades relativas en el papus, en las flores inmaduras y en las hojas adultas. En el resto de los órganos no se detectó actividad peptidásica.

Dado que en la producción de enzimas de aplicación industrial se recomienda contar con preparaciones del mínimo nivel de pureza compatible con las exigencias del proceso en las que se las va a utilizar (Illanes, 1994), se juzgó oportuno caracterizar las preparaciones crudas de los extractos de flores de alcaucil. A tal fin se ensayó la acción frente a diferentes sustratos y se analizó el comportamiento en diferentes condiciones de pH y temperatura, así como el efecto que ejercen algunos activadores e inhibidores sobre la actividad peptidásica del extracto crudo de las flores.

Las preparaciones crudas de flores resultaron ser activas frente a diversos sustratos proteicos: caseína, azocaseína, leche y hemoglobina desnaturalizada. Dado que la caseína precipita a pH menores de 6, se utilizaron hemoglobina y azocaseína para realizar el ensayo del efecto del pH sobre la actividad peptidásica. Más del 90 % de actividad hemoglobinolítica se observó en el rango de pH 3,5 a 5, en tanto que con azocaseína como sustrato la máxima actividad se registró a pH 4,5 – 5,0. La actividad óptima de la preparación cruda de las flores maduras de alcaucil se manifestó a valores ácidos de pH, en coincidencia con el comportamiento típico de las peptidasas aspárticas (Barrett *et al.*, 1998).

El comportamiento térmico de esta peptidasa autoriza a considerar su potencial utilización en la fabricación de quesos, dado que la actividad peptidásica se inactivó por calentamiento moderado. La actividad caseinolítica prácticamente no sufrió cambios después de mantener la enzima durante 3 horas a 37°C y fue aceptablemente elevada luego de una incubación durante 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 residual a los 65°C se redujo bruscamente al 27 % en 5 minutos.

Los resultados obtenidos en los ensayos de activación e inhibición permitieron concluir que la peptidasa presente en las flores maduras de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe pertenece al grupo de las peptidasas aspárticas, proponiéndose el nombre de “scolymina” para designar a dicha peptidasa.

Se diseñaron diferentes estrategias para lograr la purificación de *scolymina*. La precipitación inicial con acetona produjo la pérdida de un 89 % de la actividad coagulante, por lo que se decidió trabajar con extractos acuosos en buffer fosfato de potasio de pH 7. La cromatografía y recromatografía de intercambio aniónico permitió aislar dos peptidasas con similares pesos moleculares (28,5 y 29,6 kDa). La ausencia de actividad proteolítica en los zimogramas obtenidos a partir de SDS-PAGE bajo condiciones no desnaturizantes (hemoglobina a pH 4) sugirieron la naturaleza polimérica de las proteínas aisladas, por lo que se diagramaron otros esquemas de purificación.

La segunda estrategia consistió en realizar una precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y en purificar por intercambio aniónico la fracción obtenida con 60–80 % de la sal, que fue la que presentó mayor actividad coagulante. Si bien removi6 el material viscoso presente en el extracto crudo e increment6 la actividad coagulante específica en un 38 %, la precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ocasion6 la pérdida del 50 % de las peptidasas coagulantes de la leche. La cromatografía y recromatografía en columna de intercambio aniónico permitió purificar la enzima 3,9 veces con un rendimiento del 15 % de la actividad del extracto crudo, obteniéndose una proteína formada por dos subunidades de 28,6 y 14,1 kDa.

Los pasos involucrados en la tercera estrategia de purificación del extracto acuoso de las flores de *C. scolymus* L. cv. Green Globe fueron adsorción con carbón activado y cromatografías de intercambio aniónico y de afinidad. La adsorción con carbón activado permitió eliminar fenoles y otras sustancias que absorben al UV, según se constat6 con la caracterización espectrofotométrica de los extractos crudos tratados con carbón. La utilización de técnicas cromatográficas (intercambio iónico y afinidad) permitió purificar la *scolymina*. El uso de un intercambiador aniónico posibilit6 la separación de fracciones activas, denominadas IV y V, con pesos moleculares aproximados de 30 kDa y que en el isoelectroenfoco presentaron bandas de pI 4 que resultaron proteolíticamente activas en los zimogramas con hemoglobina como sustrato. El posterior pasaje del pico V por una columna de pepstatina-agarosa permitió purificar tres veces la enzima del extracto crudo con un rendimiento del 33 %, obteniéndose una proteína coagulante de la leche formada por dos subunidades de 28,5 y 14,5 kDa, a las que se denomin6 subunidades A y B,

respectivamente. La espectrometría de masas MALDI de la subunidad B permitió determinar una masa de 15.358 Da y el amino terminal presentó un 96 % de homología con la subunidad menor de la cardosina A.

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes de la *scolymina* purificada por afinidad y almacenada a 4°C puso en evidencia un autoprocesamiento de la peptidasa, que fue confirmada por inmunoblots realizados con la anti-peptidasa contra la subunidad B de la enzima. 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. Esto sugiere la posibilidad de que la peptidasa aspártica de las flores de *C. scolyms* L. se produzca como una proenzima y que las bandas mencionadas 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, hecho que ya fue demostrado en APs de plantas, como en el caso de la fitepsina de cebada (Glathe *et al.*, 1998) y de la cardosina A de cardo (Ramalho-Santos *et al.*, 1998b). El patrón de conducta reseñado ha sido bien caracterizado en APs animales tales como el pepsinógeno A humano y en la procatepsina D (Barrett *et al.*, 1998).

### **Expresión de peptidasas coagulantes de la leche por cultivo *in vitro* de alcaucil**

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Cynara scolymus* L. la naturaleza del explanto utilizado, la técnica de desinfección, la composición del medio de cultivo y los reguladores de crecimientos necesarios dependieron del cultivar seleccionado: Francés Precoz o Green Globe.

Los callos de *C. scolyms* L. cv. Francés Precoz fueron establecidos en medio MS suplementado con ANA y BA, obteniéndose el mayor crecimiento en biomasa cuando la combinación ANA:BA (mg l<sup>-1</sup>) fue de 1:0,1. En relación con la producción de enzimas con este cultivar y en esas condiciones de cultivo, sólo se obtuvieron peptidasas que no coagularon la leche durante las tres generaciones en las que se realizó el estudio.

La obtención de callos friables de *C. scolyms* L. cv. Green Globe se logró cuando el medio MS fue suplementado con la combinación ANA:BA (mg l<sup>-1</sup>) 10:1. Esta combinación fue la que permitió lograr el mayor crecimiento y también producir peptidasas, las que no presentaron actividad coagulante hasta el octavo repique (con subcultivos cada 4 semanas). La actividad coagulante de leche expresada a partir del octavo subcultivo fue hasta ese momento intracelular, pero a partir del décimo subcultivo se comenzó a detectar liberación exocelular que fue aumentando hasta la generación decimosexta, en la que se estabilizó la producción.

La incorporación de GA<sub>3</sub> en concentraciones de 5 y 10 mg l<sup>-1</sup> no incrementó la producción *in vitro* de peptidasas coagulantes de la leche.

La expresión y producción de las enzimas en estudio estuvieron vinculadas al balance hormonal empleado, observándose mayor actividad en los cultivos de callos con bajo crecimiento, lo que parece indicar que la expresión de esta peptidasa no está asociada al crecimiento *in vitro*.

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.

Las ensayos de inhibición con pepstatina de las enzimas obtenidas por cultivos de callos y suspensiones indicaron que eran peptidasas aspárticas. Los Western blotting utilizando anticuerpos contra la subunidad B de *scolymina* demostraron que los callos y los agregados de células en suspensión sintetizan y liberan al medio la misma enzima que se extrae de flores de alcaucil.

En consecuencia se puede afirmar que en el caso de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe tanto algunos órganos de la planta entera (flores) como los cultivos *in vitro* producen enzimas proteolíticas coagulantes de la leche. 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 scolymus* L.

### **Utilización en tecnología de alimentos**

Con la finalidad de verificar la posibilidad de utilizar las peptidasas aspárticas coagulantes de la leche presentes en flores de alcaucil como sustitutos del cuajo bovino se elaboraron quesos con leche de vaca y de cabra.

El extracto floral coaguló la leche entre 20 y 30 minutos, tiempo adecuado para su empleo a escala industrial. El cuajo obtenido fue firme y elástico en todos los casos, permitiendo el moldeado en las condiciones habituales. El suero producido fue límpido, lo que indica alta eficiencia de la enzima en coagular la caseína. La variación de pH de la masa fue leve, permitiendo realizar un prensado correcto antes del salado. 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 (Lawless & Heymann, 1999) se efectuaron *tests* discriminativos de los productos elaborados, utilizando pruebas triangulares con un panel de 12 evaluadores entrenados. Aunque el queso Cuartirolo obtenido presentó atributos

de cremosidad y derretibilidad adecuados, no se realizaron las pruebas sensoriales, ya que se detectó un gusto amargo residual.

El queso Gouda (pasta semidura) obtenido con el extracto vegetal y leche de vaca no presentó diferencias con el control (cuajo animal) en la textura ni en el color al inicio del análisis sensorial, pero al finalizar la maduración se detectó un leve gusto amargo residual que puede atribuirse a la acción proteolítica sobre  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseínas. El incremento del tiempo de inmersión de los quesos en solución de NaCl disminuyó la actividad caseinolítica, lo que fue corroborado con la disminución en el porcentaje de nitrógeno soluble. Las electroforesis desnaturalizantes en presencia de urea permitieron evaluar las variaciones producidas en las fracciones de caseínas. Al final de la maduración se observó que aumentando el tiempo de salado en los quesos elaborados con cuajo vegetal se lograba disminuir la degradación de las  $\beta$ -caseínas, obteniéndose valores similares a los detectados con cuajo animal (21 y 21,7%, respectivamente).

En el queso de pasta semidura elaborado con leche de cabra no se encontraron diferencias significativas al 5% en las características sensoriales de los quesos elaborados con cuajo bovino o vegetal.

Los resultados obtenidos indican la factibilidad del uso de los extractos crudos 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 *in vitro*.