

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD CIENCIAS EXACTAS**



Tesis de Doctorado

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y
PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE PEPTIDASAS DE ALCAUCIL
COAGULANTES DE LA LECHE**

Berta Elizabet Llorente

Director: Dr Néstor O. Caffini
Co-Director: Dra Ana María Giulietti

2000

1.- PEPTIDASAS. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. DIVERSIDAD DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.....	1
1.1.1. <i>Clasificación y mecanismos.....</i>	1
1.1.1.1. <i>Peptidasas serínicas y treonínicas.....</i>	2
1.1.1.2. <i>Peptidasas cisteínicas.....</i>	2
1.1.1.3. <i>Peptidasas aspárticas.....</i>	3
1.1.1.3.1. <i>Mecanismo de acción.....</i>	3
1.1.1.3.2. <i>Estructura tridimensional.....</i>	4
1.1.1.4. <i>Metalopeptidasas.....</i>	4
1.1.1.5. <i>Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido.....</i>	4
1.2. INHIBIDORES DE PEPTIDASAS.....	5
1.2.1. <i>Peptidasas serínicas.....</i>	5
1.2.2. <i>Peptidasas cisteínicas.....</i>	5
1.2.3. <i>Peptidasas aspárticas.....</i>	6
1.2.4. <i>Metalopeptidasas</i>	6
1.3. PRINCIPALES APLICACIONES DE LAS PEPTIDASAS.....	6
1.3.1. <i>Elaboración de quesos.....</i>	6
1.3.1.1. <i>Mecanismo de la coagulación.....</i>	6
1.3.1.2. <i>Enzimas proteolíticas.....</i>	8
1.3.2. <i>Elaboración de cerveza.....</i>	9
1.3.3. <i>Tiernización de carnes.....</i>	9
1.3.4. <i>Panificación.....</i>	9
1.3.5. <i>Proteínas modificadas para la industria alimenticia.....</i>	10
1.3.6. <i>Aditivos en polvos detergentes.....</i>	10
1.3.7. <i>Manufactura de cueros.....</i>	10
1.3.8. <i>Uso en la industria textil</i>	10
1.3.9. <i>Usos farmacológicos.....</i>	11
2.- PEPTIDASAS VEGETALES.....	12
2.1. ESTRATEGIAS PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS VEGETALES.....	12
2.1.1. <i>Aislamiento de proteínas</i>	12
2.1.2. <i>Purificación de proteínas</i>	13
2.1.2.1. <i>Solubilidad.....</i>	13
2.1.2.2. <i>Separaciones cromatográficas.....</i>	14
2.1.2.3. <i>Separaciones electroforéticas.....</i>	14
2.1.2.4. <i>Detección inmunológica.....</i>	14

2.2 ROL FISIOLÓGICO DE LAS PEPTIDASAS VEGETALES.....	15
2.2.1. <i>Adquisición de nutrientes.....</i>	15
2.2.2. <i>Defensa contra patógenos y predadores.....</i>	16
2.2.3. <i>Movilización de reservas.....</i>	16
2.2.4. <i>Senescencia.....</i>	17
2.2.5. <i>Interacción polen-pistilo.....</i>	18
3.- PEPTIDASAS ASPÁRTICAS EN PLANTAS.....	19
3.1. INTRODUCCIÓN.....	19
3.2. ESTRUCTURA PRIMARIA Y TRIDIMENSIONAL.....	22
3.3.ROL FISIOLÓGICO	24
3.4. GENES Y EVOLUCIÓN.....	25
3.4.1. <i>Estructura de los genes AP</i>	25
3.4.2. <i>Posibles procesos evolutivos de los genes AP</i>	27
4.- CULTIVO IN VITRO.....	28
4.1 CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES: GENERALIDADES.....	28
4.1.1. <i>Medios de cultivo.....</i>	28
4.1.2. <i>Reguladores del crecimiento vegetal.....</i>	31
4.1.2.1. <i>Auxinas.....</i>	32
4.1.2.2. <i>Citocininas.....</i>	32
4.1.2.3. <i>Giberelinas.....</i>	34
4.1.2.4. <i>Acido Abscísico.....</i>	34
4.1.2.5. <i>Etileno.....</i>	35
4.1.2.6. <i>Poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y brasinoesteroides.....</i>	35
4.1.2.7. <i>Mecanismo de acción de los reguladores de crecimiento vegetal.....</i>	36
4.1.3. <i>Condiciones ambientales de cultivo</i>	37
4.2. TIPOS DE CULTIVOS.....	38
4.2.1. <i>Cultivos diferenciados.....</i>	38
4.2.1.1. <i>Embriogénesis somática.....</i>	38
4.2.1.2. <i>Organogénesis.....</i>	39
4.3. CULTIVOS INDIFERENCIADOS.....	39
4.3.1. <i>Tipos celulares presentes en los cultivos in vitro indiferenciados.....</i>	40
4.3.2. <i>Crecimiento de callos y suspensiones celulares.....</i>	40
4.3.3. <i>Heterogeneidad y variación somaclonal.....</i>	41
4.3.4. <i>Aplicaciones.....</i>	42

5.- PRODUCCIÓN DE METABOLITOS.....	43
5.1. SUSTANCIAS SINTETIZADAS POR PLANTAS Y CULTIVOS VEGETALES.....	43
5.1.1. <i>Generalidades.....</i>	43
5.1.2. <i>Producción de proteínas.....</i>	47
5.1.2.1. <i>Producción de peptidasas por cultivos in vitro de células vegetales.....</i>	47
5.1.2.2. <i>Producción de proteínas recombinantes por plantas transgénicas.....</i>	48
5.2. ESTRATEGIAS PARA MANIPULAR LA CAPACIDAD BIOSINTÉTICA DE LOS CULTIVOS VEGETALES.....	52
5.2.1. <i>Selección de líneas celulares productoras de enzimas y metabolitos.....</i>	52
5.2.2. <i>Optimización de las condiciones de cultivo.....</i>	53
5.2.3. <i>Balance de los reguladores de crecimiento</i>	55
5.2.4. <i>Elicitación.....</i>	55
5.2.5. <i>Adición de precursores.....</i>	56
5.2.6. <i>Biotransformaciones.....</i>	56
5.2.7. <i>Manipulación genética: ingeniería metabólica.....</i>	57
6.- CYNARA SPP.	58
6.1. INTRODUCCIÓN.....	58
6.2. CYNARA SCOLYMUS L.....	58
6.2.1. <i>Características botánicas y sistemática varietal.....</i>	59
6.2.2. <i>Aspectos económicos.....</i>	60
6.3. CULTIVO IN VITRO DE CYNARA SPP.	60
6.3.1. <i>Micropropagación.....</i>	60
6.3.2. <i>Callos y suspensiones.....</i>	61
6.4. PEPTIDASAS DE CYNARA SPP.	61
6.4.1. <i>Peptidasas de Cynara cardunculus L.</i>	61
6.4.1.1. <i>Cynarasas o Ciprosinas.....</i>	62
6.4.1.2. <i>Cardosinas.....</i>	65
6.4.2. <i>Localización celular e hipótesis sobre el rol fisiológico.....</i>	67
6.4.3. <i>Genes.....</i>	68
6.5. PRODUCCIÓN DE PEPTIDASAS POR CULTIVO IN VITRO DE CYNARA CARDUNCULUS L.....	69
7.- OBJETIVOS.....	70
8.- MATERIALES Y METODOS.....	71

8.1. MATERIAL VEGETAL.....	71
8.1.1. <i>Cynara scolymus</i>	71
8.1.2. <i>Cultivares estudiados</i>	71
8.1.3. <i>Desinfección del material vegetal</i>	73
8.2. CULTIVOS <i>IN VITRO</i> INDIFERENCIADOS: CALLOS.....	73
8.2.1. <i>Cultivar Francés Precoz</i>	73
8.2.1.1. <i>Establecimiento</i>	73
8.2.1.2. <i>Efecto de ácido naftalen acético (ANA) y de benciladenina (BA)</i>	74
8.2.2. <i>Cultivar Green Globe</i>	74
8.2.2.1. <i>Establecimiento</i>	74
8.2.2.2. <i>Efecto de ácido naftalen acético (ANA) y de benciladenina (BA)</i>	75
8.2.2.3. <i>Efecto del ácido giberélico (GA₃) y del ácido abscísico (ABA)</i>	75
8.2.3. <i>Análisis estadístico</i>	76
8.3. CULTIVOS <i>IN VITRO</i> INDIFERENCIADOS: SUSPENSIONES.....	76
8.3.1. <i>Iniciación</i>	76
8.3.2. <i>Crecimiento y producción de los cultivos en suspensión</i>	77
8.3.3. <i>Análisis estadístico</i>	77
8.4. EXTRACTIVOS VEGETALES.....	77
8.4.1. <i>Obtención de preparaciones crudas</i>	77
8.4.2. <i>Obtención de polvos acetónicos</i>	78
8.5. PESOS FRESCO Y PESO SECO.....	78
8.6 ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA LECHE.....	78
8.6.1. <i>Actividad coagulante intracelular</i>	79
8.6.1.1. <i>Prueba en placa</i>	79
8.6.1.2. <i>Pruebas en tubo</i>	79
8.6.2. <i>Actividad coagulante exocelular</i>	80
8.7. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.....	80
8.7.1. <i>Caseína</i>	80
8.7.2. <i>Hemoglobina</i>	81
8.7.3. <i>Azocaseína</i>	81
8.8. PROTEÍNAS TOTALES.....	81
8.9. ESTABILIDAD TÉRMICA.....	82
8.10. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.....	82
8.11. EFECTO DE ACTIVADORES E INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.....	82

8.12. PURIFICACIÓN DE LAS PREPARACIONES CRUDAS.....	83
8.12.1. <i>Extracción con acetona.....</i>	83
8.12.2. <i>Precipitación fraccionada con sulfato de amonio.....</i>	83
8.12.3. <i>Adsorción con carbón activado.....</i>	84
8.12.3.1. <i>Caracterización espectrofotométrica UV y visible.....</i>	84
8.12.4. <i>Cromatografía de intercambio iónico.....</i>	84
8.12.4.1. <i>Extracto crudo de flor.....</i>	85
8.12.4.2. <i>Extracto de flor precipitado con sulfato de amonio.....</i>	85
8.12.4.3. <i>Extracto de flor adsorbido con carbón activado.....</i>	85
8.12.5. <i>Cromatografía de exclusión molecular.....</i>	85
8.12.6. <i>Cromatografía de afinidad.....</i>	86
8.13. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE PUREZA DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.....	86
8.13.1. <i>Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida.....</i>	86
8.13.2. <i>Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes.....</i>	86
8.13.3. <i>Isoelectroenfoque.....</i>	87
8.13.4. <i>Actividad enzimática en geles.....</i>	87
8.13.4.1. <i>Zimograma con geletina incluida.....</i>	88
8.13.4.2. <i>Zimograma con gelatina overlay.....</i>	88
8.13.4.3. <i>Zimograma con hemoglobina.....</i>	88
8.14. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA	89
8.14.1. <i>Plan de inmunización.....</i>	89
8.14.2. <i>Producción y título de anticuerpos.....</i>	89
8.14.2.1. <i>Inmunolectroforesis.....</i>	89
8.14.2.2. <i>ELISA indirecto.....</i>	90
8.14.3. <i>Electrotransferencia.....</i>	90
8.14.4. <i>Western blotting.....</i>	91
8.15. SECUENCIA AMINO TERMINAL	91
8.16. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	92
8.17. ELABORACIÓN Y ANÁLISIS DE QUESOS	93
8.17.1. <i>Elaboración de quesos con leche de vaca.....</i>	93
8.17.1.1. <i>Quesos de pasta blanda.....</i>	94
8.17.1.2. <i>Quesos de pasta semidura.....</i>	94
8.17.2. <i>Elaboración de quesos con leche de cabra.....</i>	94
8.17.3. <i>Análisis fisicoquímicos.....</i>	98

8.17.4. Electroforesis de quesos.....	98
8.17.4.1. Preparación de las muestras.....	98
8.17.4.2. Desarrollo de la electroforesis.....	99
8.17.4.3. Análisis de los resultados.....	99
8.17.5. Análisis sensorial.....	99
9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	100
9.1. EXPRESIÓN DE PEPTIDASAS EN EXTRACTOS DE DIFERENTES ÓRGANOS DE LA PLANTA DE ALCAUCIL.....	100
9.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS PREPARACIONES CRUDAS DE FLORES MADURAS.....	102
9.2.1. Estabilidad térmica.....	103
9.2.2. Efecto del pH sobre la actividad peptidásica.....	103
9.2.3. Efecto de activadores e inhibidores.....	104
9.2.4. expresión de la actividad peptidásica frente a diferentes sustratos.....	104
9.2.5. Isoelectroenfoque y zimograma.....	106
9.3. PURIFICACIÓN DE LAS PEPTIDASAS DE FLORES DE ALCAUCIL.....	107
9.3.1. Precipitación con acetona.....	107
9.3.2. Primera estrategia de purificación.....	108
9.3.2.1. Extracto crudo en buffer.....	108
9.3.2.2. Cromatografía de intercambio iónico.....	108
9.3.2.3. Electroforesis, isoelectroenfoque y zimograma.....	110
9.3.3. Segunda estrategia de purificación.....	112
9.3.3.1. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio.....	112
9.3.3.2. Cromatografía de intercambio iónico.....	114
9.3.3.3. Análisis de pureza: electroforesis.....	117
9.3.4. Tercera estrategia de purificación.....	119
9.3.4.1. Adsorción con carbón activado.....	119
9.3.4.1.1. Caracterización espectrofotométrica UV y visible.....	120
9.3.4.2. Cromatografía de intercambio iónico.....	121
9.3.4.2.1. Electroforesis, isoelectroenfoque y zimograma.....	122
9.3.4.3. Cromatografía de exclusión molecular.....	124
9.3.4.4. Cromatografía de afinidad.....	124
9.3.4.4.1. Electroforesis e inmunoblotting.....	126
9.4. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA.....	130
9.4.1. Obtención y titulación de anticuerpos anti-peptidasa de alcaucil.....	130

9.4.1.1. Inmunoelectroforesis.....	130
9.4.1.2. ELISA.....	131
9.4.1.3. Western blotting.....	131
9.5. SECUENCIA AMINO TERMINAL.....	132
9.6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF.....	135
9.7. CULTIVOS IN VITRO INDIFERENCIADOS: CALLOS.....	136
9.7.1. Cultivos de callos de <i>C. scolyms L. cv. Francés Precoz</i>	136
9.7.1.1. Efecto de ANA y BA.....	136
9.7.1.1.1. Crecimiento.....	136
9.7.1.1.2. Producción de peptidasas.....	137
9.7.2. Cultivos de callos de <i>C. scolyms L. cv. Green Globe</i>	140
9.7.2.1. Efecto de ANA y BA.....	140
9.7.2.1.1. Crecimiento.....	140
9.7.2.1.2. Producción de peptidasas.....	144
9.7.2.2. Efecto de GA_3 y ABA.....	146
9.7.2.2.1. Crecimiento.....	147
9.7.2.2.2. Producción de peptidasas.....	147
9.7.2.3. Análisis electroforético, zimogramas e inmunoblotting.....	149
9.8. SUSPENSIONES CELULARES.....	152
9.8.1. Crecimiento.....	152
9.8.2. Producción de peptidasas.....	153
9.8.3. Electroforesis, zimogramas e inmunoblotting.....	155
9.9 ELABORACIÓN Y ANÁLISIS DE QUESOS.....	158
9.9.1. Quesos de pasta blanda.....	158
9.9.2. Quesos de pasta semidura (leche de vaca).....	159
9.9.2.1. pH y humedad.....	159
9.9.2.2. Evolución del nitrógeno total y soluble.....	161
9.9.2.3. Hidrólisis de α_s - y β -caseínas.....	163
9.9.3. Quesos de pasta semidura (leche de cabra).....	167
10.- CONCLUSIONES.....	168
11.- BIBLIOGRAFIA.....	174
12.- ANEXO.....	196

ABREVIATURAS

°Bé	grados Beaumé (g% NaCl)
°D	grados Dornic (acidez en % de ácido láctico)
2,4-D	ácido 2,4-dicloro fenoxiacético
2-iP	N-isopentenil adenina
3,4-DCI	3,4-dicloro-isocumarina
ABA	ácido abscísico
ABPs	proteínas ligantes de auxinas
AIA	ácido indol-3-acético
AIB	ácido indol-3-butírico
ANA	ácido α -naftalenacético
AP	peptidasa aspártica
APs	peptidasas aspárticas
B5	medio de cultivo de Gamborg
BA	benciladenina
BC	quimosina bovina
BTOA	ácido benzotiazol-2-oxiacético
CA	cuajo animal
CAPS	ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico
CV	cuajo vegetal
cv	cultivar
DAN	diazoacetil-DL-norleucina metil éster
DFP	di-iso-propilfluorofosfato
DTT	ditiotreitól
E-64	L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano
EC	Enzyme Commission del NC-IUBMB
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGTA	ácido etilenglicol bis(β -aminoetil eter)-tetracético
EPNP	1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxi)-propano
GA ₃	ácido giberélico
GAs	giberelinas
HCD	catepsina D humana
HvAP	aspartil peptidasa de cebada
K	cinetina o 6-furfuril aminopurina
kDa	kilo Dalton
MS	medio de cultivo de Murashige & Skoog (1962)
NC-IUBMB	Nomenclature Committee, International Union of Biochemistry and Molecular Biology
NS	nitrógeno soluble
NT	nitrógeno total
OsAP	peptidasa aspártica de arroz
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	buffer Na ₂ HPO ₄ 10 mM, KH ₂ PO ₄ 1,8 mM, ClNa 137 mM, ClK 2,7 mM, pH 7-7,4
pCPA	ácido p-cloro fenoxiacético
PEPA	aspergil pepsina A
pl	punto isoeléctrico
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluoruro
PSI	inserto específico de plantas
PVP	polivinilpirrolidona
RNAP	peptidasa aspártica de <i>Rhizopus niveus</i>
RR	renina de rata
SDS	dodecil sulfato de sodio
SH	medio de cultivo de Schenk & Heilldebrank (1972)
TCA	ácido tricloroacético
UCL	unidad coagulante de la leche
YPA	peptidasa aspártica de levadura
Zea	Zeatina

1.- PEPTIDASAS. INTRODUCCIÓN

1.1. DIVERSIDAD DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

La proteólisis juega un rol importante en muchos procesos biológicos tales como la digestión, el recambio de proteínas y la defensa de patógenos (Runeberg-Roos *et al.*, 1994). En los tejidos vegetales, la mayor parte de la investigación se ha centrado en el rol de las peptidasas en la movilización de las reservas proteicas (Glathe *et al.*, 1998), en la activación de proenzimas (Faro *et al.*, 1998) y en la degradación de proteínas defectuosas (Vallon & Kull, 1994).

1.1.1. Clasificación y mecanismos

Las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos son designadas como proteasas, proteinasas, peptidasas o enzimas proteolíticas. La *Enzyme Commission* (EC) del *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB, 1992) recomienda el término general **peptidasas** para todas las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos. Esta recomendación es adoptada por Barret *et al.* (1998) en un tratado actual sobre el tema.

La EC (NC-IUBMB, 1992) divide las peptidasas en exo- y endopeptidasas. Las exopeptidasas pueden, a su vez, ser amino- o carboxipeptidasas. Las endopeptidasas son clasificadas por dicha comisión en base al mecanismo catalítico en serínicas, cisteínicas, aspárticas y metaloendopeptidasas.

Barrett *et al.* (1998) utilizan una clasificación diferente de la EC, pues consideran que las peptidasas son listadas allí en forma arbitraria. Estos autores agrupan las peptidasas en familias y clanes, sobre la base de su estructura primaria y terciaria. Una **familia** reúne las peptidasas que muestran una relación estadísticamente significativa entre las secuencias de aminoácidos de la parte de la molécula responsable de la actividad proteolítica. Un **clan** es un grupo de familias cuyos miembros han evolucionado a partir de la misma proteína ancestral pero que han divergido lo suficiente como para que sus estructuras primarias no sean comparables.

Además Barrett *et al.* (1998) agrupan la peptidasas en tipos catalíticos de acuerdo a la naturaleza de los grupos responsables de la catálisis. En ese sentido reconocen cinco clases: serínicas, treonínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas. Cada familia de peptidasas es nombrada con una letra que denota el tipo catalítico (S, T, C, A y M) seguida de un número arbitrario; las peptidasas cuyo mecanismo catalítico se desconoce se agrupan en la familia U.

1.1.1.1. Peptidasas serínicas (EC 3.4.21) y treonínicas

Las peptidasas en las cuales el mecanismo catalítico depende del hidroxilo de un residuo de serina que actúa como nucleófilo sobre el enlace peptídico son llamadas peptidasas serínicas. Barrett *et al.* (1998) distinguen siete clanes de peptidasas serínicas al comparar las estructuras terciarias y el orden de los residuos catalíticos en las secuencias.

Pertenecen a este grupo las familias de la tripsina y de la subtilisina. Las enzimas que integran la familia de la tripsina son todas endopeptidasas y están presentes tanto en microorganismos procarióticos como eucarióticos, así como en plantas, invertebrados, vertebrados y en virus a ARN (Caffini *et al.*, 1988; Barrett *et al.*, 1998).

La actividad de las peptidasas serínicas suele ser máxima a valores de pH alcalinos, no requiriendo en general activadores, aunque los iones calcio activan algunas proenzimas y podrían estabilizar determinadas enzimas (López, 1995).

Por razones prácticas, las poco conocidas familias de peptidasas dependientes de treonina son incluidas por Barrett *et al.* (1998) dentro del séptimo clan (TA) de las serín-peptidasas, que son todas endopeptidasas en las que el nucleófilo puede ser serina, treonina o cisteína y que incluye enzimas en las que la única actividad es activarse así mismas.

1.1.1.2. Peptidasas cisteínicas (EC 3.4.22)

Las peptidasas cisteínicas presentan gran analogía en el mecanismo catalítico con las serínicas, en razón de que en ambos grupos la enzima y el sustrato forman un complejo covalente debido a que el nucleófilo es parte de un aminoácido. El dador de protones en todas las peptidasas cisteínicas identificadas es un residuo de histidina (al igual que en la mayoría de las peptidasas serínicas) y el nucleófilo es el grupo sulfidrilo de un residuo de cisteína (Barrett *et al.*, 1998).

Son peptidasas cisteínicas la papaína, la quimopapaína, la bromelina, la cruzipapaína, las caspasas, las catepsinas lisosomales de mamíferos, las calpaínas citosólicas y varias endopeptidasas virales.

Este tipo de enzimas manifiestan su actividad a pH variable según el tipo de enzima y de sustrato. Así, las ubicadas en los lisosomas actúan generalmente a pH ácido, en tanto que la papaína tiene actividad en un amplio rango de pH y las calpaínas son activas a pH superiores a 7,5 (López, 1995).

Dado que el mecanismo catalítico de estas enzimas utiliza a la cisteína como donador de protones, se pueden activar con tioles de bajo peso molecular como tioglicolato, ditiotreitól, 2-mercaptoetanol o cisteína (Storey & Wagner, 1986).

1.1.1.3. Peptidasas aspárticas (EC 3.4.23)

Las peptidasas aspárticas (APs) están ampliamente distribuidas, encontrándose en vertebrados, hongos, plantas, protozoos y retrovirus. Son todas endopeptidasas y se caracterizan por presentar un pH óptimo en el rango ácido y por ser específicamente inhibidas por pepstatina A.

Todos los miembros de la familia A1 de la pepsina han sido hallados en eucariotas. Esta familia incluye a enzimas del tracto digestivo animal, como la pepsina, gastricsina y quimosina, enzimas lisosomales como la catepsina D y E y enzimas involucradas en procesos postraduccionales, como la renina producida en el riñón, que procesa angiotensinógeno en el plasma (Caffini *et al.*, 1988). Las aspartil-peptidasas fúngicas homólogas de la pepsina presentan diversas estructuras y algunas de ellas como la AP de *Rhizopus chinensis* (rizopuspepsina) intervienen en el proceso de esporulación. Las plasmepsinas I y II aisladas del protozoo *Plasmodium falciparum* también son APs homólogas de la pepsina (Barrett *et al.*, 1998) que participan en la degradación de la hemoglobina y cuya inhibición es el blanco de potenciales drogas antimaláricas (Bernstein & James, 1999).

La mayoría de las APs de mamíferos y hongos son enzimas de cadena simple con un peso molecular de aproximadamente 35 kDa. Son sintetizadas como zimógenos inactivos que contienen un segmento N-terminal de aproximadamente 45 aminoácidos, que es cortado y separado en la activación (Davies, 1990).

En plantas se han aislado peptidasas aspárticas en monocotiledóneas (Doi *et al.*, 1980; Belozersky *et al.*, 1989; Sarkkinen *et al.*, 1992), dicotiledóneas (Polanowski *et al.*, 1985; Heimgartner *et al.*, 1990; Rodrigo *et al.*, 1991; Veríssimo *et al.*, 1996) y en gimnospermas (Salmia *et al.*, 1978; Bourgeois & Malek, 1991). Ha sido determinada la especificidad hidrolítica de algunas de estas peptidasas aspárticas (Faro *et al.*, 1992; Kervinen *et al.*, 1993), pero su función biológica es poco conocida.

1.1.1.3.1. Mecanismo de acción

El mecanismo catalítico involucra residuos de ácido aspártico en el sitio activo de la cadena peptídica, unidos a una molécula de agua que es la que actúa como nucleófilo (Barrett *et al.*, 1998). No existen grupos funcionales de estas enzimas que provoquen un ataque nucleofílico sobre el carbonilo de la unión peptídica a escindir y por lo tanto no hay intermediario covalente entre la enzima y el sustrato (Hofmann *et al.*, 1984).

En general, las peptidasas aspárticas actúan mejor sobre uniones peptídicas de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas (Leu-Tyr, Phe-Phe, Phe-Tyr, etc.) pero la afinidad por el sustrato varía grandemente: la pepsina degrada la mayor parte de las

proteínas hasta pequeños péptidos, pero las enzimas utilizadas en la fabricación de quesos coagulan la leche por medio de la escisión selectiva de la unión peptídica Phe105-Met106 de la κ -caseína (Asakura *et al.*, 1997).

1.1.1.3.2. Estructura tridimensional

Los estudios cristalográficos han revelado que las enzimas de la familia de la pepsina son moléculas bilobuladas con el sitio activo localizado entre los dos lóbulos y que cada lóbulo contribuye con un residuo de ácido aspártico. Los lóbulos son homólogos. La secuencia de las dos regiones catalíticas de la mayoría de las APs es característica; en el dominio N-terminal se presenta el motivo: aminoácido hidrofóbico (generalmente Phe)-Asp32-Thr-Gly-Ser y en el dominio C-terminal: (aminoácido hidrofóbico)-Asp215-Thr-Gly-Ser/Thr, siguiendo la numeración de pepsina (Davies, 1990). Si bien en muchas APs los residuos Asp catalíticos están contenidos en la secuencia Asp-Thr-Gly de ambos lóbulos, las APs de plantas contienen Asp-Ser-Gly en uno de los sitios (Mutlu & Gal, 1999).

Por otro lado, las moléculas de la familia de la retropepsina (clan AA) presentan sólo un lóbulo y un residuo catalítico aspártico, por lo que su actividad requiere la formación de un homodímero no covalente. Dentro de esta familia se incluye a la enzima procesadora de poliproteínas del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), del virus del sarcoma de Rous, de la mieloblastosis aviar y del mosaico del coliflor (Rawlings & Barrett, 1995; Barrett *et al.*, 1998).

1.1.1.4. Metalopeptidasas (EC 3.4.24)

Las familias de las metalopeptidasas se pueden reunir en dos grupos: las peptidasas que sólo requieren iones cinc para la catálisis y las que necesitan dos iones metálicos que actúen cocatalíticamente, como es el caso de las peptidasas en las que el cobalto y el manganeso son esenciales para su actividad (Barrett *et al.*, 1998).

El ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado, al igual que en las peptidasas aspárticas, por una molécula de agua (Barrett *et al.*, 1998).

La más estudiada de las metalopeptidasas es la termolisina del *Bacillus thermoproteolyticus*, cuyo sitio activo contiene un átomo de cinc unido a cadenas laterales de histidina y de ácidos glutámico (Caffini *et al.*, 1988).

1.1.1.5. Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido

En este grupo se incluyen todas aquellas peptidasas a las que, con la información disponible al momento, no es posible ubicarlas en ninguna de las cinco categorías anteriores. Incluyen di-, endo-, carboxi- y omegapeptidasas que participan del

metabolismo de la pared bacteriana, que hidrolizan diversas proteínas de bacterias y virus o que están involucradas en la esporulación de algunas especies de *Bacillus* (Barrett *et al.*, 1998).

1.2. INHIBIDORES DE PEPTIDASAS

El efecto de los inhibidores permite tener información acerca del tipo catalítico de una peptidasa, aunque pocos de los inhibidores disponibles son reactivos perfectos de diagnóstico, dado que pueden ocurrir falsos positivos y falsos negativos. Cuando se detecta una inhibición parcial, el efecto del tiempo de exposición de la enzima al inhibidor sobre el grado de inhibición, puede ser informativo (Barrett, 1994).

1.2.1. Peptidasas serínicas

La 3,4-dicloro-isocumarina (3,4-DCI) es el reactivo de elección para reconocer las peptidasas serínicas, pues reacciona rápida e irreversiblemente con la mayoría de ellas. Otros reactivos que son útiles para la identificación de este tipo de peptidasas son: el DFP (diisopropilfluorofosfato) y el PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro). Ambos pueden también inhibir peptidasas cisteínicas, pero su efecto es reversible por el agregado de compuestos tiólicos. La desventaja del DFP es su neurotoxicidad (inhibe la acetil colinesterasa), la que se ve incrementada por su volatibilidad (Barrett, 1994). Otras herramientas útiles para identificar peptidasas serínicas son los inhibidores naturales reversibles: aprotinina y el inhibidor de tripsina de soja (Storey & Wagner, 1986).

1.2.2. Peptidasas cisteínicas

Las peptidasas cisteínicas del grupo de la papaína y la calpaína son susceptibles a la rápida, específica e irreversible inactivación por parte del compuesto E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano). Una característica importante del E-64 y otros inhibidores epóxidos es que no reaccionan con tioles de bajo peso molecular, como cisteína y ditiotreitól.

Otras peptidasas cisteínicas (clostripaina, estreptopaína) son pobremente inhibidas por el E-64 y se deben usar reactivos generales para grupos tioles para reconocerlas (iodoacetato, iodoacetamida); estos últimos presentan el inconveniente de reaccionar también con los activadores de las peptidasas cisteínicas (Barrett, 1994).

Algunos de los inhibidores usados para peptidasas cisteínicas no son específicos. Así, los aldehidos y clorometanos peptidílicos como quimostatina y leupeptina pueden reaccionar con peptidasas cisteínicas y serínicas (Storey & Wagner, 1986).

1.2.3. Peptidasas aspárticas

Relativamente pocos inhibidores actúan sobre las peptidasas aspárticas. El complejo de la diazoacetil-DL-norleucina metil éster (DAN) con iones cobre y el EPNP (1,2-epoxy-3-(*p*-nitrofenoxi) inactivan la mayoría de ellas. El más efectivo de los inhibidores de estas peptidasas es la pepstatina A, un isovaleril-pentapéptido (*Figura 1*) aislado de cultivos de varias especies de *Streptomyces*, que en una concentración final de 1-5 μM inhibe reversiblemente la mayoría de las APs y no afecta otro tipo de peptidasas (Barrett, 1994).

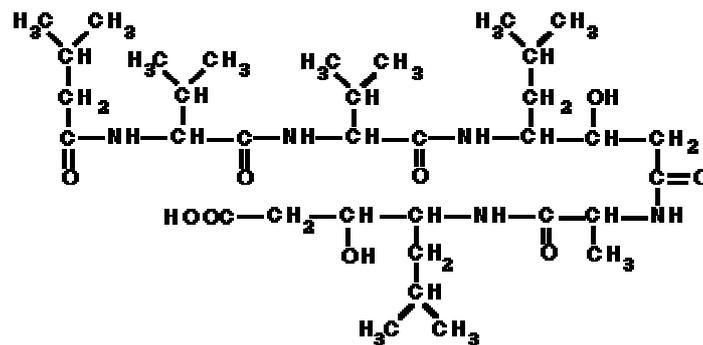


Figura 1.- Estructura de la pepstatina A: Isovaleril-Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA. (AHMHA = ácido heptanoico-4-amino-3-hidroxi-6-metilo)

1.2.4. Metalopeptidasas

La mayoría de los inhibidores de las metalopeptidasas actúan como quelantes del átomo de cinc catalítico. La 1,10-fenantrolina es el más usado de estos inhibidores, mientras que el quelante inespecífico EDTA no provee certeza de que la enzima pertenezca a este grupo pues muchas peptidasas de otros tipos son activadas por cationes como el Ca^{+2} (Barrett, 1994).

1.3. PRINCIPALES APLICACIONES DE LAS PEPTIDASAS

1.3.1. Elaboración de quesos

1.3.1.1. Mecanismo de la coagulación

Dalgleish (1992) considera que la coagulación de la leche por el tratamiento con el cuajo ocurre en dos etapas. La primera es la fase enzimática, durante la cual se produce el ataque de la κ -caseína por enzimas proteolíticas contenidas en el cuajo y la segunda es la fase de coagulación de las micelas que han sido desestabilizadas por el ataque enzimático (*Figura 2*).

Las micelas de caseína bovina son partículas esféricas compuestas de varios miles de moléculas individuales de los cuatro tipos de caseína (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) y fosfato de calcio en estado insoluble. Las diferentes caseínas no están homogéneamente distribuidas en la partícula; en particular, la κ -caseína está localizada principalmente en la superficie de la micela. La molécula de κ -caseína consta de dos regiones: la hidrofóbica *para*- κ -caseína (residuos 1-105) y el caseín-macropéptido hidrofílico (residuos 106-169). En su posición natural sobre la superficie de la micela, la κ -caseína se une al resto de la micela por la parte hidrofóbica, quedando el caseín-macropéptido en la superficie interactuando con el solvente.

Las enzimas coagulantes de la leche cortan la κ -caseína en la unión entre la *para*- κ -caseína y el caseín-macropéptido, es decir entre el residuo Phe105 y Met106. Cuando esto ocurre, el macropéptido difunde dentro del suero, disminuye su actividad estabilizante y cuando ha sido hidrolizada una cantidad suficiente de κ -caseína las micelas coagulan, debido a su carácter hidrofóbico.

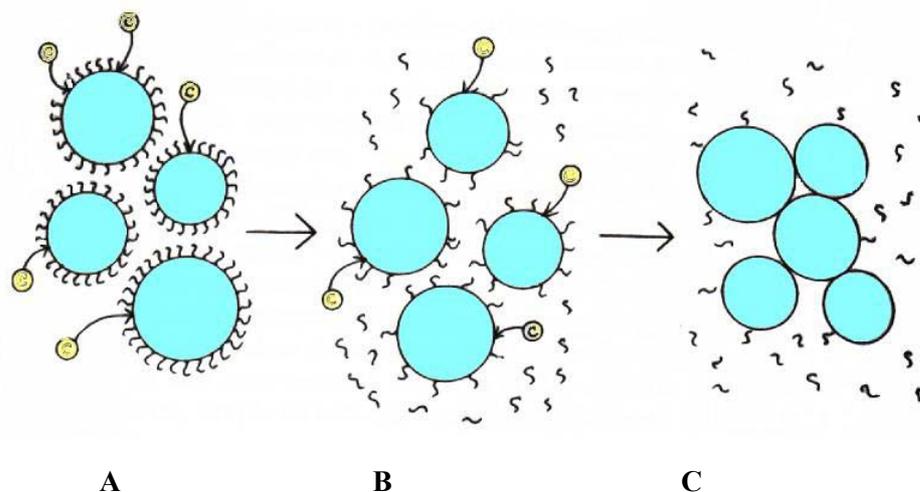


Figura 2.- Esquema del ataque de las enzimas coagulantes (esferas pequeñas) sobre las micelas de caseína (esferas grandes). A) micelas con las cadenas de κ -caseína intacta; B) comienzo de la hidrólisis de la κ -caseína por las enzimas proteolíticas; C) agregación de las micelas por la hidrólisis de la κ -caseína.

Las variaciones en las condiciones de coagulación pueden afectar diferencialmente las dos etapas de la coagulación de la leche. Así, Eck (1990) estableció que el fenómeno de la coagulación es fuertemente dependiente de la temperatura, con mayor velocidad a 40-42°C. Esta influencia de la temperatura es consecuencia de la conjunción de dos efectos, uno sobre la reacción enzimática y el otro sobre la fase de coagulación.

Se observan también diferencias en el tiempo de coagulación con el valor del pH y la concentración de iones calcio. El tiempo de coagulación es más corto y el gel más firme en la medida que el pH desciende por debajo del pH normal de la leche. Por el contrario, a pH superior a 7 no se produce la coagulación (Eck, 1990).

1.3.1.2. *Enzimas proteolíticas*

La renina o cuajo, conjunto de endopeptidasas que integran los fermentos gástricos de los mamíferos lactantes, ha sido tradicionalmente usada para producir la coagulación de la leche. Contiene quimosina que hidroliza específicamente el enlace Phe105-Met106 de la κ -caseína bovina. Aunque existen diferencias entre las quimosinas de diferentes especies, estas enzimas se caracterizan como peptidasas gástricas neonatales con débil actividad proteolítica y alta actividad coagulante de la leche (Foltmann & Szecsi, 1998). Debido a la escasez y al alto costo de las peptidasas gástricas fetales o neonatales de mamíferos se ha intensificado en los últimos años la búsqueda de nuevos coagulantes de la leche. Además de las razones económicas, en algunos países inciden principios religiosos y culturales. Mas aún, debido a su importancia comercial, la proquimosina de ternero ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y diferentes hongos filamentosos (Foltmann, 1993; Foltman & Szecsi, 1998).

Cualquier sustituto de la quimosina que se elija debe no sólo coagular la leche, sino también tener baja actividad proteolítica y producir quesos de características reológicas y de sabor aceptables.

Si bien han sido investigadas muchas enzimas, sólo unas pocas están siendo utilizadas en la elaboración de quesos, debido a que las diferencias en la estabilidad y en el pH óptimo de las peptidasas utilizadas pueden hacer necesario modificar el proceso de elaboración. Se utilizan principalmente quimosina bovina, pepsina de cerdo, mezcla de quimosina y pepsina bovinas (1:1) y algunas peptidasas de hongos (Dalglish, 1992).

Dentro de las enzimas fúngicas, se han ensayado particularmente las de *Mucor bacilliformis* (Arecas *et al.*, 1992), *M. pusillus* (Arima *et al.*, 1970), *Penicillium roqueforti* (Paquet & Gripon, 1980), *P. caseicolum* (Lenoir *et al.*, 1979), *P. camemberti* (Chrzanowska *et al.*, 1995) y varios *Basidiomycetes* (Kobayashi *et al.*, 1994), aunque su uso en la fabricación de quesos no se ha generalizado.

Varias peptidasas de plantas son capaces de coagular la leche, aunque la mayoría son inapropiadas para la producción de quesos debido a su alta actividad proteolítica, que produce la degradación del coágulo. Así, Gupta & Eskin (1977) estudiaron la actividad coagulante de la leche de extractos parcialmente purificados de *Benincasa cerifera*. A su vez, Yamaguchi *et al.* (1982) detectaron alta actividad proteolítica en

jenjibre, espárrago y en frutos tales como higo, kiwi y ananá. También se han estudiado en este sentido las peptidasas presentes en hojas de *Calotropis procera* (Aword & Nakai, 1986; Aword & Muller, 1987), en semillas de *Oryza sativa* (Asakura *et al.*, 1997), en tallos de *Dieffenbachia maculata* (Padmanabhan *et al.*, 1993), en semillas, hojas y flores de *Onopordum turcicum* (Tamer, 1993) y en flores de *Centaurea calcitrapa* (Tavaria *et al.*, 1997) y de *Cynara cardunculus* L. (Heimgartner *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1992; Veríssimo *et al.*, 1995).

1.3.2. Elaboración de cerveza

Las peptidasas se utilizan en la industria de la cerveza con la finalidad de proporcionarle buena estabilidad coloidal a bajas temperaturas, es decir, impedir que como consecuencia del enfriamiento se manifieste turbiedad o se sedimenten componentes que se mantienen solubles a temperatura ambiente, como los complejos tanino-proteína. Se usan enzimas proteolíticas como papaína, ficina, bromelina o pepsina para digerir esos complejos. La hidrólisis requiere ser controlada, ya que la cerveza debe mantener una adecuada proporción de proteína coloidal para tener “cuerpo” y producir espuma abundante y duradera (Sicard, 1982).

1.3.3. Tiernización de carnes

Los habitantes de algunas regiones de Centro y Sudamérica utilizan el jugo de mamón (*Carica papaya* L.) para tiernizar las carnes que consumen. Esto se debe a que las peptidasas contenidas en dicho jugo producen la hidrólisis parcial de las proteínas del tejido conectivo (colágeno y elastina) y en menor grado las de las mismas fibras musculares (Caffini *et al.*, 1988). En la industria de la carne se logra un excelente tiernizado inyectando al animal por vía endovenosa, antes de ser faenado, una solución de enzima reversiblemente inactivada; la peptidasa es reactivada por el poder reductor que adquiere el músculo luego de la muerte (Bernholdt, 1982). Con este tratamiento también se mejora la digestibilidad del producto.

Las enzimas que se utilizan en la tiernización de carnes son: papaína, bromelina, ficina, elastasa, colagenasa y varias peptidasas microbianas (Uhlig, 1998).

1.3.4. Panificación

En panificación se adicionan peptidasas fúngicas aisladas de *Aspergillus oryzae*, papaína o bromelina para mejorar la textura y elasticidad de la masa, lo que provoca un incremento sustancial del volumen, con la consiguiente reducción del tiempo de amasado y mejor calidad del producto (Sicard, 1982). Esto se debe a la acción de las peptidasas

sobre el gluten. Peptidasas de diferente origen producen patrones peptídicos distintos, por lo que se debe seleccionar la enzima adecuada para cada tipo de producto (Uhlig, 1998).

1.3.5. Proteínas modificadas para la industria alimenticia

Otro uso importante de las enzimas proteolíticas consiste en la obtención de hidrolizados proteicos para la producción de aditivos alimentarios. Un problema que suele presentarse es la formación de péptidos con sabor amargo debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, lo que se soluciona enmascarándolos con ácido glutámico o polifosfatos o evitando su formación al seleccionar cuidadosamente las peptidasas y las condiciones de reacción.

La hidrólisis parcial de ciertas proteínas permite modificar algunas de sus propiedades fisicoquímicas, aumentando la solubilidad o la capacidad emulgente. En este sentido pueden emplearse hidrolizados de proteínas de soja y de trigo en la elaboración de bebidas, sopas, salsas, mayonesas y aderezos. También se han obtenido proteínas modificadas de soja y de trigo que producen espuma abundante y estable, lo que es de particular importancia en la fabricación de “souffles”, “mousses”, merengues, helados y cremas (Caffini *et al.*, 1988; Uhlig, 1998).

1.3.6. Aditivos en polvos detergentes

Otra aplicación de las peptidasas es su incorporación a polvos detergentes, en los que están habitualmente asociados a lipasas y amilasas. Las más utilizadas son las peptidasas de origen microbiano (Caffini *et al.*, 1988).

1.3.7. Manufactura de cueros

En la manufactura de cueros se utilizan enzimas proteolíticas para realizar la depilación de la piel y el posterior “batido”, que consiste en preparar el cuero para el teñido con la remoción de restos de pelos, glándulas, células epiteliales y tejidos superficiales no separados en tratamientos previos. Se utiliza principalmente pancreatina y se han ensayado con buenos resultados papaína, bromelina y peptidasas fúngicas y bacterianas (Sicard, 1982).

1.3.8. Uso en la industria textil

Las fibras textiles son “encoladas” con una preparación de polímeros (“colas”), a los efectos de aumentar la resistencia a la tracción y abrasión. Con posterioridad al hilado se deben “desencolar” los hilos para restituir las propiedades de los mismos. Como las fibras

artificiales son habitualmente impregnadas con gelatina, se usa para el “desencolado” la peptidasa neutra de *Bacillus subtilis* o la peptidasa alcalina de *B. licheniformis* (Sicard, 1982).

1.3.9. Usos farmacológicos

Se utilizan enzimas proteolíticas en tratamientos postquirúrgicos para el desbridamiento de heridas y en clínica gastroenterológica como coadyuvantes en trastornos digestivos. La aplicación más trascendente de estas enzimas radica en sus probadas propiedades antiinflamatorias, siendo papaína, bromelina y ficina las peptidasas más usadas en tal sentido (López, 1995).

Algunos investigadores mencionaron una presunta actividad citostática de la bromelina (Batkin *et al.*, 1988a, 1988b; Maurer *et al.*, 1988), aunque este efecto no ha sido confirmado por posteriores investigaciones.

También se ha ensayado el tratamiento de hernias de discos intervertebrales con inyecciones locales de quimopapaína, que actuaría hidrolizando los proteoglicanos presentes en la afección (Walreavens *et al.*, 1993).

Las peptidasas que hidrolizan secuencias específicas de la molécula de caseína pueden resultar de interés en el aislamiento e identificación de péptidos biológicamente activos. Así se han aislado péptidos derivados de caseína que poseen actividad opioidea, inmunoestimulante, antitrombótica, antibacteriana y/o antihipertensiva, entre otras (Loukas *et al.*, 1983; Fiat *et al.*, 1993; Dziuba *et al.*, 1999)

2. PEPTIDASAS VEGETALES

2.1. ESTRATEGIAS PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS VEGETALES

2.1.1. Aislamiento de proteínas

La metodología empleada en la extracción de proteínas determina su naturaleza y estabilidad, permitiendo validar los resultados obtenidos en procedimientos posteriores. En particular, la extracción de proteínas vegetales presenta problemas inherentes a la estructura de la célula vegetal, pues comparada con los tejidos animales y las células bacterianas, tiene menor contenido de proteínas y contienen en sus vacuolas peptidasas, alcaloides y compuestos polienólicos (flavonoides, taninos) que pueden interferir en la actividad proteica. En consecuencia, la estrategia de extracción depende de las características específicas de la proteína en estudio y de su localización (Michaud & Asselin, 1995).

La primera etapa en el aislamiento de una proteína es su liberación de las células que la contienen. El método elegido depende de las características mecánicas del tejido de procedencia, así como de la localización celular de la proteína de interés. Como métodos de ruptura mecánica de las células vegetales para liberar sus proteínas se pueden mencionar: 1) trituración con arena o alúmina, 2) trituración en mezclador de alta velocidad, 3) homogeneizador a pistón, 4) prensa francesa, 5) sonicación y 6) congelación con nitrógeno líquido y macerado (Voet & Voet, 1992).

La diversidad de proteínas involucradas en procesos de crecimiento, desarrollo y defensa impide la formulación de un procedimiento de extracción universal que permita recuperar todas las proteínas de un tejido vegetal. Sin embargo, la solubilidad de las proteínas de plantas, que está relacionada con la localización intracelular, permite formular diferentes métodos de extracción. Ellos incluyen: 1) extracción con buffer acuoso, 2) extracción con detergentes, 3) precipitación directa con TCA, 4) precipitación con acetona y 5) precipitación con TCA-acetona (Michaud & Asselin, 1995).

Para prevenir la proteólisis durante la extracción se debe utilizar alguno/s de los procedimientos siguientes: 1) extraer con buffer que contenga SDS (sodio dodecil sulfato), 2) extraer con TCA frío al 10 % (p/v), 3) adicionar un cóctel de inhibidores de peptidasas al buffer de extracción, 4) trabajar a baja temperatura durante períodos cortos de tiempo, 5) usar buffers de pH por encima o por debajo del óptimo, 6) adicionar agentes protectores como dimetil sulfóxido (10 %, v/v) o glicerol (25 % v/v) o agentes reductores

como ditioneitol (1mM), L-cisteína (5 mM) o β -mercaptoetanol (1mM)) o 7) adicionar agentes quelantes como EDTA (2 mM) o EGTA (2mM) para remover cationes bivalentes que son cofactores de metalopeptidasas y de varias peptidasas serínicas (Michaud & Asselin, 1995).

Los compuestos fenólicos pueden inactivar las proteínas al formar puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno de los enlaces peptídicos y también cuando los fenoles son oxidados a quinonas pueden condensarse con los grupos -SH y -NH₂ de las proteínas. Estas interacciones químicas determinan la formación de dímeros y polímeros de proteína entrecruzadas por polifenoles, afectando la calidad del patrón proteico observado en los geles. Para evitar la acción de los compuestos fenólicos se pueden usar varias estrategias: 1) precipitar todas las proteínas triturando los tejidos en TCA frío (no permite medir actividad biológica), 2) adicionar polivinilpirrolidona (PVP) que compleja los fenoles y alcaloides, 3) en combinación con PVP, inactivar la fenoloxidasas con agentes reductores como ascorbato, β -mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), dietilditiocarbamato de sodio, metabisulfito de sodio o tiourea, 4) agregar EDTA que secuestra el cobre que es un cofactor necesario para la expresión de la polifenoloxidasas, 5) usar un buffer de extracción de bajo pH que ayuda a prevenir la formación de quinonas y favorece la unión de PVP a fenoles y 6) remover fenoles y alcaloides por gel filtración (Michaud & Asselin, 1995).

2.1.2. Purificación de proteínas

Las proteínas se purifican mediante procedimientos de fraccionamiento. En una serie de etapas independientes, se aprovechan las diversas propiedades fisicoquímicas de las proteínas que interesan para separarlas progresivamente de otras proteínas y/o de las demás sustancias.

Las características de las proteínas que se emplean en los diversos procedimientos de separación son: solubilidad, carga iónica, tamaño molecular, propiedades de absorción y capacidad de unión a otras moléculas biológicas (Voet & Voet, 1992).

2.1.2.1. Solubilidad

Los múltiples grupos ácido-base de una proteína determinan que sus propiedades de solubilidad dependan de la concentración de las sales disueltas, de la polaridad del disolvente, del pH y de la temperatura (Voet & Voet, 1992).

2.1.2.2. Separaciones cromatográficas

La fase móvil de una cromatografía consiste en una mezcla de sustancias que se van a fraccionar disueltas en un líquido, que se hace fluir a través de una columna de una matriz porosa, que constituye la fase estacionaria. Las interacciones de los solutos individuales con la fase estacionaria determinan que cada componente migre con velocidades diferentes y que la mezcla se separe en bandas de sustancias puras. Los diversos métodos cromatográficos surgen de la interacción dominante entre la fase estacionaria y las sustancias que están siendo separadas y son: cromatografía de intercambio iónico, de adsorción, de exclusión molecular, de interacción hidrofóbica o de afinidad (Voet & Voet, 1992).

2.1.2.3. Separaciones electroforéticas

La electroforesis es un método analítico de alto poder resolutivo que permite la separación de moléculas biológicas cargadas por la combinación de su migración en un campo eléctrico y el efecto de tamizado molecular a través de un gel de corrida.

Las proteínas, al ser moléculas anfotéricas polivalentes, migran en un campo eléctrico de acuerdo con su carga neta, que a su vez depende de la carga macromolecular, del tamaño y de la forma, como así también de las propiedades fisicoquímicas del medio electroforético (Makowski & Ramsby, 1997).

La incorporación del detergente SDS a la solución proteica permite separar todos los tipos de proteínas, incluyendo las insolubles en agua. El SDS se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas haciendo que se desplieguen las cadenas polipeptídicas, liberándolas de sus asociaciones con otras moléculas proteicas o lipídicas. En estas condiciones la electroforesis separa los polipéptidos en función de su tamaño, lo que proporciona información sobre su peso molecular. Además, el agregado de un agente reductor como el β -mercaptoetanol reduce los enlaces disulfuro que pudieran existir en las proteínas, de modo que se pueden visualizar todos los polipéptidos constitutivos de las moléculas poliméricas (Voet & Voet, 1992).

2.1.2.4. Detección inmunológica

La exposición de las proteínas presentes en una muestra a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio y el revelado con un anticuerpo contra el primero acoplado a una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina) o a un colorante fluorescente, permite su identificación tanto en separaciones electroforéticas (Western blotting) como en los tejidos (inmunohistoquímica).

Las ventajas de estos métodos son las siguientes: a) no se necesitan reactivos radiactivos, b) no se requieren precauciones especiales para mantener la conformación nativa de la proteína y c) regiones de la proteína que están ocultas en la conformación nativa pueden exponerse durante la electroforesis desnaturante, lo que permite usar anticuerpos anti-peptídicos (Scheidtmann *et al.*, 1997).

2.2. ROL FISIOLÓGICO DE LAS PEPTIDASAS VEGETALES

La mayor importancia de las peptidasas radica en que permiten la reutilización de los aminoácidos constituyentes de proteínas, lo que es fundamental en los procesos de desarrollo. Así, durante la germinación movilizan las reservas proteicas; durante el crecimiento y desarrollo permiten el recambio de las proteínas existentes por aquellas que la planta necesita para adaptarse a los cambios ambientales y, durante la senescencia producen los aminoácidos que serán reservados para su uso por la próxima generación.

Sin embargo, se han identificado varias peptidasas que no parecen cumplir ninguna función en el crecimiento y desarrollo o se encuentran en cantidades muy superiores a las que la planta necesita para estas funciones. A tales peptidasas se las llama proteínas secundarias, por analogía con los metabolitos secundarios (Boller, 1986).

2.2.1. Adquisición de nutrientes

Debido a que las plantas son autótrofas, los procesos digestivos no presentan en general gran importancia. Las excepciones las constituyen las plantas carnívoras y el establecimiento de relaciones parasitarias o simbióticas.

Plantas carnívoras

Las peptidasas de las plantas insectívoras son capaces de digerir las proteínas presentes en la presa capturada y por lo tanto aportar nutrientes a la planta. Las plantas carnívoras que muestran mayor secreción de enzimas digestivas son las de la familia *Nepenthaceae*, quienes presentan hojas transformadas en órganos huecos que atrapan insectos y otros invertebrados pequeños (Mutlu & Gal, 1999). Las peptidasas aisladas de *Nepenthes* tienen un pH óptimo en el rango ácido y son inhibidas por pepstatina (Tökes *et al.*, 1974). También se encuentran secreciones digestivas en especies de los géneros *Drosera*, *Dionaea*, *Drosophyllum* y *Pinguicula* (Boller, 1986).

Al igual que en el estómago de los vertebrados, las plantas insectívoras secretan HCl para mantener una alta acidez de los fluidos digestivos. Las diferentes plantas insectívoras utilizan mecanismos especiales para secretar el ácido y las peptidasas. En *Nepenthes* las glándulas secretan un fluido neutro que contiene las peptidasas pero que

a ese pH están prácticamente inactivas; frente a la captura de la presa, se secretan protones y se inicia la actividad digestiva. En *Pinguicula* las peptidasas se acumulan en las células glandulares superiores, mientras que el HCl lo hace en las células basales y se libera después de la estimulación (Boller, 1986).

Plantas parásitas

Las plantas parásitas presentan órganos diferenciados, los haustorios, que penetran en el huésped estableciendo un contacto directo con las células del xilema y/o del floema y toman sus nutrientes. La penetración y el desarrollo de los haustorios parece requerir de la acción de peptidasas (Boller, 1986).

2.2.2. Defensa contra patógenos y predadores

Al igual que muchos metabolitos secundarios, algunas peptidasas son consideradas agentes protectores contra patógenos, parásitos y herbívoros (Bell, 1981). En general, estas peptidasas están localizadas en la vacuola o en la pared celular. Al lesionarse un tejido, las hidrolasas liberadas de las vacuolas rotas constituyen la primera línea de defensa contra potenciales patógenos. La presencia de abundantes peptidasas en algunos frutos (ananá, kiwi, papaya) podría relacionarse con esta función (Boller, 1986).

En el caso de *Cynara cardunculus* L., Ramalho-Santos *et al.* (1997) postulan que a semejanza de los inhibidores de peptidasas que desencadenan una hiperproducción de peptidasas digestivas en el tracto digestivo de los insectos, la cardosina podría cumplir la función de proteger al estigma floral del ataque de herbívoros.

Recientemente Schaller & Ryan (1996) han determinado que las heridas, el metil jasmonato y la sistemina inducen la síntesis del mRNA de una AP en las hojas de tomate postulando que estas enzimas intervendrían en las respuesta de defensa de las plantas de tomate contra el ataque de herbívoros.

2.2.3. Movilización de reservas

Durante la germinación, las proteínas almacenadas en las semillas son expresadas en órganos específicos (endosperma o mesófilo del cotiledón), siendo generalmente sintetizadas como precursores que serán procesados antes de su depósito en los cuerpos proteicos. Para ello pareciera que es importante la co-localización en la misma organela de varias peptidasas (Mutlu & Gal, 1999).

Muchas peptidasas están involucradas en la movilización de las proteínas de reserva de la semilla, proveyendo los aminoácidos para el crecimiento de la planta. Entre ellas se encuentran las cisteín-peptidasas de *Vigna* y de maíz (Boller, 1986), las amino- y dipeptidasas de cebada (Mikola & Mikola, 1986) y las aspartil peptidasas de arroz (Doi *et*

al., 1980), trigo (Belozerski *et al.*, 1989), cebada (Kervinen *et al.*, 1993; Sarkkinen *et al.*, 1992), cacao (Biehl *et al.*, 1993) y colza (D'Hondt *et al.*, 1993). También Voigt *et al.* (1997) asocia las altas actividades de peptidasas aspárticas encontradas en semillas no germinadas de varias angiospermas a funciones biológicas durante la maduración.

La movilización de reservas de la aleurona de cebada se encuentra bajo control hormonal. El ácido giberélico (GA₃) derivado del embrión estimula la secreción de enzimas proteolíticas y su acción es antagonizada por el ácido abscísico (ABA). Esto se debería a que el GA₃ incrementaría la síntesis y transporte de peptidasas (cisteínicas y aspárticas) hacia las vacuolas que almacenan proteínas y/o a la disminución del pH del lumen de esta organela, lo que activaría dichas enzimas. Se comprobó que el tratamiento con GA₃ incrementa la actividad de tres peptidasas cisteínicas, mientras que no estimula significativamente a las APs (Bethke *et al.*, 1996; Swanson & Jones, 1996; Swanson *et al.*, 1998).

2.2.4. Senescencia

Es conocida la participación de peptidasas en los procesos de muerte celular de animales y plantas. La senescencia es un proceso programado dentro del desarrollo de la planta que involucra una serie de cambios enzimáticos y metabólicos que tienen lugar de forma simultánea o secuencial en los diferentes tejidos que envejecen. Se produce una movilización y exportación masiva de carbono, nitrógeno y minerales con un eficiente reciclaje de los nutrientes (Kaur-Sawhney & Galston, 1986).

En general, los estudios sobre la enzimología de los procesos degradativos en plantas adolecen de rigor técnico y han sido realizados en circunstancias experimentales muy diferentes que han llevado a resultados conflictivos. Un elemento de confusión adicional es que si bien el 95 % de las péptido-hidrolasas se encuentran en las vacuolas de las células del mesófilo, la mayor degradación de proteínas en la senescencia ocurre en el interior del cloroplasto. Actualmente, parece claro que el cloroplasto tiene sus propias peptidasas que serían codificadas en el núcleo, pues no se ha identificado en el ADN cloroplástico ninguna secuencia homóloga a las peptidasas conocidas. El control de la actividad de estas peptidasas durante la senescencia podría ocurrir bien por síntesis *de novo* de la proteína, por activación de enzimas preexistentes en forma de proenzimas o por compartimentalización, es decir co-localizando enzima y sustrato (Valpuesta *et al.*, 1993).

Ejemplos de un posible rol en la senescencia lo constituyen las APs encontradas en hojas de naranjo (García-Martínez & Moreno, 1986), de cebada (Kervinen *et al.*, 1995) y de flores de cardo (Heimgartner *et al.*, 1990, Cordeiro *et al.*, 1994a).

2.2.5. Interacción polen-pistilo

La papila estigmática es el lugar donde interactúa primero el polen con el tejido esporofítico femenino en su camino hacia el ovario. En la superficie del estigma es capturado, hidratado y germina. Todos estos procesos involucran eventos moleculares de reconocimiento, señalización y respuesta (Elleman & Dickinson, 1990, 1994).

El hecho que la cardosina A esté localizada en las vacuolas de las papilas estigmáticas de *C. cardunculus* L. llevó a Ramalho-Santos *et al.* (1997) a postular que esta enzima estaría involucrada en la interacción polen-pistilo, participando en eventos extracelulares de degradación proteica que permitan la correcta adhesión y/o germinación del polen. Además, la presencia de la triada Arg-Gly-Asp (RGD) en la secuencia de la cardosina A (característica de las proteínas celulares que unen integrina) que puede ser reconocida por una proteína de 100 kDa del polen, apoyan la hipótesis de la intervención de la cardosina A en el interacción polen-pistilo (Frazão *et al.*, 1999).

3.- PEPTIDASAS ASPÁRTICAS EN PLANTAS

3.1. INTRODUCCIÓN

En la *Tabla 1* se resumen algunas propiedades de la mayoría de las peptidasas aspárticas de plantas descritas hasta el presente.

Tabla 1.- Caracterización de peptidasas aspárticas de plantas

Especie	Localización	P.M. (kDa)	Sub-unidad	pH		Referencias
				Óptimo	Sustrato	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Semillas secas		H: 31, 28,5, 15 y 6	3,5		D'Hondt <i>et al.</i> (1993, 1997) Mutlu & Gal (1999) Mutlu <i>et al.</i> (1999)
<i>Brassica napus</i> (colza)	Semillas	28 y 35 (SDS-PAGE)	M	3,5 3,7	Albúmina Hb	D'Hondt <i>et al.</i> (1997)
<i>Brassica oleracea</i> (coliflor)	Semillas	322 Aac (cADN)	221 Aac. 285 Aac.			Fujikura & Karssen (1995)
<i>Cannabis sativa</i> (cáñamo)	Semillas	20 (ultracentrifugación)	1-4	3,4 4,3	Hb Edestina	St Angelo <i>et al.</i> (1969) St Angelo & Ory (1970)
<i>Centaurea calcitrapa</i>	Flores frescas Flores secas	50		4-5		Domingos <i>et al.</i> (1998)
<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	Semillas	40-42 (gel filtración)		3,2	Hb	Polanowski <i>et al.</i> (1985)
<i>Cucurbita ficifolia</i> (alcayota)	Semillas	30 y 11 (SDS_PAGE)	H: 2	3,6	Hb	Stachowiak <i>et al.</i> (1994)

<i>Cucurbita maxima</i> (zapallo)	Semillas	40-42 (gel filtración)		3,6	Hb	Polanowski <i>et al.</i> (1985)
<i>Cynara cardunculus</i> L. (cardo de Castilla)	Flores	46-49 (PAGE y cADN) SDS-PAGE	32,5+16,5 33,5+16,5 35,5+13,5	5,1	FTC-caseína	Heimgartner <i>et al.</i> (1990) Cordeiro <i>et al.</i> (1992; 1994a, b; 1998) White <i>et al.</i> (1999)
		64-67 (Western) SDS-PAGE	31+15 34+14	5	péptido cromóforo	Faro <i>et al.</i> (1992, 1998, 1999) Macedo <i>et al.</i> (1993) Verissimo <i>et al.</i> (1995,1996)
<i>Dieffenbachia maculata</i>	Tallos			5,5	Leche	Padmanabhan <i>et al.</i> (1993)
<i>Drosera peltata</i>	Hojas Tallos Organos trampa			2,3	Caseína	Amagase (1972)
<i>Fagopyrum esculentum</i>	Semillas	28 (gel filtración)		3,5	Albúmina	Belozersky <i>et al.</i> (1984)
<i>Hordeum vulgare</i> L. (cebada)	Semillas	48 y 40	H: 2	3,5- 3,9	Hb	Runeberg-Roos <i>et al.</i> (1991, 1994) Sarkkinen <i>et al.</i> (1992) Kervinen <i>et al.</i> (1993)
	Hojas Raíz	(cADN, SDS-PAGE)	31+16 29+11	3,8- 4,5	Edestina	Törmäkangas <i>et al.</i> (1994) Zhang & Jones (1995)
	Raíz	53 (Western)	31+15 26+ 9			Glathe <i>et al.</i> (1998)
<i>Lycopersicum esculentum</i> L.(tomate)	Hojas	37 (SDS-PAGE)	M	2,5- 3,5	FTC-Hb	Rodrigo <i>et al.</i> (1989) Schaller & Ryan (1996)
<i>Nelumbo nucifera</i> (loto)	Semillas	36-37 (ultracentrif. y gel filtración)		2,4- 3,8	Caseína Hb	Shinano & Fukushima (1971)

<i>Nepenthes macferlanei</i>	urna o ascidia	59 (gel filtración)		2,2	Albúmina Fibrina	Amagase (1969,1972) Takahashi <i>et al.</i> (1974) Tokes <i>et al.</i> (1974)
<i>tabacum</i> (tabaco)		36-40 (gel filtración)	M?	3,0	FTC-Hb	Rodrigo <i>et al.</i> (1991)
<i>Oryza sativa</i> L. (arroz)	Semillas	filtración)	M	2,5	Hb	Doi <i>et al.</i> (1980)
		48 (cADN)		4,2	Caseína	Hashimoto <i>et al.</i> (1992)
		57 (SDS-PAGE)	H? 25+35	3,0	Hb	Asakura <i>et al.</i> (1995a, 1995b, 1997)
<i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto)	Semilla Cotiledo- nes			3,7	Hb	Mikkonen (1986)
<i>Pinus banksiana</i>	Semillas			3,5	Hb	Burgeois & Malek (1991)
<i>Pinus sylvestris</i>	Semillas			3,7	Hb	Salmia (1981) Salmia <i>et al.</i> (1978)
<i>Ricinus communis</i> (ricino)	Semillas	48 29 (SDS-PAGE)	H: 32+16 M	3,0	péptido sintético	Hiraiwa <i>et al.</i> (1997)
<i>Solanum tuberosum</i> L. (papa)	Tubérculo	40 (SDS- PAGE y gel filtración)	M	4 a 5	Hb	Guevara <i>et al.</i> (1999)
<i>Sorghum vulgare</i> (sorgo)	Semillas	80 (gel filtración)		3,6	Albúmina	Garg & Virupaksha (1970)
<i>Spinacia oleracea</i>	Hojas	51	M			Kuwabara & Suzuki (1995)

Theobroma cacao (cacao)	Semillas	45 (SDS-PAGE)	2	3,4	Albúmina	Biehl <i>et al.</i> (1993) Voigt <i>et al.</i> (1994)
Triticum aestivum (trigo)	Hojas verdes	89 (gel filtración)		4,5	Hb	Frith <i>et al.</i> (1978)
	Semilla	50 (gel filtración) 58 (SDS-PAGE)	M	3,0 4,5	Albúmina Gliadina	Belozersky <i>et al.</i> (1989)
xHaynaldosticum sardoum	Semillas	60-100 (gel filtración)		4	Hb	Galleschi <i>et al.</i> (1989)
		66 (gel filtración)		3.1	Péptido cromóforo	Kervinen <i>et al.</i> (1995)
Zea mays L. (maíz)	Polen	33 (SDS-PAGE) 60 (HPLC)	M H: 2?	5,6	FITC-caseína	Radlowski <i>et al.</i> (1996)

H: heterodímero - M: monómero - Hb: hemoglobina.

3.2. ESTRUCTURA PRIMARIA Y TRIDIMENSIONAL

Muchas peptidasas, incluyendo las aspárticas, son sintetizadas como cadenas simples de zimógenos inactivos. Procesamientos proteolíticos postraduccionales producen la enzima madura activa (Tang & Wong, 1987). Así, en la mayoría de las APs se remueve un segmento N-terminal del propéptido y en la catepsina D y en algunas peptidasas de plantas se producen procesamientos posteriores de la cadena simple que generan un dímero activo.

Las secuencias de aminoácidos de las APs de plantas obtenidas a partir de los cADN pueden ser divididas en tres regiones: dominio amino terminal, inserto específico de plantas (PSI) y dominio carboxilo terminal. Los dominios N- y C-terminal muestran alta homología con los correspondiente dominios de las APs microbianas y de mamíferos. La región N-terminal contiene los dos ácidos aspárticos del sitio activo en las secuencias Asp-Thr-Gly y Asp-Ser-Gly. Estas secuencias se conservan en todos los Reinos, aunque

algunas enzimas microbianas y de mamíferos tienen Asp-Thr-Gly en ambos sitios (Mutlu & Gal, 1999).

El PSI es un inserto de alrededor de 100 aminoácidos que no se ha detectado en las APs de mamíferos, hongos, levaduras, protozoarios y virus conocidas. La función de este PSI es desconocida pero la secuencia presenta una considerable homología con la de todas las saposinas conocidas, en cuanto a la conservación y posición de los seis residuos de cisteína, del sitio de glicosilación y del patrón de residuos hidrofóbicos (Vaccaro *et al.*, 1993; Guruprasad *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1997). Las saposinas son un grupo de proteínas activadoras de la β -galactosil ceramidasa y de la β -galactosidasa, enzimas lisosomales de mamíferos. Guruprasad *et al.* (1994) han sugerido que el PSI se uniría a ciertos lípidos y dirigiría a la forma precursora de la AP hacia el compartimiento citomorfológico apropiado, constituyendo por lo tanto la señalización vacuolar de las APs vegetales. Además Zhu & Conner (1994), al detectar que una proteína con similitud antigénica a una saposina se une transitoriamente con la catepsina D humana, proponen que esa interacción podría facilitar el marcado lisosomal de la catepsina en la vía de la manosa 6-fosfato.

También Mutlu & Gal (1999) postulan que el PSI parece no cumplir una función crítica en la actividad enzimática, pues es procesado en algunas APs de plantas y no está presente en las APs de animales. Sugieren que el PSI puede estar involucrado en el marcado o procesamiento de las APs o en alguna otra función específica, como la tolerancia a la desecación de las semillas.

La no exigencia del PSI para que las APs desarrollen su actividad peptidásica es señalada también por Ramalho-Santos *et al.* (1998a, b). Estos autores postulan otras funciones para el PSI de cardosina A; la alta similitud entre las secuencias C-terminal de cardosina A y la señal de marcado vacuolar de la lectina de cebada les sugiere que la señalización estaría dada por el C-terminal y no por el PSI. Proponen que el PSI podría bloquear el sitio activo del cardosinógeno A impidiendo la proteólisis indeseada o actuar como una chaperona intramolecular que permita el correcto plegado de la peptidasa. También plantean que la similitud con las saposinas podría indicar que durante la biosíntesis o la ejecución del rol fisiológico de la peptidasa se requiera el PSI para unir glicoesfingolípidos y/o glicosidasas o que el inserto participe de la vía de transducción de señales.

Al encontrar que la cadena precursora de la cardosina A está asociada con las membranas microsomales de las yemas florales, mientras que la enzima activa generada por remoción del PSI es soluble, Faro *et al.* (1999) proponen que la función primaria del

PSI sería la de facilitar la asociación de los precursores a las membranas del retículo endoplásmico y plasmática.

En un trabajo reciente White *et al.* (1999) describen la obtención de la ciprosina recombinante y observan que cuando se expresa una construcción de nucleótidos carente del PSI se acumula un precursor inactivo (prociprosina), sugiriendo que el PSI cumple el rol de asegurar que el polipéptido naciente sea plegado adecuadamente y susceptible de ser activado para generar la ciprosina madura activa.

Los estudios cristalográficos de la profitepsina, zimógeno de una peptidasa aspártica vacuolar de cebada, indican que esta proteína presenta la estructura bilobulada típica de las enzimas de la familia de la pepsina con el sitio activo entre los dos lóbulos. El PSI forma un dominio independiente unido a la región del C-terminal (Kervinen *et al.*, 1999). Por otro lado, la estructura cristalográfica de la cardosina A incluye dos moléculas glicosiladas que se mantienen unidas por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno y que está formada por la duplicación de un motivo de hojas β antiparalelas y α -hélices (Frazão *et al.*, 1999).

3.3. ROL FISIOLÓGICO

Las APs de plantas identificadas hasta el momento son vacuolares o proteínas secretadas. Precisamente, la aspartil peptidasa de cebada (HvAP) está presente en las vacuolas de granos, flores, tallos, hojas y raíces (Runeberg-Roos *et al.*, 1994; Törmäkangas *et al.*, 1994), las APs de cáñamo (St. Angelo *et al.*, 1969) y las de trigo (Elpidina *et al.*, 1990) están asociadas con cuerpos proteicos intracelulares y aquellas de plantas insectívoras como *Nepenthes* son secretadas en el fluido de la urna (Tökes *et al.*, 1974).

El conocimiento sobre el rol biológico de las APs de plantas es escaso. Se ha propuesto que están involucradas en la hidrólisis de proteínas almacenadas y extracelulares, pero no hay pruebas concluyentes al respecto. Algunos estudios realizados con la finalidad de dilucidar el rol biológico de las APs son mencionados a continuación.

En hojas de tomate y tabaco, las APs se colocan con proteínas relacionadas con la patogénesis y podrían regular su acción biológica (Rodrigo *et al.*, 1989, 1991). En semillas de trigo se las asocia con la hidrólisis de proteínas almacenadas (Belozersky *et al.*, 1989; Dunaevsky *et al.*, 1989), al igual que en semillas de cacao (Voigt *et al.*, 1994) y de *Arabidopsis*, donde procesan albúminas 2S almacenadas (D' Hondt *et al.*, 1993). En cebada, la HvAP procesa *in vitro* el C-terminal del precursor de la lectina de cebada y,

dado que las dos proteínas están colocalizadas en las vacuolas de las células de la raíz de embriones en desarrollo, Runeberg-Roos *et al.* (1994) sugieren que la HvAP vacuolar participa en el procesamiento *in vivo* de la lectina. Además, la amplia distribución tisular de la peptidasa de cebada (granos, flores, tallos, hojas y raíces) y su localización intracelular (vacuolar) sugiere que HvAP cumple funciones relacionadas con el procesamiento e intercambio de proteínas en las células vegetales, en forma similar al rol propuesto para enzimas vacuolares/lisosomales de la peptidasa A de levaduras y de la catepsina de mamíferos (Törmäkangas *et al.*, 1994).

La intervención de las APs en los procesos de senescencia se ha mencionado en el caso de las peptidasas encontradas en hojas de naranjo, donde hidrolizan las subunidades larga y corta de la enzima Rubisco (ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa/oxigenasa) involucrada en la fotosíntesis (García-Martínez & Moreno, 1986), en la senescencia de hojas y raíces de cebada (Kervinen *et al.*, 1993, Runeberg-Roos & Saarma, 1998) y de flores de cardo (Heimgartner *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1994a). Según Ramalho-Santos *et al.* (1997), la participación de cardosina A en la senescencia floral de *C. cardunculus* L. parece ser una función secundaria, interviniendo en estadios terminales al romperse la membrana vacuolar; esto explicaría la presencia de actividad proteolítica durante varios años en flores secas.

La identificación de la tríada Arg-Gly-Asp (RGD) en la secuencia de aminoácidos deducida del cADN de cardosina A y su interacción con una proteína de 100 kDa del polen llevó a Faro *et al.* (1999) a postular que la cardosina A puede cumplir un rol en los mecanismos de reconocimiento del polen. La secuencia RGD es bien conocida en tejidos de mamíferos por facilitar funciones de reconocimiento celular tales como adhesión, migración, señalización, diferenciación y crecimiento.

3.4. GENES Y EVOLUCION

3.4.1. Estructura de los genes AP

Se ha elucidado la secuencia de los genes que codifican peptidasas aspárticas (genes AP) en cebada (Runeberg-Ross *et al.*, 1991; Sarkkinen *et al.*, 1992), arroz (Asakura *et al.*, 1995b), flores de cardo: ciprosinas y cardosinas (Cordeiro *et al.*, 1994b; Veríssimo *et al.*, 1996), tomate (Schaller & Ryan, 1996), colza (D'Hondt *et al.*, 1997) y *Arabidopsis thaliana* (D'Hondt *et al.*, 1997; Mutlu *et al.*, 1999).

Al comparar la estructura de los genes AP de plantas, animales y hongos, Asakura *et al.* (1995b) concluyen que las peptidasas aspárticas tienen estructuras

genotípicas diferentes, dependiendo de su origen. Llegan a esta conclusión al estudiar la organización del gen orizasina1 de una AP del arroz que consta de 14 exones y 13 intrones y que presenta posiciones de inserción de los intrones totalmente diferentes a las de las APs de origen animal y fúngico (*Figura 3*). Además, la orizasina1 presenta un exón en el extremo 5' no codificante, estructura nunca descrita en otros genes AP.

En los genes AP de animales (catepsina D humana, quimosina bovina, pepsinógeno humano) se ha encontrado una organización común que consta de 9 exones y 8 intrones, con la sola excepción del gen de la renina humana, que tiene 10 exones y 9 intrones.

Los genes AP de hongos también presentan una diferente organización. La peptidasa A fúngica carece de intrones, la AP de *Rhizopus niveus* (RNAP) tiene un intrón y la aspergil pepsina A de *Aspergillus awamori* está codificada por cuatro exones y tres intrones (*Figura 3*).

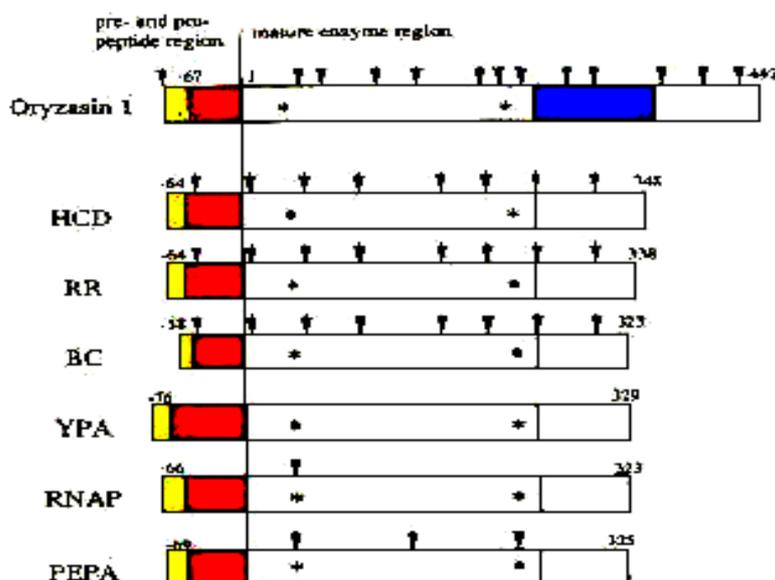


Figura 3.- Esquema de genes de peptidasas aspárticas (Asakura *et al.*, 1995b)

Oryzasin 1: AP de arroz. *HCD*: catepsina D humana. *RR*: renina de rata. *BC*: quimosina bovina.

YPA: AP de levadura. *RNAP*: AP de *Rhizopus niveus*. *PEPA*: aspergil pepsina A.

Las flechas indican las posiciones de los intrones. Los asteriscos señalan la ubicación de los ácidos aspárticos del centro activo. En amarillo se muestra la región del péptido señal, en rojo la región del propéptido y en azul el inserto específico de plantas (PSI).

3.4.2. Posibles procesos evolutivos de los genes AP

La duplicación génica a partir de un gen AP ancestral, durante la evolución molecular de estas peptidasas, ha sido propuesta por varios autores (Asakura *et al.*, 1995b; Veríssimo *et al.*, 1996). Barrett *et al.* (1998) afirman que los dos lóbulos que componen las AP de la familia A1 han derivado por un evento de duplicación, dado que cada lóbulo contiene una secuencia de aminoácidos conservada alrededor del residuo aspártico del centro catalítico y que las estructuras tridimensionales son muy similares.

Asakura *et al.* (1995b) sugieren que los genes APs de animales han retenido la mayoría del genotipo ancestral y si bien los genes APs microbianos han divergido durante la evolución, mantienen alguna similitud con los de animales.

En cuanto a los genes AP de plantas, aunque la conservación de los residuos aspárticos del centro activo indicaría que también son el resultado de una duplicación, la organización génica presenta divergencias en cuanto a la posición de los intrones con los genes AP animales y microbianos. La ubicación de los intrones es muy similar en *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* y *Oriza sativa* pero muy diferente de la localización en las APs de mamíferos (Mutlu & Gal, 1999).

4.- CULTIVO *IN VITRO*

4.1. CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES: GENERALIDADES

Debido al incremento de la población mundial, en los últimos años se ha acentuado el interés por la biotecnología vegetal con el propósito de producir alimentos, mejorar cultivares, adaptarlos a diferentes condiciones climáticas y edafológicas y obtener metabolitos de interés comercial (Pérez Ponce, 1998).

En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales ha merecido especial atención debido a que comprende un grupo heterogéneo de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos o células en un medio de composición química definida e incubados en condiciones ambientales controladas (Roca & Mroginski, 1991; Pérez Ponce, 1998).

Las razones que determinan que el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales constituya una tecnología interesante para la producción de plantas y productos naturales de interés, son las siguientes: 1) la producción de plantas de sanidad controlada, lo que permite incrementos en los rendimientos, 2) la independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas socio-políticos, 3) la capacidad de establecer un sistema de producción definido, en relación a las demandas del mercado, 4) el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar a campo, 5) la conservación del germoplasma de plantas de interés comercial o en vías de extinción, 6) la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético, más rápidos que en los cultivos tradicionales, por técnicas biotecnológicas e ingeniería genética, 7) la producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimiento lento o difíciles de obtener por extracción o por síntesis química, 8) la síntesis de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro*, 9) la obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con síntesis química y 10) la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, a herbicidas o a estrés abiótico, con mejor calidad nutricional, que actúen como biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos o que secuestren metales pesados de suelos contaminados, entre otras aplicaciones.

4.1.1. Medios de cultivo

Aunque actualmente se cuenta con una literatura detallada de técnicas de cultivos vegetales *in vitro*, con los protocolos correspondientes a muchas especies vegetales (Dixon, 1985; Vidalie, 1986; Conger, 1987; Bajaj, 1988; Pollard & Walker, 1990; Roca & Mroginski, 1991), existen especies en las cuales el establecimiento, multiplicación y/o

enraizamiento de los cultivos es dificultoso y se requiere una intensa tarea experimental para lograr su micropropagación o para obtener callos o suspensiones capaces de producir los metabolitos deseados.

Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción (Krikorian, 1991).

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller, 1953, 1954; Murashige & Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk & Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento.

La **composición mineral** se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular.

Los requerimientos de nitrógeno son generalmente provistos por una mezcla de nitrato y amonio en concentraciones variables entre 3 y 50 mM. Cuando estas fuentes son suplementadas en forma individual se afectan, generalmente en forma negativa, tanto el crecimiento del cultivo como la producción de metabolitos (Ertola *et al.*, 1994). Pero, dado que el uso de nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno si se compara con el amonio, algunos explantos crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido (Krikorian, 1991), recomendándose en este caso la adición de un ácido orgánico como el succinato como agente bufferante. En el *ítem 5.2.2.* se presentan ejemplos de la influencia de las concentraciones de nitrato y amonio sobre la producción de metabolitos secundarios.

Muchas células vegetales son sensibles a los niveles de fosfatos en el medio. Precisamente, el mantenimiento de los niveles de fosfato por debajo del óptimo para el crecimiento estimula entre 3 y 4 veces la acumulación de cinamoil-putrescina en cultivos de suspensiones de *Nicotiana tabacum* (Schiel *et al.*, 1984) e incrementa la síntesis de alcaloides en *Catharanthus roseus* (Misawa, 1985). Habitualmente, los fosfatos son almacenados en la vacuola y adquiridos desde allí para el crecimiento, mientras que la

síntesis de metabolitos comienza al agotarse el fosfato vacuolar (Ertola *et al.*, 1994). La concentración necesaria de fosfato indicada en los diferentes medios de cultivo varía entre 0,1 y 1,5 mM.

Generalmente se agrega calcio en mayores concentraciones que en los medios microbianos, variando entre 1 y 3 mM.

El hierro es esencial para el crecimiento celular y se agrega al medio de cultivo en una concentración de 0,01 a 0,15 mM. Se aconseja la utilización del quelato Fe-EDTA que aumenta la solubilidad del hierro.

La naturaleza y concentración de los micronutrientes empleados en los medios de cultivo surgen principalmente de resultados empíricos al evaluar la capacidad de cada elemento de afectar el crecimiento. En general el boro, el manganeso, el yodo y el cinc se utilizan en concentraciones variables entre 1 y 100 mM, mientras que el resto de los micronutrientes se agregan en valores inferiores a 0,1 mM. No hay un estudio sistemático de su influencia en el crecimiento y la productividad, aunque existen varios trabajos puntuales como los referidos a la estimulación de la producción de shikonina al aumentar 30 veces el ión cobre (Fujita *et al.*, 1981), al incremento de la producción de compuestos fenólicos por deficiencia de boro (Ertola *et al.*, 1994) y a la mejor formación y calidad de callos de caña de azúcar al incrementar el calcio y el magnesio (Gomez Kosky, 1998a).

Huang y Murashige (1977) y Dixon (1985) realizaron estudios comparativos de la composición salina de varios medios comerciales de cultivo de tejidos vegetales, destacando que: 1) el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) presenta altas concentraciones de nitrato, potasio y amonio; 2) el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) se caracteriza por una alta concentración de nitrato de potasio; 3) los medios MS y SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) presentan altas concentraciones de sales comparados con el medio de White (1963); 4) los medios MS y SH contienen hierro formando un quelato con EDTA, mientras que en los medios de White (1963) y de Heller (1953) está como sulfato y cloruro férrico, respectivamente.

Si bien las plantas son autótrofas, puede ser necesario añadir al medio de cultivo algunas **vitaminas** hasta que los cultivos prosperen. Las vitaminas favorecedoras del desarrollo de cultivos *in vitro* y que se añaden rutinariamente en la mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (B₁), piridoxina (B₆) y ácido nicotínico (Krikorian, 1991). Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B₂), colina, cianocobalamina (B₁₂) y ácido fólico. El ácido ascórbico (vitamina C) se considera benéfico en algunos casos, pero probablemente debido más a su capacidad reductora que a su papel como vitamina.

Otro compuesto orgánico que promueve el crecimiento de algunos cultivos es el **mio-inositol**, que está involucrado en la síntesis de fosfolípidos y por lo tanto de sistemas de membranas. En general se utiliza en una concentración 0,5 mM (Conger,1987).

El papel de los **aminoácidos** en la nutrición de los tejidos y células vegetales es complejo, ya que los tejidos responden en forma diversa a su suplemento. En general, si los aminoácidos corresponden a la forma D son inhibidores, mientras que en la forma L tienen acción benéfica (Krikorian, 1991).

Debido a que las células cultivadas *in vitro* son generalmente heterotróficas respecto de la fuente de carbono, se deben agregar **azúcares** al medio de cultivo. Estos actúan como fuente energética y de carbono e incrementan el potencial osmótico del medio. La sacarosa, en concentraciones del 2 al 4 % (p/v), constituye la fuente más utilizada. Otros azúcares capaces de sostener el crecimiento o incrementar la producción de metabolitos son glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y lactosa. Varios investigadores han estudiado la influencia de la fuente de carbono en el crecimiento y la producción, observando que el nivel de azúcar puede influenciar a ambos pero no siempre es previsible su efecto. En general, el incremento de los niveles de sacarosa favorece el crecimiento y la formación de productos, pero valores superiores al 10 % (p/v) pueden producir represión por catabolitos (Ertola *et al.*, 1994).

Aunque la composición del medio de Murashige-Skoog da buenos resultados en el cultivo *in vitro* de la mayoría de las especies, se debe seleccionar una combinación de nutriente en función del conocimiento de la fisiología de la especie, de los resultados experimentales obtenidos, del tipo de cultivo a desarrollar (plántulas, callos, raíces, meristemas, embriones) o del objetivo del trabajo (crecimiento, diferenciación u obtención de metabolitos).

Los reguladores de crecimiento cuyo tratamiento se presenta en el ítem 4.1.2. son componentes exclusivos de los medios de cultivos vegetales.

El **pH** inicial de los medios de cultivo se regula, en general, entre pH 5,5 y 6,0, dado que afecta tanto el crecimiento como la producción.

4.1.2. Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1 mM.

A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo

evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury & Ross, 1994).

Los reguladores del crecimiento que resultan útiles para el establecimiento y crecimiento de los cultivos de tejidos vegetales como así también para la producción de metabolitos se agrupan en varias categorías, de acuerdo a su estructura, tal como se describe en los ítems siguientes.

4.1.2.1. Auxinas

Es una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995). Las auxinas más utilizadas son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA (ácido α -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indolbutírico), el pCPA (ácido *p*-clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2-oxiacético).

En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula (Abel & Theologis, 1996). La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros (Cleland, 1995).

4.1.2.2. Citocininas

Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea

(zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales.

Las citocininas *in vivo* incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas (Salisbury & Ross, 1994).

La eficiencia comparativa de dos citocininas (BA y 2-iP) en igual concentración sobre la propagación *in vitro* de *Paeonia suffruticosa* fue estudiada por Bouza *et al.* (1993). Los explantos cultivados en BA desarrollan nuevas hojas y yemas axilares asegurando una buena multiplicación vegetativa, mientras que el desarrollo de los explantos cultivados en 2-iP fue escaso. Las respuestas anteriores fueron correlacionadas con los niveles endógenos de AIA y ABA (ácidos abscísico), observando que altas concentraciones de BA se asociaron con baja producción de AIA y que el ABA se produce más tardíamente en los explantos tratados con BA que en los cultivados con 2-iP. Estos resultados indican que un mismo tejido reacciona de modo diferente ante el estímulo hormonal, aún cuando se trate de compuestos relacionados.

La inclusión de citocininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas.

La proporción entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la desdiferenciación, por lo que se deben programar las concentraciones de auxinas y citocininas a través de diseños factoriales para cada especie y variedad vegetal y según el objetivo del trabajo. En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos (Krikorian, 1995).

Además de las citocininas derivadas de adenina, se han detectado una serie de fenilureas sustituidas que tienen similar actividad y son utilizados como citocininas en algunos protocolos de cultivo de tejidos vegetales (Krikorian, 1995; Christianson & Hornbuckle, 1999). Tales compuestos son el tidiazuron (TDZ), la N,N'-difenilurea (DPU) y la cloropiridilfenilurea (CPPU).

El hecho que no se hayan obtenido mutantes de ninguna especie vegetal que sean auxina- o citocinina-deficientes indica que estos dos reguladores de crecimiento son indispensables para el crecimiento vegetal, lo que llevó a Gray & Estelle (1998) a postular que tales mutantes serían embriogénica y/o gametofíticamente letales.

4.1.2.3. Giberelinas

Las giberelinas (GA_s) constituyen una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray & Estelle, 1998).

Se han identificado 64 GA_s exclusivos de plantas superiores, 12 GA_s que están presentes sólo en hongos del género *Gibberella* y 13 tipos de GA_s que se aíslan de ambos grupos. Tanto en *Gibberella* como en angiospermas se han aislado varios tipos de GA_s simultáneamente (Sponsel, 1995).

Las GA_s se sintetizan a partir de ácido mevalónico en tallos jóvenes y en semillas en desarrollo. Permiten superar la latencia de semillas y brotes, promueven la floración y retardan la senescencia.

Los variados efectos de las giberelinas sugieren que tienen más de un sitio de acción primario. Así, si sólo se considera la elongación del tallo en plantas completas, ésta es el resultado de al menos tres acontecimientos coadyuvantes: 1) estímulo de la división celular de las células meristemáticas del ápice del tallo, 2) promoción de la hidrólisis de almidón, fructanos y sacarosa originando monosacáridos que proporcionen energía vía respiración, contribuyan a la formación de la pared celular y disminuyan el potencial hídrico de la célula y 3) incremento de la plasticidad de la pared celular, permitiendo la elongación celular (Salisbury & Ross, 1994).

A pesar de la gran cantidad de efectos fisiológicos de las GA_s, su uso en los medios de cultivo no está muy difundido. En algunos casos, como en cultivos de zanahoria, se ha demostrado que el GA₃ afecta más la división que el crecimiento celular (Krikorian, 1995). En cultivos productores de metabolitos secundarios puede afectar la producción tanto en los niveles como en su concentración relativa; tal es el caso de los cultivos de raíces transformadas de *Brugmansia candida*, en los cuales el suplemento de GA₃ reduce la acumulación de alcaloides del tropano y altera significativamente la concentración relativa (Rhodes *et al.*, 1994).

4.1.2.4. *Acido Abscísico*

El ácido abscísico (ABA) es un regulador de crecimiento cuya tasa de biosíntesis se modifica significativamente frente al estrés fisiológico ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, bajas o altas temperaturas, etc. El ABA provoca respuestas que ayudan a proteger a las plantas contra estos factores, como el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas. Estas características pueden utilizarse en cultivo *in vitro* para producir metabolitos de reacción al estrés, para retrasar

el crecimiento y para moderar los efectos de auxinas y citocininas (Salisbury & Ross, 1994).

4.1.2.5. Etileno

El etileno es un compuesto gaseoso reconocido como hormona de maduración de los frutos pero que además regula diversos procesos fisiológicos como la germinación de las semillas, la senescencia de hojas y flores, la abscisión de hojas y frutos y la floración de algunas especies. El modo de acción del etileno no es aún conocido aunque se han detectado cambios en la expresión genética de algunas proteínas (McKeon *et al.*, 1995).

Es producido en cultivos *in vitro* de todo tipo y se acumula en la fase gaseosa de los recipientes de cultivo en concentraciones variables según la clase y peso del tejido, el volumen y la cubierta del recipiente y las condiciones de cultivo. La acumulación de etileno induce la formación y el crecimiento de callos en algunos cultivos *in vitro*, como en tabaco, dalia y tomate, mientras que inhibe o tiene escaso efecto en la dediferenciación de otras especies. En la morfogénesis se han observado efectos variables en diferentes especies, tanto estimulantes como inhibidores o sin efecto en la formación de vástagos y raíces (George, 1987b; Krikorian, 1995).

4.1.2.6. Poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y brasinoesteroides

Los compuestos mencionados en los ítems anteriores son los reguladores de crecimiento corrientemente utilizados en cultivos *in vitro*, especialmente las auxinas y citocininas. Sin embargo, en los últimos años se han descrito otros grupos de compuestos químicos producidos por las plantas, que afectan su crecimiento y desarrollo y cuya acción *in vitro* se ha ensayado, especialmente, en la producción de metabolitos. Entre ellos cabe mencionar a las poliaminas, los jasmonatos, los brasinoesteroides y el ácido salicílico.

Las **poliaminas** (putrescina, espermidina, cadaverina) ejercen controles regulatorios en el crecimiento y desarrollo de las plantas (metabolismo primario), particularmente en la división celular y en la diferenciación. Las plantas con una alteración genética en el contenido de poliaminas presentan alteraciones en el desarrollo y es así que los cultivos de tejidos de zanahoria con bajo nivel de poliaminas producen callos, mientras que cuando la concentración de poliaminas es alta se forman embriodes. Además, las plantas de tabaco con sobreexpresión de espermidina producen anteras en lugar de ovarios (Davies, 1995).

Los **jasmonatos**, que comprenden al ácido jasmónico y a su metil éster, inhiben el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas. Promueven, además, la senescencia, la abscisión y la formación de tubérculos. Otro rol importante de los

jasmonatos es su participación en los mecanismos de defensa de las plantas, donde inducen la síntesis de inhibidores de peptidasas y de otras enzimas involucradas en la defensa (Davies, 1995). Se conoce también que la aplicación exógena de metil jasmonato induce la producción de metabolitos secundarios en varias especies, incluidas algunas del género *Taxus* (Roberts & Shuler, 1997) y *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez *et al.*, 1999).

El **ácido salicílico** es biosintetizado a partir del aminoácido fenilalanina y su rol fisiológico aún no ha sido determinado. La aplicación exógena induce la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis, incrementa la longevidad de las flores, inhibe la síntesis de etileno y la germinación de las semillas y revierte los efectos del ABA (Davies, 1995).

Los **brasinoesteroides** comprenden un conjunto de más de 60 compuestos esteroideos, el primero de los cuales fue aislado del polen de *Brassica napus* L. Promueven la elongación del tallo, inhiben el crecimiento y desarrollo de la raíz e impulsan la biosíntesis de etileno (Davies, 1995).

4.1.2.7. Mecanismos de acción de los reguladores de crecimiento vegetal

El desarrollo de las plantas es el resultado de un intrincado control hormonal múltiple (espacial y temporal) a través de la regulación y expresión de varios sistemas de genes. La complejidad de los efectos pleiotrópicos de los reguladores de crecimiento vegetales pueden ser el resultado de una acción primaria simple del fitorregulador o de un efecto sobre la expresión génica. Aunque las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal sean reconocidas como importantes compuestos señal, que están directa o indirectamente involucrados en el control de la actividad génica, la vía de transducción de señales, los sitios de percepción y los receptores son aún poco conocidos. Recientes estudios genético-moleculares con mutantes hormonales, especialmente de *Arabidopsis thaliana*, han demostrado la participación de quinasas y fosfatasa en las vías de transducción de algunos reguladores de crecimiento de plantas (Barendse & Peeters, 1995).

Han sido identificadas algunas proteínas específicas que se unen a los reguladores de crecimiento y que actuarían como receptores. Varias proteínas ligantes de auxinas (ABPs) han sido halladas en diferentes localizaciones celulares tales como el retículo endoplásmico, la membrana plasmática, el núcleo y también como ABPs solubles. Las ABPs del retículo producirían proteínas de la membrana plasmática y de la pared celular; las de la membrana plasmática podrían estar involucradas en la percepción de auxinas; las del núcleo, en la regulación de la expresión génica y las solubles podrían

estar comprometidas en mantener gradientes de concentración (Jones, 1994). En este sentido, Marten *et al.* (1991) encontraron en frijoles una interacción directa de las auxinas con la cara extracelular de los canales aniónicos de la membrana plasmática de las células oclusivas de los estomas.

También hay evidencias de la presencia en la membrana plasmática de proteínas ligantes de GA_s que al interactuar inducen la síntesis de α -amilasa y de ligantes de ABA que regulan el cierre de los estomas (Libbenga & Mennes, 1995). En general, si ABA y GA₃ son percibidas por receptores de la cara externa de la membrana se producen respuestas rápidas de las células, mientras que la percepción citoplasmática produciría efectos tardíos y prolongados (Allen & Trewavas, 1994).

Los reguladores de crecimiento además pueden interactuar directamente con el ADN e influenciar la transcripción (Barendse & Peeters, 1995). Por este mecanismo parecen actuar las proteínas nucleares y citoplasmáticas ligantes de auxinas identificadas en células del tabaco y las proteínas que unen citocininas en hojas de cebada (Libbenga & Mennes, 1995).

4.1.3. Condiciones ambientales de cultivo

Los cultivos de tejidos vegetales deben mantenerse en condiciones ambientales semejantes a las naturales más favorables. La luz, la temperatura y la humedad relativa son los principales factores del ambiente que inciden sobre los cultivos (Vidalie, 1986).

El comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperíodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz. La mayoría de los cultivos desarrollan a una intensidad luminosa entre 5 a 25 W/m² (1000 a 5000 lux). Si bien la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas, en general se utiliza luz blanca, pobre en longitudes de onda larga. El fotoperíodo habitualmente utilizado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, aunque algunos cultivos requieren oscuridad (Marín, 1993).

La temperatura de las cámaras de cultivo se regula en general entre 22 y 28°C, permitiendo así el desarrollo tanto de especies de climas templados como de plantas tropicales. Es de destacar que durante el período iluminado, la temperatura en el interior de los frascos de cultivo es 1-2°C superior a la de la cámara, debido al efecto invernadero; se crea así un termoperíodo suave (Marín, 1993).

La velocidad de síntesis y de degradación de distintos compuestos y por ende el nivel de producción y acumulación de metabolitos también es influenciado por la

temperatura. Así, *Nicotiana tabacum* acumula entre un 100 a 200 % más nicotina a 27°C que a 21°C o a 31°C (Mantell & Smith, 1983).

En cuanto a la humedad relativa, ésta se mantiene en alrededor del 70 % en las condiciones en las que se realizan habitualmente los cultivos, aunque varía con la temperatura de la cámara y el tipo y cierre de los recipientes. El porcentaje de humedad relativa no es reportado en la mayoría de los trabajos sobre cultivo *in vitro* de vegetales (George, 1987a).

4.2.- TIPOS DE CULTIVOS

La producción de plantas y de metabolitos puede realizarse mediante cultivos de tejidos vegetales diferenciados o indiferenciados.

4.2.1. Cultivos diferenciados

Los métodos de regeneración de plantas por cultivo *in vitro* incluyen la embriogénesis somática y la organogénesis.

4.2.1.1. Embriogénesis somática

Los embriones que no resultan de la fusión de gametos se definen como embriones somáticos, asexuales o adventicios. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, no poseen conexión vascular con el tejido materno y son capaces de crecer y formar plantas normales (Litz & Jarret, 1991; Jiménez González, 1998). La embriogénesis somática se puede obtener directamente a partir de células aisladas o utilizando callos.

Si bien implícitamente todas las células vegetales tienen la información genética para formar una planta completa y funcional, se usan comúnmente cotiledones e hipocótilos para producir embriones somáticos (Gómez Kosky, 1998b).

Generalmente se utilizan medios con altas concentraciones de sales, de sacarosa o de manitol y se necesita la presencia de una auxina para la iniciación del callo embriogénico, habitualmente 2,4-D. Como la maduración y la germinación de los embriones no ocurren en presencia de esta auxina, se debe remover o usarla en bajas concentraciones para permitir el desarrollo. Además, tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estados subsiguientes dependen de la presencia de nitrógeno reducido (Litz & Jarret, 1991).

La maduración comienza después que el embrión completa el proceso de histodiferenciación, el crecimiento por mitosis se detiene y la célula comienza a expandirse y a acumular sustancias de reserva. En esta etapa no es necesaria la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, aunque en algunas especies se recomienda el uso de citocininas y en otras la adición de ABA (Gómez Kosky, 1998b).

4.2.1.2. Organogénesis

La organogénesis consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos que luego enraizan vía la formación y proliferación de meristemas radicales. Los brotes pueden formarse directamente del explanto (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Jiménez González, 1998).

La organogénesis se desarrolla por inoculación de tejido meristemático estéril (yemas axilares o adventicias) en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, de compuestos orgánicos y de reguladores de crecimiento. La calidad y cantidad de los componentes del medio dependerá de la especie y del explanto que se quiera cultivar *in vitro* dado que la inducción de un tipo específico de órgano involucra señales aún poco conocidas.

La micropropagación es la tecnología más difundida de propagación masiva de plantas vía organogénesis. Consiste en un conjunto de procedimientos asépticos de cultivo de órganos, tejidos o células que permitan la producción de poblaciones de plántulas idénticas a la planta original de la que se derivan (Krikorian, 1991).

Los cultivos diferenciados son más estables genéticamente que los cultivos indiferenciados. A su vez, los cultivos de yemas axilares que provienen de meristemas preexistentes presentan menores índices de variación genética que el cultivo de yemas adventicias que se originan *de novo* a partir de tejidos somáticos con desarrollo directo o indirecto a través de la formación de callos (Paniego, 1995; Rice *et al.*, 1992).

4.3.- CULTIVOS INDIFERENCIADOS

Los cultivos vegetales indiferenciados se obtienen a partir de órganos o tejidos organizados cultivados en un medio nutritivo apropiado (sólido o líquido) que desdiferencian ante la presencia de auxinas exógenas. En medio sólido se obtienen masas celulares más o menos compactas que constituyen los callos, mientras que en medio líquido se logran las suspensiones celulares formadas por células libres o agregadas. Los cultivos de células vegetales indiferenciadas pueden exhibir una gran variedad estructural, genética y metabólica con respecto a la planta madre.

4.3.1. Tipos celulares presentes en los cultivos *in vitro* indiferenciados

En los cultivos indiferenciados se encuentran células con gran variedad de tamaños y formas, de citoplasma denso, con vacuolas pequeñas y con alto potencial morfogénico que se pueden homologar a las células meristemáticas de las plantas. También se observan células alargadas y células muy grandes con una gran vacuola central y bajo

potencial morfogénico. Sin embargo, debido a que las células en suspensión se dividen en forma asincrónica, los tipos celulares descritos pueden no corresponder a tipos celulares diferentes sino a distintos estadios dentro del ciclo de crecimiento (Warren, 1992), aunque Gómez Kosky (1998a) las clasifica como células meristemáticas, parenquimáticas y gigantes.

A diferencia de los microorganismos, las células vegetales en suspensión en general forman agregados de células individuales de un tamaño ≥ 2 mm. Ello determina una tendencia a la precipitación de los agregados celulares que está influenciada por la composición química del medio de cultivo, la aireación y la agitación. La adición de pectinasas, la reducción de la concentración de calcio y el aumento de la velocidad de agitación permite reducir la agregación (Scragg, 1992).

4.3.2. Crecimiento de callos y suspensiones celulares

Los cultivos de callos son a menudo de crecimiento lento y heterogéneo, debido fundamentalmente a la disponibilidad vectorial de los nutrientes. Son masas celulares cuya morfología raramente provee características que permitan la selección de líneas de interés (Warren, 1992).

Para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en períodos cortos, variables según la especie (30-45 días). La tasa de crecimiento y las características de friabilidad dependen de la especie, del balance hormonal, de la concentración de agar, calcio y magnesio y de la intensidad luminosa (Gómez Kosky, 1998a).

El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es un callo friable, formado por células indiferenciadas y con baja cohesividad entre ellas. Si se requiere utilizar otro tipo de callos es necesario romper los agregados celulares por medios mecánicos o enzimáticos. Un cultivo con cúmulos de diferentes tamaños manifiesta comportamientos erráticos debido posiblemente a la diferencia de microambientes (Scragg, 1992).

Aunque los cultivos de células en suspensión son generalmente considerados semejantes a los de los microorganismos, cada tipo de cultivo presenta particularidades (*Tabla 2*). Los cultivos de células vegetales en suspensión presentan una cinética de crecimiento similar a la microbiana pero de desarrollo en mayor espacio de tiempo. Primero existe una fase de retraso o adaptación (1 a 3 días) seguida de una etapa de rápido crecimiento en donde se produce un aumento constante de la biomasa por incremento tanto del número como del tamaño celular, hasta que finalmente el índice mitótico comienza a declinar por limitación de nutrientes, hasta ser prácticamente nulo en

la fase estacionaria. Al inicio de la fase exponencial, el porcentaje de aumento de la biomasa es inferior al que corresponde al aumento en el número de células, pero esta relación luego se invierte debido al incremento del tamaño celular. Además, el peso fresco continúa aumentando después que el peso seco ha alcanzado su máximo, debido a la captación de agua (Szabados *et al.*, 1991; Scragg, 1992).

Tabla 2.- Diferencias entre cultivos de células vegetales en suspensión y cultivos microbianos (Scragg, 1990, 1992; Ertola *et al.*, 1994)

Característica	Cultivos microbianos	Suspensiones vegetales
Tamaño celular	1-2 x 2-10 μm	20-40 x 20-200 μm
Agregados	Generalmente no	Frecuentes
Tiempo de duplicación	< 2 horas	> 24 horas
Contenido de agua	75-80 %	90-95 %
Densidad del inóculo	Baja	Alta (5 – 10 %)
Consumo de oxígeno	Alto (5-200 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Bajo (1-10 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Estabilidad	Generalmente estable	Inestable
Producción espuma	Sí	Sí
Sensibilidad a la fuerza de corte (<i>shear</i>)	No, con excepción de los hongos filamentosos	Sí
Producto	A menudo extracelular	Comúnmente intracelular (vacuola)

4.3.3. Heterogeneidad y variación somaclonal

Al iniciarse un cultivo se produce una división asincrónica de los diferentes tipos celulares que forman el explanto y una selección debida a que las células difieren en su adaptación a las condiciones de cultivo. Esto determina una heterogeneidad inherente al cultivo de tejidos vegetales, aunque es posible, después de varias generaciones, obtener cultivos más homogéneos pero probablemente diferentes a los parentales.

El cultivo de tejidos indiferenciados puede presentar, además, un amplio espectro de variaciones. Es así que se han observado anomalías cromosómicas como deleciones, fusiones, cambios en la ploidía y variaciones en el número y el tamaño. Lee & Phillips (1988) atribuyen estos reajustes cromosómicos a una replicación tardía de la heterocromatina o a un desequilibrio en el *pool* de nucleótidos como consecuencia de los ciclos de transferencia desde medios de cultivo agotados a medios frescos.

4.3.4. Aplicaciones

Las cultivos de suspensiones vegetales tienen un amplio rango de aplicaciones constituyendo una técnica muy valiosa en los estudios sobre: 1) la regulación del ciclo celular, 2) la replicación del ADN y la síntesis de proteínas 3) la transferencia de material genético, 4) la absorción y transporte de nutrientes, 5) los diferentes eventos metabólicos, 6) la producción de metabolitos de interés en las industrias alimenticias, de fragancias y farmacéuticas, 7) el aislamiento y la selección de mutantes, 8) los procesos de diferenciación y desarrollo de los embriones resultantes de la embriogénesis somática, (Szabados *et al.*, 1991).

5.- PRODUCCIÓN DE METABOLITOS

5.1. SUSTANCIAS SINTETIZADAS POR PLANTAS Y CULTIVOS VEGETALES

5.1.1. Generalidades

Además de las rutas del metabolismo primario, idénticas o similares en todos los organismos vivos, los vegetales tienen otras vías metabólicas que llevan a la formación de compuestos característicos de un grupo taxonómico y cuya función no guarda relación con los procesos vitales de la célula que los biosintetiza, pero puede tener significación para el organismo productor como un todo. Estas rutas constituyen el metabolismo secundario (*Figura 4*). Las enzimas involucradas tendrán el carácter de metabolitos primarios o secundarios, dependiendo de su función metabólica (Illanes, 1994).

La biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a períodos de estrés (Piñol & Palazón, 1993). Algunas células vegetales producen metabolitos secundarios importantes en las interacciones de la planta con el medio ambiente (protección frente a depredadores, patógenos o estrés ambiental) o que están relacionadas con la maquinaria reproductiva de la planta (atracción de insectos para la promoción de la polinización). Muchos de estos productos secundarios tienen uso en la industria farmacéutica y en la producción de tests de diagnóstico, de fragancias, de aditivos alimentarios y de biocidas en general.

Lo anteriormente mencionado explica el interés de la industria en la producción de compuestos naturales cuya calidad y costos no sea afectada por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción. Es en este contexto que los cultivos de células y tejidos vegetales constituyen una alternativa para producir sustancias cuya producción comercial por los métodos convencionales resulta difícil, escasa o económicamente poco viable (Robert *et al.*, 1991). En la *Tabla 3* se muestra la variedad de metabolitos obtenidos por cultivo *in vitro* de células vegetales.

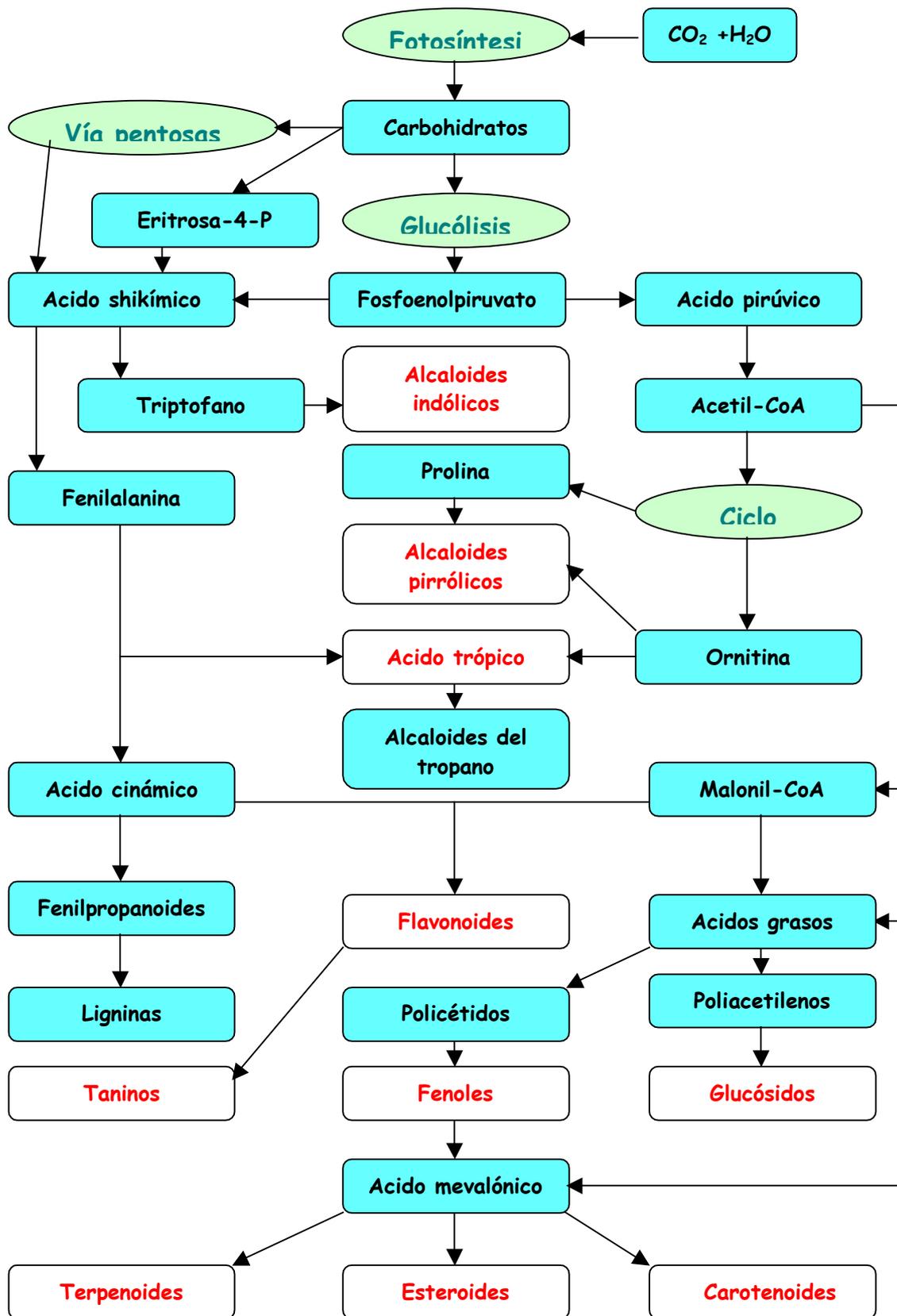


Figura 4.- Principales interrelaciones entre metabolismo primario y secundario de las células vegetales (Adaptado de Robert *et al.*, 1991; Paniego, 1995).

Tabla 3.- Metabolitos secundarios producidos por cultivos *in vitro* de células vegetales (Fowler & Stafford, 1992; Giulietti & Ertola, 1999)

Compuestos químicos	Producto	Especie vegetal
Alcaloides		
Indólicos	Catarantina, Ajmalicina Quinamina	<i>Catharanthus roseus</i> <i>Cinchona spp.</i>
Isoquinólicos	Berberinas	<i>Berberis spp.</i>
Piridínicos	Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>
Tropánicos		
	Hyosciamina, Escopolamina	<i>Hyoscyamus tuberosum</i> <i>Duboisia, Atropa, Datura y Scopolia spp.</i>
Purínicos	Cafeína	<i>Coffea arabica</i>
Otros		
Monoterpenos	Anetol	<i>Pimpinella anisum</i>
Sesquiterpenos	Paniculina Artemisina	<i>Andrographis paniculata</i> <i>Lippia, Artemisia y Datura spp.</i>
Poliacetilenos	Tiofenos	<i>Coreopsis, Bidens y Tagetes spp.</i>
Esteroides	Diosgenina Ginsenósidos	<i>Dioscorea deltoidea</i> <i>Solanum y Panax spp.</i>
Flavonoides	Antocianinas	<i>Vitis vinifera</i>
Antraquinonas	Varios 7-metilpurpurina	<i>Galium mollugo</i> <i>Digitalis y Cassia spp.</i>
Naftoquinonas	Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Lignanos	Etoposido	<i>Podophyllum y Linum spp.</i>

Los cultivos celulares vegetales no siempre producen sustancias cualitativa- y cuantitativamente iguales a las elaboradas por las plantas madres. La producción y el perfil de compuestos químicos puede ser inestable, debido a que dentro de la planta entera las células vegetales tienen un entorno bioquímico y fisiológico diferente al de las células que crecen en medios de cultivo. Además, como muchos de los metabolitos se sintetizan integrados a los eventos de diferenciación, algunas veces se necesita de algún grado de organización en los cultivos para que el metabolito se sintetice (Misawa, 1985).

La producción de metabolitos por cultivo de tejidos vegetales puede estar asociada al crecimiento (producción y crecimiento simultáneos) o ser independiente de él. Se ha observado que esta relación puede no mantenerse a través del tiempo o ser afectada por la adición de reguladores de crecimiento o el cambio de escala.

Por otro lado, bajo las condiciones ambientales y de estrés impuestas por el cultivo *in vitro* pueden producirse compuestos químicos diferentes a los de las plantas madres, por la expresión de vías metabólicas diferentes. Esta potencialidad genética incluye una alta variedad de estructuras químicas, algunas de ellas con actividad biológica (*Tabla 4*).

Tabla 4.- Nuevos compuestos encontrados en cultivos de tejidos vegetales (Fowler & Stafford, 1992; Paniego, 1995)

Clase química	Compuesto	Aplicación potencial	Especie vegetal
Alcaloide	Armorina		<i>Stephania cepharantha</i>
Alcaloide	Norcefaradiona		<i>Stephania cepharantha</i>
Alcaloide	Rauglucin	Anti-hipertensivo	<i>Rauwolfia serpentina</i>
Alcaloide	Epcrosina		<i>Ochrosia elliptica</i>
Alcaloide	N-metilajmalina	Anti-hipertensivo	<i>Catharanthus roseus</i>
Alcaloide	Ajmalicina	Antiácido	<i>Beberis stolonifera</i>
Alcaloide	Pseudoindoxil-ajmalicina	Cardiotónico	<i>Daucus carota</i>
Terpenoide	Dihomovalerato		<i>Valeriana wallichii</i>
Terpenoide	Paniculina A		<i>Andrographis paniculata</i>
Terpenoide	Honokiol		<i>Thuja occidentalis</i>
Terpenoide	Tarenósido		<i>Garenia jasminoides</i>
Antraquinona	Lucidina		<i>Morinda citrifolia</i>
Fenilpropanoide	Rutacultina		<i>Ruta graveolens</i>
Fenilpropanoide	Podoverina		<i>Podophyllum versipelle</i>

5.1.2. Producción de proteínas

Numerosos trabajos identifican patrones proteicos específicos en cultivos de callos o embriones somáticos de varias plantas, que varían según la especie, el fenotipo, el estado del desarrollo y las condiciones de cultivo. Ejemplos de ello se encuentran en *Nicotiana suaveolens* (Espino & Vazquez, 1985), *Phaseolus vulgaris* (Del Grosso *et al.*, 1987) *Pisum sativum* (Stirn & Jacobsen, 1987), *Pedilanthus tithymaloides* L. (Bricage, 1988), *Daucus carota* (Schnall *et al.*, 1991), *Populus deltoides* (Coleman & Ernst, 1991) y *Phoenix dactylifera* L. (Baaziz *et al.*, 1994).

En cuanto a la producción de enzimas por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se puede destacar el interés por la producción de peroxidasas, dada la aplicación analítica de estas enzimas en tests de diagnóstico médico, como así también en el tratamiento de compuestos recalcitrantes (Flocco *et al.*, 1999). Así, por ejemplo, se obtuvieron peroxidasas a partir de cultivos de células en suspensión de maní (Sesto & van Huystee, 1989), de rabanito (Moreno *et al.*, 1989), de pimiento (Cuenca *et al.*, 1989), de remolacha azucarera (Kevers *et al.*, 1983), de tabaco (Mader & Walter, 1986), de zanahoria (Joersbo *et al.*, 1989), de alfalfa (Gazaryan *et al.*, 1991), de cacao y de cretona (Spencer *et al.*, 1993), de batata (Kwak *et al.*, 1995), de cebada (Blinda *et al.*, 1996), de arándano (Melo *et al.*, 1996) y muchas otras especies. También se aislaron peroxidasas de cultivos en suspensión de rábano picante (*Armoracia rusticana*), la especie vegetal cuyas raíces son habitualmente usadas como fuente de esta enzima con fines comerciales (Yamada *et al.*, 1987; Parkinson *et al.*, 1990; Dix *et al.*, 1993) y de *Humulus lupulus* (Trevisan *et al.*, 1997).

En cultivos de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* se obtuvieron peroxidasas de *Armoracia rusticana* (Parkinson *et al.*, 1990; Kato *et al.*, 1991) de *Armoracia lapathifolia* (Saitou *et al.*, 1991; Alvarez *et al.*, 1995; Flocco *et al.*, 1998), de *Solanum nigrum* (Macek *et al.*, 1996) y de *Daucus carota* (Kim & Yoo, 1996).

5.1.2.1. Producción de peptidasas por cultivos *in vitro* de células vegetales

La producción de peptidasas por cultivo de tejidos ha sido estudiada en papaya (Medora *et al.*, 1973), ananá (Apte *et al.*, 1979), hierba lechera (Knorr & Miazga, 1987), higo (Cormier *et al.*, 1989), poroto (Kim & Minamikawa, 1997) y cardos como *Cynara cardunculus* L. (Cordeiro *et al.*, 1993; Lima Costa *et al.*, 1996) y *Onopordum turcicum* (Tamer & Mavituna, 1996).

En el caso del ananá (*Ananas sativus*) se realizaron estudios comparativos de la actividad proteolítica de la bromelina en tejidos no organizados, en hojas de plantas regeneradas *in vitro* y en hojas de plantas maduras. La actividad proteolítica en callos y

en hojas de plantas regeneradas *in vitro* fue semejante pero cuantitativamente menor que la de hojas de plantas maduras (Apte *et al.*, 1979).

El cultivo de callos de higo (*Ficus carica*) produce una peptidasa cisteínica con propiedades térmicas e hidrolíticas similares a las que presenta la ficina comercial que habitualmente se obtiene del látex de higos inmaduros (Cormier *et al.*, 1989). También producen peptidasas cisteínicas los cultivos de tejidos de *Carica papaya* (“papaya”; Medora *et al.*, 1973) y *Asclepias syriaca* (“hierba lechera”; Knorr & Miazga, 1987).

Las células en suspensión de *Phaseolus vulgaris* producen peptidasas serínicas y cisteínicas, incrementándose la actividad cisteínica al agregar ácido giberélico al medio de cultivo (Kim & Minamikawa, 1997).

Por otro lado, las peptidasas obtenidas en cultivo de suspensiones celulares de *Cynara cardunculus* L. muestran una gran heterogeneidad y propiedades diferentes que las enzimas de las flores (Cordeiro *et al.*, 1993) mientras que la actividad proteolítica observada por Tamer & Mavituna (1996) en cultivos de callos y suspensiones celulares de *Onoprodum turcicum* fue mayor que la observada en hojas y semillas de la planta.

5.1.2.2. Producción de proteínas recombinantes por plantas transgénicas

Las plantas transgénicas son comúnmente producidas utilizando alguno de los siguientes métodos: transformación mediada por *Agrobacterium spp.* o bombardeo de micropartículas recubiertas con ADN. Con cualquiera de estas técnicas, fragmentos del ADN extraño pueden insertarse en el genoma vegetal, habiéndose demostrado que las plantas expresan, arman, pliegan y modifican postranscripcionalmente proteínas extrañas con alta fidelidad. Los avances en la biología molecular de plantas y el uso de éstas como biorreactores permiten la producción de proteínas recombinantes que incrementan la resistencia a los patógenos o mejoran la calidad nutricional de las plantas transgénicas. Además puede inducirse la producción de polipéptidos de uso técnico o farmacéutico (Hammond, 1999; Herbers & Sonnewald, 1999; Doran, 2000).

Las **plantas insecticidas** se han obtenido por la expresión de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, de α -amilasa, de polifenol oxidasas, de quitinasas y de inhibidores de peptidasas que interfieren en el metabolismo de los insectos. Una de las ventajas de esta metodología sobre la clásica pulverización de insecticidas es que sólo serán afectados los insectos que ataquen el cultivo, no siendo perjudicados los insectos involucrados en la polinización de estas especies (Hammond, 1999; Herbers & Sonnewald, 1999).

La estrategia más utilizada para introducir **resistencia a los virus** es la que involucra la expresión del gen que codifica la proteína de cubierta de algunos virus y en

este sentido se han transformado la papa, el arroz, la papaya, el tabaco y el frijol. Otros procedimientos que resultan efectivos contra algunas virosis utilizan ARN antisentido, genes no virales y proteínas inactivantes de los ribosomas (RIPs) (Hammond, 1999; Herbers & Sonnewald, 1999).

La **resistencia a bacterias y a hongos patógenos** se induce generalmente interfiriendo con la integridad de la pared celular o de la membrana del patógeno. Así, mediante la expresión de proteínas antifúngicas (quitinasas y β -1,3-glucanasas) se puede incrementar la resistencia de las plantas a ciertos hongos (Gil Díaz *et al.*, 1998; Hammond, 1999).

Las **plantas resistentes a herbicidas** se han logrado mediante la expresión de enzimas que reducen los efectos tóxicos de esos productos químicos, por la sobreexpresión de las enzimas sensibles al herbicida o a través de la expresión de enzimas mutadas insensibles al mismo (Gil Díaz *et al.*, 1998). Así, Mannerlöf *et al.* (1997) obtuvieron plantas transgénicas de *Beta vulgaris* L. tolerantes al glifosato (herbicida de amplio espectro) utilizando genes de bacterias que degradan el glifosato a productos no tóxicos para la planta.

Nuevas proteínas con alto contenido de los aminoácidos metionina y lisina se han expresado en semillas transgénicas con la finalidad de **mejorar la calidad nutricional** de las plantas. Para ello se han seguido dos tipos de estrategias: 1) expresión de proteínas con alto contenido de metionina y/o lisina por modificación de la estructura primaria de la proteína endógena y 2) expresión heteróloga de proteínas ricas en dichos aminoácidos. Por ejemplo, para incrementar el contenido de metionina de la papa se utilizó el cADN de un mutante rico en metionina de la albúmina 2S de nuez (Herbers & Sonnewald, 1999).

Las **enzimas de uso industrial** producidas por plantas transformadas son principalmente aquellas que degradan la pared celular, el almidón y el fitato (*Tabla 5*). Las hidrolasas de la pared celular juegan un importante rol en la industria alimentaria, del papel, de la madera y de las bebidas. La α -amilasa es usada principalmente en la manufactura de alimentos y detergentes y el fitato, principal forma de almacenamiento del fósforo en las plantas, necesita ser hidrolizado por fitasas para incrementar el valor nutricional de los alimentos para animales monogástricos.

Tabla 5.- Enzimas de uso industrial producidas en plantas transformadas estables (Herbers & Sonnewald, 1999)

Enzima	Origen del gen	Planta
α -amilasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	Tabaco
Fitasa	<i>Aspergillus niger</i>	Tabaco
Fitasa	<i>Aspergillus niger</i>	Soja
$\beta(1,3-1,4)$ glucanasa	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Tabaco
$\beta(1,3-1,4)$ glucanasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Cebada
	<i>Bacillus macerans</i>	
$\beta(1,4)$ xilanasa	<i>Clostridium thermocellum</i>	Tabaco
$\beta(1,4)$ xilanasa	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Tabaco

También las plantas transgénicas pueden producir **vacunas** al expresar antígenos que desencadenan inmunidad por vía oral si los tejidos vegetales son consumidos como alimentos. Se ha demostrado en estudios clínicos preliminares que esas proteínas antigénicas producen una respuesta inmune específica en el caso de la vacuna de papa contra el cólera. Además existen evidencias que las plantas transgénicas se pueden utilizar para inducir inmunotolerancia, lo cual podría resultar efectivo en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes (Richter & Kipp, 1999).

Para incrementar los niveles de expresión en la planta y reducir los costos de purificación, la cubierta proteica de los virus del mosaico del tabaco y del mosaico de la alfalfa han sido usado como "carriers" para la expresión de péptidos antigénicos (Herbers & Sonnewald, 1999).

Otros antígenos que han sido producidos en plantas transgénicas incluyen la cápside del virus Norwalk (agente causal de gastroenteritis aguda) en tabaco y papa, un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en tabaco, una subunidad de la toxina de *E. coli* enteropatógena en papa y tabaco y la subunidad B de la toxina del *Vibrio cholerae* en papa (Herbers & Sonnewald, 1999).

A su vez, se han obtenido plantas transgénicas que sintetizan **proteínas terapéuticas recombinantes** como proteínas séricas, reguladores del crecimiento, enzimas lisosomales, antibióticos y anticoagulantes (*Tabla 6*). Varias de estas proteínas son funcionales y estructuralmente comparables a las proteínas análogas producidas en humanos. La expresión de biofarmacéuticos por plantas transgénicas es quizás la tecnología de mayor potencial económico y social, debido a que los productos requieren en general bajos costos de purificación, se producen en mayores cantidades que a partir de tejidos, no requieren cadena de frío y el abastecimiento puede ser ilimitado. Al

comparar con la producción por cultivos microbianos, con cultivos de células animales y con la extracción desde tejidos animales, la principal ventaja reside en la seguridad sanitaria de estos medicamentos, pues las plantas no son hospedantes de la mayoría de los patógenos humanos que se transmiten por sangre o por tejidos animales, como el HIV o los priones responsables de la encefalopatía espongiforme (Cramer *et al.*, 1999).

Tabla 6.- Producción de proteínas terapéuticas en plantas transgénicas (Cramer *et al.*, 1999)

Producto transgénico	Uso potencial	Planta huésped	Actividad funcional
Hemoglobina (α y β)	Sustituto sanguíneo	Tabaco	Sí (une O_2/CO_2)
Albúmina sérica humana	Sustituto sanguíneo	Papa	NT
Proteína C	Anticoagulante	Tabaco	NT
α -interferon	Protección viral y anticancerígeno	Arroz	Sí (ensayo de resistencia viral)
γ -interferon	Activación de fagocitos	Tabaco	Sí (ensayos in vitro)
GM-CSF	Leucopoyesis en trasplante de médula ósea, quimioterapia del cáncer y del SIDA	Tabaco	Sí (estimula el crecimiento de células)
Factor de crecimiento epidérmico	Mitógeno	Tabaco	NT
α -galactosidasa	Enfermedad de Fabry	Tabaco	Sí (actividad enzimática)
Glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher	Tabaco	Sí (actividad enzimática)
Caseína	Nutrición	Papa	NT
Hirudina	Anticoagulante	Canola	Sí (inhibición de trombina)
NP1 defensina	Antibiótico	Tabaco	Sí (actividad antibiótica)
Eritropoyetina	Mitógeno hematopoyético	Tabaco	No
Glutamato descarboxilasa	Diabetes	Tabaco	Sí (en ratón)

GM-CSF (factor estimulante de granulocitos y macrófagos). NT: no testado

La mayoría de los trabajos destinados a la obtención de plantas transgénicas productoras de potenciales proteínas terapéuticas han utilizado el promotor 35S derivado del virus del mosaico del coliflor y especies vegetales fácilmente modificables genéticamente, como la papa y el tabaco.

En este punto es preciso aclarar que la producción de plantas transgénicas sigue suscitando reacciones muy diferentes. Para muchos de sus defensores, esta producción resulta indispensable para lograr una agricultura sustentable que permita el acceso de toda la población a los alimentos y medicamentos. Sus detractores temen por las consecuencias, en especial las ecológicas, de la ingeniería genética y que los avances en este campo vuelva a los países en desarrollo aún más dependientes de las naciones industrializadas. Para evitar los efectos negativos es necesario establecer sistemas regulatorios de salud pública en todos los países, con el fin de identificar y supervisar cualquier efecto nocivo potencial de las plantas transgénicas.

5.2. ESTRATEGIAS PARA MANIPULAR LA CAPACIDAD BIOSINTÉTICA DE LOS CULTIVOS VEGETALES

Para que el cultivo de células vegetales tenga aplicación en la producción industrial de metabolitos, se requiere que éstos se puedan producir en cantidades apreciables y que la producción se mantenga en el tiempo (estabilidad). Sin embargo la mayoría de los cultivos celulares producen estos compuestos en niveles inferiores a los producidos por las plantas de los cuales derivan (Robert *et al.*, 1991).

Por lo tanto, después de haber estudiado y establecido el sistema de cultivo para la producción de un metabolito determinado, se deben desarrollar estrategias que permitan aumentar su rendimiento. Esto se puede lograr utilizando diferentes métodos físicos, químicos o genéticos (Fowler & Stafford, 1992).

5.2.1. Selección de líneas celulares productoras de enzimas y metabolitos

Las células vegetales en cultivo pueden representar una población heterogénea con características fisiológicas diferentes, debido a que en los repetidos subcultivos sólo se han seleccionado las células basándose en la tasa de crecimiento. Debido a ello es que debe realizarse una selección de líneas productoras del metabolito deseado, pues es bastante común encontrar diferencias en los niveles productivos de las diferentes líneas celulares (Warren, 1992).

Para establecer cultivos productores se aconseja obtenerlos a partir de plantas altamente productoras (Zenk *et al.*, 1977), aunque algunos autores no encontraron mayores diferencias partiendo de plantas con alto o bajo contenido del compuesto deseado (Roller, 1978; Kinnersly & Dougall, 1980).

Con la finalidad de explotar la variabilidad intrínseca de las plantas se deberían establecer cultivos a partir de diferentes explantos, de plantas con localizaciones geográficas diferentes y de distintas variedades (Creche *et al.*, 1987). También se deben probar diferentes medios y desarrollar distintos tipos de cultivos *in vitro* (callos, suspensiones celulares, protoplastos, cultivos diferenciados).

A menudo los cultivos *in vitro* que producen niveles elevados de metabolitos son inestables y para conservarlos se deben realizar selecciones repetitivas; esto puede deberse a que las células sobreproductoras tendrían una velocidad de crecimiento menor que conduciría a su eliminación por dilución al hacer los subcultivos (Robert *et al.*, 1991). Por lo tanto, una vez iniciados los cultivos se deben seleccionar las variantes altamente productoras y estables en la producción de metabolitos (Kurz *et al.*, 1985).

5.2.2. Optimización de las condiciones de cultivo

La optimización de la productividad de un cultivo depende de la manipulación de condiciones físicas y de elementos nutricionales del mismo. Muchas veces es necesario establecer un régimen de cultivo en dos etapas para lograr una mayor producción de metabolitos específicos. La primera involucra el crecimiento de las células en un medio de incremento de la biomasa y la segunda la transferencia de esas células a un medio de producción, en el que se active el camino metabólico del metabolito deseado (Morris *et al.*, 1985). En varios trabajos con diferentes especies vegetales se ha demostrado que las condiciones culturales que promueven una alta tasa de división celular generalmente no conducen a una elevada formación de productos secundarios. Esta relación inversa entre las síntesis de proteínas y de metabolitos secundarios se puede explicar por la utilización diferencial y antagónica de precursores comunes (Yeoman *et al.*, 1990; Fowler & Stafford, 1992; Constabel & Tyler, 1994 y Ertola *et al.*, 1994).

El tipo y la concentración de la fuente de carbono afecta no sólo el crecimiento celular sino también el rendimiento de productos, aunque no siempre de una forma predecible. Así, una alta concentración de sacarosa (10 % p/v) estimula la síntesis de antraquinona en varias especies de *Galium*, pero inhibe la producción en otras y la acumulación de alcaloides indólicos en cultivos de *Catharanthus roseus* fue óptima con 8 % de sacarosa al estudiar el rango 4-12 % (Fowler & Stafford, 1992; Ertola *et al.*, 1994).

En cuanto a la concentración de fosfatos, se observa que los niveles altos favorecen el crecimiento de los cultivos, pero tienen un efecto negativo sobre la formación de metabolitos secundarios, mientras que los niveles bajos pueden favorecer la acumulación de metabolitos (Mantell & Smith, 1983). Ejemplos de esto lo constituyen el incremento de cinamoilputrescina por *Nicotiana tabacum* y la estimulación de la

producción de alcaloides por *Catharanthus roseus* cuando disminuye el nivel de fosfatos en el medio de cultivo (Ertola *et al.*, 1994). El nivel de fosfato también afecta la acumulación de antocianinas en cultivos celulares de *Daucus carota* y *Vitis vinifera* y la acumulación de antraquinonas en suspensiones de *Galium mollugo* (Fowler & Stafford, 1992)

La limitación en la fuente de nitrógeno (sales de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o hidrolizado de caseína) tiende a suprimir el crecimiento y en algunos sistemas a aumentar la síntesis del producto deseado (Morris *et al.*, 1985). Se observa también que la sustitución de nitrógeno inorgánico por nitrógeno orgánico (peptonas, extracto de levadura) incrementa la producción de algunos alcaloides (Dougall, 1980). Existen varios ejemplos en la literatura sobre la influencia de la relación nitrato/amonio en la producción de metabolitos secundarios. Así, la presencia de amonio en el medio de cultivo anula la producción de shikonina por las células en suspensión de *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita *et al.*, 1981), mientras que la relación óptima de Noxidado/Nreducido para la producción de berberina por suspensiones de *Thalictrum minus* es de 1:2 (Nakagawa *et al.*, 1984) y de 2:1 para producir solasodina por células en suspensión de *Solanum eleagnifolium* (Nigra *et al.*, 1990).

La concentración de nitrógeno afecta generalmente el nivel de producción de aminoácidos y compuestos proteicos. Al respecto, Misawa (1985) describe que el rendimiento de inhibidores de peptidasas por cultivos de *Scopolia japonica* y de sustancias antivíricas por *Phytolacca americana* fue significativamente afectada por los niveles de los compuestos nitrogenados incorporados en el medio. También se puede incrementar el nivel de L-glutamina acumulada en células de *Symphytum officinale* al elevar la concentración de nitrógeno (Fowler & Stafford, 1992)

Por otro lado es importante la manipulación de las condiciones ambientales, debiendo estudiarse el efecto de la intensidad, el fotoperíodo y la longitud de onda de la luz, de la temperatura y de la aireación. Así, la biosíntesis de flavonoides y antocianinas es usualmente favorecida por una alta y continua intensidad de luz, mientras que en otros casos se requiere realizar el cultivo en oscuridad. En cuanto a la temperatura, hay que considerar que muchas veces la tasa de crecimiento y la acumulación de producto presentan temperaturas óptimas diferentes (Morris *et al.*, 1985).

La aireación es otro factor que puede afectar la producción de metabolitos, debiendo optimizarse su tasa para permitir tanto el crecimiento como la acumulación de productos (Scragg, 1992).

Aunque la mayoría de los cultivos celulares se establecen a un pH entre 5,5 y 6,0 se debe tener en cuenta que el mismo cambia durante el curso del cultivo. Estos cambios

pueden afectar la producción de metabolitos, como se demuestra en la conversión de triptofano en triptofol, en donde la cantidad de producto a pH 6,3 constante es el doble que a pH variable y la síntesis se inhibe totalmente si el pH decae a 4,8 (Veliky, 1977; Robert *et al.*, 1991).

5.2.3. Balance de los reguladores de crecimiento

Los regímenes hormonales estipulados en los protocolos de cultivo *in vitro* dan cuenta únicamente de la concentración hormonal agregada al medio, sin considerar el nivel hormonal propio de la célula y si los reguladores de crecimiento pudieron ser procesados por las células en estudio. Además, es posible que se genere un control por retroalimentación negativa sobre el nivel endógeno de los reguladores de crecimiento inducido por las sustancias agregadas y que exista un arrastre celular o del medio de los tratamientos anteriores. Es factible que estos aspectos sean la fuente de todas las aparentes contradicciones que se generan al tratar de explicar los efectos de los reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro*.

De todos modos, el tipo y los niveles de reguladores de crecimiento utilizados ejercen importantes efectos sobre el crecimiento y la productividad de metabolitos de plantas cultivadas *in vitro*. En general, los niveles hormonales que producen altas tasas de crecimiento no inducen la acumulación de cantidades significativas de metabolitos secundarios. Además, se ha observado que los tratamientos que estimulan la diferenciación estructural, es decir formación de brotes y de raíces desde callos, también cambian el perfil bioquímico. Es así que la regeneración de raíces en callos de algunas especies vegetales como *Hyoscyamus niger* y *Scopolia parviflora* se acompaña con un incremento de la producción de alcaloides (Yeoman *et al.*, 1990). Por otro lado, la adición de 2,4-D al medio de cultivo deprime la acumulación de alcaloides indólicos en *Catharanthus roseus*, mientras que el AIA aumenta la producción y el ANA estimula tanto la acumulación de alcaloides como la división celular (Fowler & Stafford, 1992). Además, en *Macuna pruriens* la producción de L-DOPA es estimulada por cantidades relativamente altas de 2,4-D (Brain, 1976).

5.2.4. Elicitación

La elicitación consiste en inducir la biosíntesis de metabolitos por exposición de los cultivos a moléculas capaces de causarle una situación de estrés. Esta presencia determina la expresión de genes asociados con las enzimas catalizadoras de diferentes vías metabólicas (Roberts & Shuler, 1997). Los elicitores se agrupan en dos clases: bióticos y abióticos. Entre los elicitores bióticos se encuentran micelios y componentes de

la pared celular de hongos, polisacáridos, glucanos, glucoproteínas y ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Los elicitores abióticos más conocidos como agentes de estrés incluyen a la radiación ultravioleta, las sales de metales pesados, los herbicidas y el estrés osmótico. (Ertola *et al.*, 1994).

Una de las ventajas de los tratamientos de elicitación es que no se requiere la transferencia de la biomasa a un medio de producción y que generalmente generan respuestas rápidas. La desventaja es que la producción, en general, no es sostenible en el tiempo (Di Cosmo & Misawa, 1995).

Existe una gran especificidad en la interacción de especie vegetal-elicitor, lo que implica que debe seleccionarse el tipo de elicitor para cada cultivo, el momento de agregarlo y la concentración para obtener la mejor respuesta (Paniego, 1995).

En cuanto al mecanismo de elicitación se ha observado que se produjo una rápida acumulación de ácido jasmónico y su metil éster cuando suspensiones celulares de *Rauwolfia canescens* y *Eschscholtzia californica* fueron tratadas con un elicitor fúngico. Estos y otros experimentos demuestran que el metil jasmonato forma parte de la vía de transducción de señales en algunos procesos de elicitación (Roberts & Shuler, 1997).

5.2.5. Adición de precursores

Es posible incrementar la biosíntesis de un metabolito específico incorporando al cultivo un precursor de su vía sintética (Di Cosmo & Towers, 1984). Por ejemplo, adicionando aminoácidos se puede estimular la síntesis de alcaloides del tropano e indólicos (Di Cosmo & Misawa, 1995); el agregado de colesterol duplica la producción de diosgenina por cultivos de *Dioscorea deltoidea* y la productividad en serotonina de *Peganum harmala* se centuplica por el agregado de triptamina (Fowler & Stafford, 1992).

Para usar precursores se debe considerar el tiempo de adición al cultivo, su toxicidad y costo. Además es importante mencionar que la utilización de precursores distantes del producto en la vía metabólica puede tener pequeño o nulo efecto en el rendimiento final (Ertola *et al.*, 1994).

5.2.6. Biotransformaciones

Las células vegetales en cultivo *in vitro* pueden biotransformar un determinado sustrato en un producto deseable. Los compuestos químicos que se transforman son variables e incluyen alcaloides, esteroides, cumarinas y terpenoides que pueden ser oxidados, reducidos, metilados, acetilados y/o esterificados, entre otras reacciones. Los productos no necesariamente tienen que ser los intermediarios naturales en el metabolismo vegetal (Williams & Mavituna, 1992).

Las biotransformaciones por cultivo de tejidos vegetales son procesos comercialmente muy prometedores, pero lo costoso de algunos precursores limita su aplicación. Resultan atractivos sobre todo si la transformación no puede realizarse por síntesis química o por microorganismos (Williams & Mavituna, 1992; Di Cosmo & Misawa, 1995).

Algunos ejemplos de biotransformaciones lo constituyen la producción de arbutina (agente depigmentante de la piel) resultante de la transformación de hidroquinona por células de *Catharanthus roseus* en medio líquido (Yokoyama & Yanagi, 1991), la producción de L-DOPA utilizando L-tirosina por células de *Mucuna pruriens* inmovilizadas en alginato y la hidroxilación de digitoxigenina a periplogenina por células inmovilizadas de *Daucus carota* (Williams & Mavituna, 1992).

5.2.7. Manipulación genética: ingeniería metabólica

La ingeniería metabólica se presenta como una estrategia promisorio para la producción de metabolitos elaborados por plantas difíciles de cultivar o de distribución geográfica restringida, como así también para sustancias que se producen en bajas concentraciones. En estos casos la ingeniería genética se utiliza para introducir un gen clave de la vía biosintética de interés en la especie en estudio (Verpoorte *et al.*, 1998).

La metodología usada para incrementar la producción de metabolitos puede consistir en inducir la sobreexpresión de determinados genes o en bloquear vías metabólicas secundarias no deseadas mediante tecnología antisentido. Sin embargo estas técnicas no siempre aumentan el contenido de principios activos debido a que ello depende de regulaciones en toda la vía metabólica (Giulietti & Ertola, 1999).

La ingeniería metabólica ha sido aplicada para modificar el color de las flores (Verpoorte *et al.*, 1998), mejorar la calidad nutricional del arroz que biosintetice provitamina A (Ye *et al.*, 2000) y producir alcaloides del tropano (Robins *et al.*, 1994), entre otros usos.

6.- CYNARA SPP.

6.1 INTRODUCCIÓN

Cynara scolymus L. pertenece a la familia Asteraceae-Cardueae (Wiklund 1992). Es probablemente nativa del norte de África o del sudoeste de Europa.

Existe una controversia taxonómica respecto de las especies que integran el género *Cynara*. Linnaeus (1753) clasificó a *C. cardunculus* y *C. scolymus* como dos especies diferentes del género *Cynara*, mientras que Wiklund (1992) considera que el cardo y el alcaucil son cultivares de la misma subespecie (*C. cardunculus flavescens*) y Rottenberg & Zohary (1996) sostienen que el alcaucil, el cardo silvestre y el cardo cultivado constituyen una especie única: *C. cardunculus* L.

Varios estudios botánicos han sostenido que tanto el cardo como el alcaucil derivan de un antepasado común: *Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori (= *C. sylvestris* Lamk) y que dichas especies se fueron diferenciando por selección de los horticultores. El alcaucil habría resultado de la elección de las plantas con capítulos más grandes y tiernos y el cardo por selección de las plantas de peciolo más anchos y gruesos (Avila, 1987).

6.2. CYNARA SCOLYMUS L.

El alcaucil es una planta perenne ampliamente distribuida en las regiones del Mediterráneo, siendo también muy cultivada en Estados Unidos, Argentina y Nueva Zelanda (Ordas *et al.*, 1990). Normalmente se propaga vegetativamente, aunque en los comienzos el cultivo fue por semillas (Ancora, 1986).

La parte comestible del alcaucil es la cabeza floral inmadura y la porción de tallo inmediatamente por debajo. Después de la papa, es considerado uno de los productos hortícolas con mayor valor energético, pues es rico en azúcares y proteínas y tiene alto contenido de calcio, magnesio e hierro. Por otra parte, el resto de la parte aérea de la planta, con alto valor nutritivo, puede utilizarse como alimento animal (Ancora, 1986).

Además de ser una planta alimenticia para el hombre, desde los comienzos de la era cristiana se reconocen en diversos órganos de esta hortaliza distintas propiedades terapéuticas, atribuyéndole acción diurética, de activación de la secreción biliar, con efecto sobre el metabolismo del colesterol y poseedora de propiedades antirreumáticas (Avila, 1987). Los principios activos de mayor aplicación clínica del alcaucil, son la *cinarina* (ácido 1,5-dicafeoilquinico) (Panizzi y Scarpati, 1954; Preziosi & Localzo, 1956; Cordeiro *et al.*, 1998) y varios flavonoides y poliacetilenos (Hammouda *et al.*, 1993; El-Negoumy *et al.*, 1987).

El resultado de investigaciones clínicas actuales muestran la eficacia y seguridad de usar extractos de hojas de alcaucil en el tratamiento de las disfunciones hepato-biliares y digestivas, atribuyendo el efecto hepatoprotector e hipolipidémico a los flavonoides y al ácido cafeoilquínico presentes en el alcaucil (Wegener & Fintelmann, 1999). Por otro lado Gebhardt (1998) demuestra que esos extractos inhiben la biosíntesis del colesterol en los cultivos de hepatocitos de rata y que el efecto no se debe a los ácidos cafeico ni dicafeoilquínico como había sido establecido por varios autores, sino a los flavonoides luteolina y cinarosida.

El alcaucil puede ser propagado satisfactoriamente por cultivo de meristemas y es razonable asumir que en el futuro la micropropagación puede sustituir a los métodos tradicionales de propagación, si se logra con costos adecuados. Esto permitiría mayores rendimientos con ventajas sanitarias y económicas derivadas de la reducción de los tratamientos químicos actualmente necesarios para controlar las plagas que lo atacan. Además, observaciones agronómicas han demostrado que las plantas micropropagadas son superiores en vigor y en rendimiento de número de cabezas florales que las controles. (Harbaoui *et al.*, 1982; Pecaut *et al.*, 1983).

6.2.1. Características botánicas y sistemática varietal

Los cultivares actuales del alcaucil tienen una gran heterogeneidad, debido al alto porcentaje de alogamia. Además es común observar en esta hortaliza la manifestación de mutaciones de yema y variantes inestables.

El número de cultivares ha aumentado paulatinamente y resulta muy difícil clasificarlos, existiendo discrepancias entre distintos autores sobre el modo de hacerlo. Es frecuente la sinonimia, debido probablemente al intercambio de material de propagación entre diferentes regiones y países a través del tiempo.

En el campo experimental del *Cynar Studi Centre en Polignano a Mare* (Bari, Italia) se mantiene el germoplasma de 115 cultivares recolectados en todo el mundo, de los cuales 80 son de procedencia italiana, 21 de Francia, 2 de Argentina (Blanco y Ñato) y el resto de Egipto, Turquía, Estados Unidos, España, Túnez e Israel (Ancora, 1986; Avila, 1987)

Para realizar esta clasificación de cultivares existentes en el mundo se tuvieron en cuenta los caracteres morfológicos de la planta (altura, porte, aptitud gemífera), de las hojas (color, presencia de espinas, dimensiones, heterofilia) y del capítulo principal (forma, compactibilidad, dimensiones, longitud y espesor del pedúnculo y color, forma, espinas y dimensiones de las brácteas). Además se consideraron caracteres productivos

como el número de capítulos por planta, el peso y precocidad y la duración del ciclo productivo (Avila, 1987).

6.2.2. Aspectos económicos

La producción mundial de alcauciles en 1993/1994 fue de 1.300.000 toneladas. Los países productores son: Italia, España, Francia, Argelia, Marruecos, Egipto, Turquía, Túnez, Estados Unidos y Grecia (Rodríguez *et al.*, 1996). Argentina ocupaba el quinto lugar con un volumen de 78.000 toneladas (Pécaut & Foury, 1992), pero el área cultivada de alcaucil ha disminuido en los últimos años, con solamente 6000 hectáreas sembradas en 1996 (Rodríguez *et al.*, 1996). Ello puede atribuirse a los inconvenientes encontrados en el arraigo de los hijuelos de diferentes cultivares, a los problemas sanitarios de la especie y a que la producción sólo se comercializa en el mercado interno.

En Argentina se realiza la explotación agrícola de los cultivares Ñato, Violeta, Blanco Temprano y Tardío, Francés Precoz y Tardío, Precoz Italiano, Green Globe y Platense. Casi el 80 % del total cultivado en nuestro país se encuentra en el cinturón hortícola de La Plata, seguida por el de Rosario (Avila, 1987).

6.3. CULTIVO IN VITRO DE CYNARA SPP.

6.3.1. Micropropagación

El primer registro sobre el cultivo *in vitro* de alcaucil fue publicado por Toponi (1960), quien reporta el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la proliferación celular y producción de callos a partir de brácteas (Ancora, 1986). Desde ese momento se han desarrollado varios protocolos de micropropagación de cultivares europeos de alcaucil (Ancora *et al.*, 1981; Debergh *et al.*, 1981; Moncousin, 1981; Pecaut *et al.*, 1983; Bigot & Foury, 1984; Rossi & De Paoli, 1992; Kanakis & Demetriou, 1993; Morzadec & Hourmant, 1997) y del cultivar Green Globe (Lauzer & Vieth, 1990). Todos los autores coinciden en indicar que la rizogénesis es la etapa crítica del cultivo *in vitro* del alcaucil. Recientemente se ha desarrollado en nuestro laboratorio de la UNLu una metodología para lograr la micropropagación del cultivar Francés Precoz de *Cynara scolymus* L. La adición de ciclodextrinas al medio de enraizamiento permitió triplicar el porcentaje de enraizamiento y duplicar el número de raíces diferenciadas por explanto que se producían en el medio de cultivo con auxinas y sin ciclodextrinas (Brutti *et al.*, 2000).

6.3.2. Callos y suspensiones

A partir de segmentos de hipocótilos y de hojas de *C. cardunculus* L., Figueredo *et al.* (1987) obtuvieron callos friables que se utilizaron para establecer suspensiones celulares en el medio B5 de Gamborg (1968) suplementado con 2,4-D y BA y en el medio TNO₃ (Behrends & Mateles, 1975) con 2,4-D y cinetina. Se obtuvieron diferentes patrones de crecimiento en estos dos medios con un buen desarrollo de la biomasa en el B5, en donde el tiempo de duplicación fue de 33,6 horas.

La formación de callos de alcaucil se ha realizado a partir de varios tejidos y bajo diferentes condiciones de cultivo. El cultivo de brácteas en un medio con 2,4-D y agua de coco produjo una gran masa de callos, mientras que el AIA no fue efectivo si se usaba sólo, pero resultó activo cuando se suplementó con cinetina (Toponi, 1960). Al cultivar el receptáculo en un medio con 2,4-D y BA o Zea también se promovió una profusa formación de callos (Devos *et al.*, 1975). Ordas *et al.* (1991) obtuvieron callos y lograron establecer suspensiones celulares de *Cynara scolymus* L. cv. Romanesco en medio MS con ANA y BA. De las suspensiones aislaron protoplastos que formaron callos, pero no lograron generar plántulas.

6.4. PEPTIDASAS DE *CYNARA SPP.*

De las 8 especies diferentes del género *Cynara* clasificadas en la revisión taxonómica realizada por Wiklund (1992), la especie más utilizada para fabricar quesos es *C. cardunculus* L. (cardo silvestre), aunque en España se usan flores de *C. humilis* en la manufactura de varios quesos (Serena, Torta del Casar, Pedroches, Grazalema). Cordeiro *et al.* (1994a) cita que otros miembros de la familia Asteraceae, como *C. scolymus* L., *Centaurea calcitrapa*, *Sylibum marianum* y *Onopordum turcicum* también poseen actividad coagulante.

6.4.1. Peptidasas de *Cynara cardunculus* L.

Los extractos acuosos de las flores de cardo son tradicionalmente utilizadas en Portugal para hacer quesos de oveja tales como Serra, Serpa, Azeitão y Castelo Branco, con características organolépticas diferentes de los que se obtienen con quimosina bovina o reninas microbianas. Estos quesos presentan características distintivas en aspecto y sabor dependiendo de la región en la que son elaborados y a las condiciones de recolección y almacenamiento de las flores y de maduración del queso. Así, el queso Serra es blando, cremoso y presenta un sabor débilmente amargo y picante, mientras que el queso Serpa presenta mayor firmeza y un fuerte sabor (Cordeiro *et al.*, 1998). Las propiedades reológicas de los coágulos producidos por estos extractos sobre diferentes

tipos de leche fueron investigadas por Sá y Barbosa (1972), quienes concluyen que los extractos de flores de cardo son sustitutos satisfactorios del cuajo bovino en la preparación de quesos blandos. La actividad coagulante de los extractos florales es debida a enzimas proteolíticas presentes en los pistilos, descritas por Faro *et al.* (1987) como peptidasas ácidas. Estudios posteriores revelaron la heterogeneidad de estas enzimas. Por un lado, Heimgartner *et al.* (1990) purifican y caracterizan parcialmente tres peptidasas aspárticas heterodiméricas coagulantes de la leche: cynarasas 1, 2 y 3 (actualmente llamadas ciprosinas) en extractos acuosos a pH 8,3 de flores secadas al aire. En estas condiciones se previene la autohidrólisis durante la purificación (Cordeiro *et al.*, 1998). Por otro lado, Faro *et al.* (1995) y Veríssimo *et al.* (1995, 1996) aíslan dos nuevas peptidasas aspárticas de estigmas frescos (cardosinas A y B) al realizar la extracción a pH 3,0. A este pH las enzimas están muy activas y es posible que se produzca autohidrólisis (Cordeiro *et al.*, 1998).

6.4.1.1. *Cynarasas o Ciprosinas*

Las ciprosinas 1, 2 y 3 descritas por Heimgartner tienen una masa molecular nativa de 49-50 kDa y cada peptidasa está formada por una subunidad mayor y otra menor.

Las 3 ciprosinas presentan características comunes y diferenciales. Tienen en común el hecho de ser endopeptidasas glicosiladas (N ligado a glicanos de alta manosa), exhibir máxima actividad proteolítica a pH 5,1 (usando caseína como sustrato), cortar preferencialmente enlaces peptídicos entre residuos de aminoácidos con cadenas hidrofóbicas y ser fuertemente inhibidas por pepstatina A. Entre las principales características diferenciales (*Tabla 7*) puede señalarse que son eluidas con distintas concentraciones de cloruro de sodio en las columnas de intercambio iónico (lo que hace presumir diferentes valores de pI), presentan subunidades de tamaños ligeramente diferentes, difieren en el patrón de glicosilación y muestran notables diferencias en la actividad proteolítica específica y coagulante de la leche.

Al comparar la actividad coagulante de la leche y la actividad proteolítica de las ciprosinas con las de la quimosina, Cordeiro *et al.* (1992) observan que la ciprosina 3 es la que presenta mayor actividad proteolítica específica y coagulante sobre leche de vaca (*Tabla 7*) y que ella es superior a la de quimosina.

Tabla 7.- Características diferenciales de las cipsosinas (adaptado de Heimgartner *et al.*, 1990, Cordeiro *et al.*, 1992)

	[NaCl] en intercambi o iónico (M)	PM PAGE (kDa)	PM Gel Filtración (kDa)	PM subunida d mayor (kDa)	PM subunidad menor (kDa)	Actividad proteolític a relativa (%)	Actividad coagulante relativa (%)
Ciprosina 1	0,2	49	41	32.5 ± 1.0	16.5 ± 0,5	10,1	14.3
Ciprosina 2	0,3	49	42	33.5 ± 1.0	16.5 ± 0,5	9.5	7.4
Ciprosina 3	0,5	49	45	35.5 ± 1.0	13.5 ± 0,5	100	100

La cipsosina 3 también muestra una actividad coagulante de la leche de oveja marcadamente mayor que la quimosina, presentando más especificidad hidrolítica sobre estas caseínas que sobre las de vaca. En el último sustrato hidroliza, además de la κ -caseína, las α_{s-1} -, β - y γ - caseínas, produciendo al menos 5 nuevos péptidos. Estos péptidos serían los responsables del marcado sabor amargo de los quesos obtenidos con leche de vaca y permite explicar por qué en la manufactura de quesos típicos portugueses se utiliza empíricamente leche de oveja en lugar de leche de vaca (Cordeiro *et al.*, 1992).

Estudios posteriores de Cordeiro *et al.* (1994a, 1998) revelan que las cipsosinas 2 y 3, aparentemente puras, descritas por Heimgartner presentan microheterogeneidad. Así, la cipsosina 3 puede ser separada en 3 isoenzimas con puntos isoeléctricos 3,85 (3α), 4,00 (3β) y 4,15 (3γ) al realizar una electroforesis bidimensional (IEF y SDS-PAGE).

La acumulación órganoespecífica de las cipsosinas ha sido estudiada en yemas florales y en flores de distinto grado de desarrollo, en estilos, corolas, hojas y semillas (Cordeiro *et al.*, 1994a). La inmunocoloración del Western blot realizado con anticuerpos contra la subunidad mayor de las cipsosinas 1, 2 y 3 revela baja cantidad de cipsosinas en flores muy jóvenes, con un incremento en los estados posteriores de desarrollo y acumulación de estas enzimas en las partes violetas de estilos y corolas. La presencia de la subunidad mayor de cipsosina 3 se detecta al comienzo del desarrollo floral, mientras que las subunidades mayores de cipsosinas 1 y 2 se visualizan en estadios más avanzados. Estos autores no detectan la enzima en hojas, nervaduras y semillas. Si bien la concentración de proteínas totales no muestra diferencias significativas durante el desarrollo floral, en el SDS-PAGE se visualiza un patrón dinámico de dichas proteínas. La

aplicación de técnicas inmunohistológicas, usando anticuerpos contra la subunidad mayor de cipsosina 3, muestra que la enzima se localiza en la capa de células epidérmicas de los estilos.

Con la finalidad de estudiar la expresión y regulación del gen de la cipsosina, Cordeiro *et al.* (1994b) aislaron el mRNA de yemas florales de *C. cardunculus* L. y prepararon una librería de cADN de la que seleccionaron los clones que reaccionaron contra el anticuerpo contra la subunidad mayor de cipsosina 3. Usando uno de estos clones (*cypro 1s*) como sonda en un análisis Northern blot, observaron un incremento de la intensidad de hibridación desde los estadios tempranos de las flores hasta botones florales de 4 cm. En las flores de 5 cm y en los estilos de dichas flores no visualizaron señales de hibridación, lo que indica que la síntesis del mRNA que codifica la cipsosina comienza en estadios tempranos del desarrollo floral y termina en la flor madura.

Luego Cordeiro *et al.* (1998) aislaron y caracterizaron dos cADN que codifican la cipsosina (*cypro1s* y *cypro11*). El *cypro1s* codifica para 505 aminoácidos que producen una proteína madura, la cipsosina A, de 440 aminoácidos. El *cypro11* codifica los 509 aminoácidos que generan la cipsosina B, de 441 aminoácidos. Las secuencias deducidas de aminoácidos para cipsosina A y cipsosina B presentan una homología del 92 %.

Además, la secuencia de aminoácidos codificada por *cypro 1s* muestra un 95 % de homología con la aspartil peptidasa de cebada (HvAP; Cordeiro *et al.*, 1994b) y un 73 % con la secuencia de la peptidasa aspártica de arroz (OsAP; Asakura *et al.*, 1997). Si se omite la secuencia de aminoácidos de la región específica de plantas (PSI), la homología de la cipsosina con las peptidasas aspárticas de mamíferos resulta relativamente alta: 92 % con catepsina D humana y 85 % con quimosina bovina, teniendo mayor homología aún con las APs de plantas: 98,8 % con HvAP y 94,1% con OsAP (Cordeiro *et al.*, 1994b). El PSI se conserva en un 43 % en las tres enzimas vegetales mencionadas. El hecho de que durante la evolución esta región haya divergido en un grado mayor que las regiones N- y C- terminales parece indicar que es de menor importancia en la estructura y función de estas enzimas, aunque en ella se conservan los seis residuos de cisteína que forman puentes disulfuro. Esto podría indicar que se mantiene la estructura terciaria de esa región.

Además, el cADN codificante del precursor de la cipsosina fue expresado en la levadura *Pichia pastoris* y la cipsosina recombinante expresada en el medio de cultivo presenta microheterogeneidad con cadenas pesadas glicosiladas de 34 o 32 kDa y cadenas livianas con pesos moleculares entre 14 y 18 kDa. Esta heterogeneidad se produce por la escisión de muchos, pero no de todos, los residuos del PSI (White *et al.*, 1999).

6.4.1.2. *Cardosinas*

Las enzimas obtenidas de estigmas de flores frescas de cardo por extracción a pH 3 han sido denominadas cardosina A y cardosina B (Faro *et al.*, 1995; Veríssimo *et al.*, 1995,1996). La extracción a bajo pH elimina gran parte de las proteínas y produce una preparación enzimática con alta actividad específica (5 veces mayor que la obtenida por extracción a pH 7,6). Esta extracción a bajo pH les permite realizar la purificación en sólo 2 pasos:

- 1.- filtración en gel (Superdex 200 o Superosa 6) que elimina fenoles y pigmentos, obteniéndose un único pico con actividad proteolítica, y

- 2.- HPLC de intercambio iónico (MonoQ) del pico anterior, que permite obtener dos picos proteolíticamente activos (cardosinas A y B). Cada uno de ellos presentan en SDS-PAGE dos bandas de cardosina A (31 y 15 kDa) y 2 bandas de cardosina B (34 y 14 kDa).

Las bandas de 34, 31 y 15 kDa se tiñen con reactivo de Schiff, lo que indica que están glicosiladas. Esto también lo comprueban realizando el SDS-PAGE después de deglicosilar; allí la cardosina A presenta dos cadenas de 28 y 14 kDa y la cardosina B muestra cadenas de 30 y 14 kDa. La diferencia en el peso molecular está dada por las cadenas glicosídicas presentes en las dos subunidades de cardosina A y de la subunidad mayor de cardosina B.

Las cardosinas son activas entre pH 2 y 7, con máxima actividad a pH 5,0-5,5. Son inhibidas por pepstatina A y diazoacetil metil éster, indicando que pertenecen al grupo de las peptidasas aspárticas. Aunque presentan actividad a temperaturas superiores a los 65°C son relativamente inestables a altas temperaturas (Faro *et al.*, 1995; Veríssimo *et al.*, 1996). Además son estables en presencia de urea $\geq 6M$, sugiriendo que existe una fuerte interacción entre las dos cadenas de cada cardosina (Veríssimo *et al.*, 1996). Barros *et al.* (1992) determinaron que la peptidasa extraída a pH 3 es muy estable en sistemas bifásicos acuoso-orgánicos, principalmente con n-hexano y que puede ser usada para producir dipéptidos con el enlace Phe-Met.

La actividad proteolítica del extracto ácido (pH 3,0) de *C. cardunculus* L. sobre la insulina oxidada y la κ -caseína bovina fue estudiada por Faro *et al.* (1992) y Macedo (1993). El clivaje sobre κ -caseína se realiza en la unión Phe105-Met106, al igual que el producido por otras peptidasas ácidas tales como quimosina y pepsina. Al comparar los sitios de clivaje de varias peptidasas ácidas sobre la cadena B de insulina oxidada, observan que la cardosina A de *C. cardunculus* L. tiene mayor especificidad, mientras que la cardosina B produce mayor cantidad de péptidos, es mucho menos selectiva y

rompe los enlaces peptídicos a mayor velocidad que la cardosina A (Veríssimo *et al.*, 1995).

El análisis por Western blotting usando antisuero contra la cadena de 31 kDa (Faro *et al.*, 1995; Veríssimo *et al.*, 1996) muestra que no hay inmunoidentidad entre cardosina A y B. Esto se confirma con el análisis de los N-terminales y de la secuencia interna de aminoácidos de cada una de las cadenas de las cardosinas, que demuestran que si bien ambas son similares, no son idénticas y difieren también de las ciprosinas.

Las diferencias en las secuencias de aminoácidos y en las reacciones inmunológicas indican que la cardosina A, la cardosina B y las ciprosinas son productos de genes diferentes (Veríssimo *et al.*, 1996).

La secuencia de aminoácidos deducida del cADN de la cardosina A muestra un 77 % de similitud con ciprosina1, 75 % con HvAP, 70 % con OsAP y 40 % con catepsina D humana (Faro *et al.*, 1998).

La especificidad y los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m de esta enzima sobre κ -caseína bovina fueron determinados por Macedo *et al.* (1993), quienes hallaron que si bien el coeficiente proteolítico k_{cat}/K_m es del mismo orden de magnitud que los obtenidos con otras enzimas coagulantes de la leche, el valor de K_m es significativamente menor que el de quimosina y pepsina, lo que refleja la mayor afinidad de la peptidasa de cardo por la κ -caseína (Tabla 8).

Tabla 8.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis del enlace Phe105-Met106 de la κ -caseína por cardosina, quimosina y pepsina A.

Enzima	pH	K_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	Sustrato	Cita
Cardosina	6,4	1,04	0,16	6,5	κ -caseína intacta	Macedo <i>et al.</i> (1993)
Quimosina	6,6	93,3	31,8	2,9	κ -caseína B	Vreesman <i>et al.</i> (1985)
Quimosina	6,2	68,7	4,9	1,4	κ -caseína B	Carles y Martin (1985)
Pepsina A	6,2	45,6	1,9	2,4	κ -caseína B	Carles y Martin (1985)

Los parámetros cinéticos de la hidrólisis del hexapéptido cromofórico Leu-Ser-Phe(NO₂)-Nle-Ala-Leu-oMe muestran similitud entre cardosina A y quimosina y entre cardosina B y pepsina porcina (Tabla 9). Lo mismo observan Veríssimo *et al.* (1996) al estudiar las constantes cinéticas de otros dos péptidos sintéticos. Esto lleva a los autores a afirmar que la composición de la “renina de cardo” recuerda a la “renina bovina”.

El aislamiento y caracterización de enzimas del tipo cardosina de otras dos especies de *Cynara*, *C. humilis* y *C. scolymus* L. y su comparación con las cardosinas fue

estudiado por Veríssimo *et al.* (1998). En el extracto (pH 3) purificado de los pistilos de ambas especies obtienen peptidasas aspárticas que en el SDS-PAGE muestran similitud con las cardosinas pero el estudio de los parámetros cinéticos de las APs de las tres especies de *Cynara* revela diferencias que sugieren que probablemente exista disparidad en los sitios activos.

Tabla 9.- Parámetros cinéticos de la hidrólisis del péptido sintético Leu-Ser-Phe(NO₂)-Nle-Ala-Leu-oMe por cardosina A y B, quimosina y pepsina (adaptado de Veríssimo *et al.*, 1995; Faro *et al.*, 1995; Martin P, 1984)

Enzima	Km (mM)	Kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Cardosina A	1,08	23,6	21,87
Quimosina	0,98	25,1	25,6
Cardosina B	0,08	85,5	1057
Pepsina	0,03	54	1640

6.4.2. Localización celular e hipótesis sobre el rol fisiológico

Las cardosinas A y B se expresan específicamente en la parte femenina de las flores (pistilo) desde estadios tempranos del desarrollo floral hasta estadios senescentes. La localización celular de cardosina A fue realizada por Ramalho-Santos *et al.* (1997) utilizando técnicas inmunohistoquímicas, observando que se acumula principalmente en vacuolas que almacenan proteínas de las papilas estigmáticas y en las células epidérmicas de la parte superior del estigma. En mucho menor cantidad se localizan en las vacuolas de las células de la epidermis de los estilos. Por otro lado, la cardosina B se encuentra en la matriz extracelular de los estigmas (Faro *et al.*, 1998). Esta localización diferencial parece indicar que las dos cardosinas cumplirían diferentes funciones en la flor, aunque no excluyen que estén involucradas en el mismo proceso fisiológico.

Ramalho-Santos *et al.* (1997) proponen que la cardosina A tendría una función primaria en la interacción de las flores de *C. cardunculus* L. con patógenos y/o con el polen y una función secundaria en la senescencia anual de la flor. El rol en mecanismos de reconocimiento del polen es avalado por la identificación de la tríada Arg-Gly-Asp (RGD) en la secuencia de aminoácidos deducida del cADN y su interacción con una proteína de 100 kDa del polen (Faro *et al.*, 1999), como se expuso en el apartado 3.3.

Por otro lado, Cordeiro *et al.* (1994a) describen que las ciproquinas se acumulan en la capa epidérmica de los estilos, pero no proporcionan datos de su localización subcelular.

6.4.3. Genes

Ciproquinas. Al analizar los datos mostrados en la *Tabla 7*, Heimgartner *et al.* (1990) postularon que las tres ciproquinas son los productos de diferentes procesamientos de un precursor común.

Por otro lado, Cordeiro *et al.* (1994a) proponen el siguiente modelo para explicar la microheterogeneidad de la población de ciproquinas: a) al menos tres genes codifican para los zimógenos de ciproquina, b) la remoción del propeptido N-terminal produce las tres ciproquinas maduras, c) la hidrólisis de las cadenas peptídicas, con o sin remoción de pequeños péptidos o por cortes de la cadena en diferentes posiciones, produce tres ciproquinas heterodiméricas y d) el procesamiento proteolítico de las enzimas maduras produciría isoenzimas de cada una de ellas.

Los datos anteriores permiten suponer a Cordeiro *et al.* (1994b) que todas las peptidasas aspárticas derivan de la misma proteína ancestral y que la región específica de plantas (PSI) fue introducida durante la evolución por un proceso de intercambio intrón-exón o por la inserción de un nuevo exón. Además, la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción y el patrón de hibridización en el Southern blot que muestra varias bandas lleva a estos autores a sugerir que los genes de ciproquina están organizados como una familia multigénica y que la simultánea expresión de genes distintos podría explicar la heterogeneidad del producto génico.

Cardosinas. Veríssimo *et al.* (1998) sugieren que la cardosina A podría ser una forma ancestral de las cardosinas y que la cardosina B pudo haber surgido por duplicación génica a lo largo de la evolución, representando una especialización para un rol particular en el pistilo vinculado con la reproducción sexual.

6.5. PRODUCCIÓN DE PEPTIDASAS POR CULTIVO *IN VITRO* DE *CYNARA CARDUNCULUS* L.

La producción de peptidasas por suspensiones celulares de *Cynara cardunculus* L. ha sido estudiada (Cordeiro *et al.*, 1993) en los medios B5 de Gamborg (1968) y TNO₃ de Behrend & Mateles (1975), encontrándose que el primer medio fue adecuado para la producción de biomasa, mientras que el segundo promovió la síntesis de peptidasas. Las peptidasas obtenidas presentaron una alta heterogeneidad y propiedades diferentes a las cipsosinas extraídas de flores, ya que mientras estas últimas son inhibidas por pepstatina, las producidas en cultivos celulares resultaron sensibles a inhibidores de peptidasas cisteínicas (cistatina y leupeptina). Además, los Western y Northern blots mostraron que las cipsosinas específicas de flores no fueron expresadas en las condiciones de cultivo de esas suspensiones celulares.

El crecimiento de suspensiones celulares de *C. cardunculus* L. y la producción de peptidasas y fenoles fue estudiado por Lima Costa *et al.* (1996). Observaron que la síntesis de peptidasas está asociada a la fase de crecimiento exponencial, lo que indica su vinculación al metabolismo primario. Los cultivos en fermentador con limitada concentración de sacarosa presentaron mayor productividad y estabilidad que los cultivos en "batch". No observaron la producción de fenoles en la fase estacionaria de los cultivos de *C. cardunculus* L. en fermentador, en tanto que ellos se acumularon en los cultivos en "batch". El bajo contenido de fenoles sugiere a los autores que las condiciones del fermentador no producen estrés celular y por lo tanto el metabolismo secundario estaría reprimido, favoreciendo el metabolismo primario y la expresión de las peptidasas. En este trabajo se midió la actividad proteolítica total sobre azocaseína y las peptidasas producidas no fueron caracterizadas.

7.- OBJETIVOS

A pesar de que la fuente tradicional de enzimas coagulantes de la leche para la fabricación de quesos ha sido el estómago de mamíferos lactantes, motivos económicos, nutricionales, culturales, religiosos y/o de disponibilidad de estómagos han hecho necesaria la búsqueda de sustitutos de origen vegetal, fúngico y bacteriano para la elaboración de quesos.

Respecto a las enzimas de origen vegetal, sólo un reducido número de peptidasas han sido aisladas, caracterizadas y purificadas a partir de las plantas superiores. En este sentido es necesario destacar que sólo el uno por mil de las especies conocidas se han analizado con respecto a su contenido y perfil de peptidasas. En plantas que crecen en nuestro país se han aislado y caracterizado peptidasas serínicas y cisteínicas en algunas especies de *Asclepiadaceae* (Arribére *et al.*, 1998, 1999; Priolo *et al.* 2000), *Bromeliaceae* (López *et al.*, 2000; Natalucci *et al.*, 1996; Pardo *et al.*, 2000; Priolo *et al.*, 1991) y *Moraceae* (López *et al.*, 1995). En cuanto a las peptidasas aspárticas, sólo se ha estudiado una enzima producida por discos de papa sometidos a estrés abiótico (Guevara *et al.*, 1999), no existiendo otros antecedentes de estudios sobre fitoproteasas aspárticas y ninguno sobre enzimas de plantas que coagulen la leche.

En este trabajo de tesis se propone estudiar las peptidasas que poseen acción coagulante de la leche y que se encuentran presentes en *Cynara scolymus* L. (“alcaucil”, “alcachofa”), tanto en la planta cultivada a campo como en cultivos *in vitro*.

Para lograr este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar la actividad proteolítica y coagulante de la leche de los extractos crudos de las diferentes partes del alcaucil.
- Caracterizar la preparación enzimática cruda que presente las mejores condiciones caseinolíticas, de acuerdo a los resultados del ítem anterior.
- Purificar dicho extracto crudo y caracterizar las fracciones purificadas.
- Inducir la expresión *in vitro* de peptidasas coagulantes de la leche de *Cynara scolymus* L. mediante el agregado de diferentes reguladores de crecimiento.
- Realizar estudios comparativos entre las peptidasas coagulantes de la leche obtenidas de las plantas crecidas a campo y de las provenientes de cultivos *in vitro*.
- Elaborar y evaluar quesos con las enzimas estudiadas.

8.- MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. MATERIAL VEGETAL

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

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

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

8.1.2. Cultivares estudiados

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

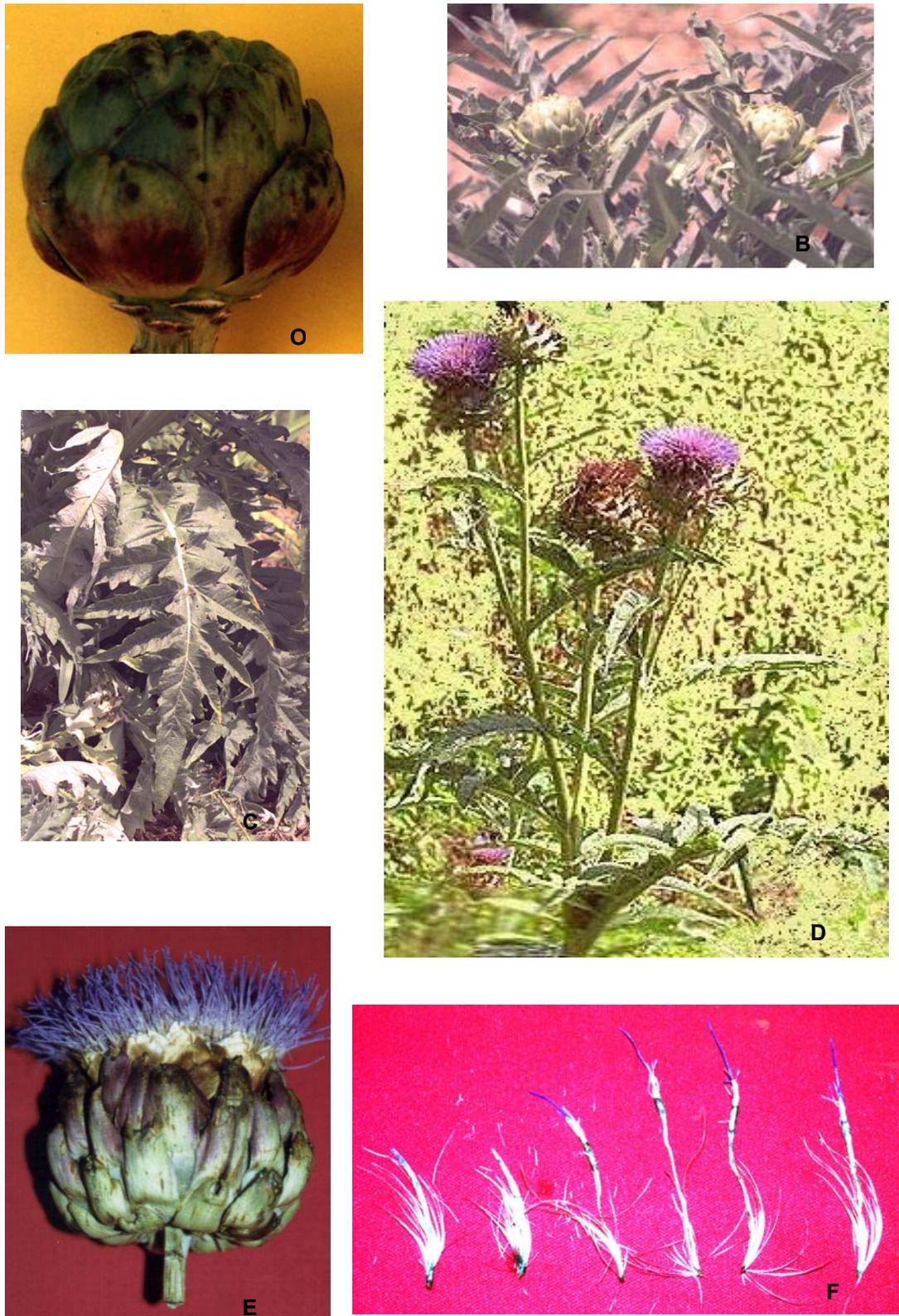


Figura 5.- Plantas (B, D) y diferentes órganos de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe:
A) capítulo inmaduro; C) hojas; E) inflorescencia; F) flores maduras.

8.1.3.- Desinfección del material vegetal

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

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

- las yemas apicales de *Cynara scolymus* L. cv. Francés Precoz fueron esterilizadas con HgCl_2 (5 g l^{-1}) durante 5 minutos y NaClO al 17 % (1 g l^{-1} de cloro activo) durante 10 minutos. Después de enjuagar 3 veces con agua destilada estéril, las yemas desinfectadas fueron mantenidas en una solución antioxidante compuesta de partes iguales de ácido ascórbico (100 mg l^{-1}) y ácido cítrico (150 mg l^{-1}).
- las brácteas provenientes de capítulos inmaduros de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe se esterilizaron con solución de HgCl_2 (5 g l^{-1}) durante 5 minutos, NaClO al 20 % por 20 minutos y finalmente fueron enjuagadas 3 veces con agua estéril. Las secciones de brácteas se mantuvieron sumergidas en la solución antioxidante mencionada anteriormente.

8.2. CULTIVOS *IN VITRO* INDIFERENCIADOS: CALLOS

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

8.2.1. Cultivar Francés Precoz

8.2.1.1. Establecimiento

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

8.2.1.2. Efecto de ANA y de BA

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

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

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

8.2.2. Cultivar Green Globe

8.2.2.1. Establecimiento

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

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

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

ANA (mg l ⁻¹)	BA (mg l ⁻¹)		
	0,1	0,5	1
5	Medio 1	Medio 2	Medio 3
10	Medio 4	Medio 5	Medio 6

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

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

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

8.2.2.3. Efecto del ácido giberélico (GA₃) y del ácido abscísico (ABA)

Callos de *C. scolymus* L. cv. Green Globe crecidos durante ocho generaciones en el medio de cultivo MS con vitaminas de Gamborg y ANA (10 mg l⁻¹): BA (1 mg l⁻¹) [medio 6] se cultivaron en el mismo medio pero suplementado con GA₃ y ABA como reguladores del crecimiento en las concentraciones especificadas en la *Tabla 11*. Como recipientes de cultivo se utilizaron tubos (base plana) de 55 ml conteniendo 15 ml de medio y el cultivo se realizó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Se estudió el efecto de estos medios sobre el crecimiento de los callos (peso fresco) y la producción de peptidasas (actividad proteolítica y coagulante de la leche) en los extractos celulares crudos de los callos cultivados durante 30 días.

Tabla 11.- Concentraciones de GA₃ y ABA utilizadas para evaluar su efecto sobre callos de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe.

GA ₃ (mg l ⁻¹)	ABA (mg l ⁻¹)	
	0	0,1
0	Medio 7	Medio 10
5	Medio 8	Medio 11
10	Medio 9	Medio 12

8.2.3. Análisis estadístico

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

8.3. CULTIVOS *IN VITRO* INDIFERENCIADOS: SUSPENSIONES

8.3.1. Iniciación

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

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

8.3.2. Crecimiento y producción de los cultivos en suspensión

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

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

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

8.3.3. Análisis estadístico

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

8.4. EXTRACTIVOS VEGETALES

8.4.1. Obtención de preparaciones crudas

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

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

8.4.2. Obtención de polvos acetónicos

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

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

8.5. PESO FRESCO Y PESO SECO

El peso fresco de los callos se determinó después de eliminar la humedad superficial con papel absorbente y el peso seco fue evaluado secando en estufa a 65°C hasta peso constante.

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

8.6. ACTIVIDAD COAGULANTE DE LA LECHE

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

Preparación del sustrato: se utilizó leche descremada en polvo envasada en sobres de aproximadamente 5 g (San Regim). Se pesó el contenido de un sobre y se preparó una solución al 10 % (p/v) en CaCl_2 10 mM por agregado y mezcla manual hasta obtener una preparación homogénea. La mezcla se llevó a volumen ajustando el pH en 6 y se mantuvo con agitación suave para prevenir la formación de espuma, en agitador magnético durante 30 minutos. El sustrato se mantuvo en heladera hasta su uso, pero no excediendo las 4 horas. Todo el procedimiento se realizó con el sustrato protegido de la luz con una cubierta de papel metalizado a fin de estandarizar las condiciones de preparación del sustrato.

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

8.6.1. Actividad coagulante intracelular

8.6.1.1.- Prueba en placa

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

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

8.6.1.2. Pruebas en tubo

La actividad coagulante de la leche sobre las diferentes partes de la planta fue realizada según una modificación de la técnica de Arima *et al.* (1970). En un baño de agua a 37 \pm 0,2°C se colocaron tubos con 500 μ l de los extractos crudos a los que se les adicionó 3 ml de una solución al 10 % (p/v) de leche descremada en polvo en solución de Ca Cl₂ 10 mM. Con la finalidad de visualizar mejor la formación del coágulo, se introdujo un tubo con tinta azul en el interior del tubo de reacción. El tiempo de coagulación fue determinado por observación directa de la floculación contra el tubo con colorante. La prueba fue realizada por triplicado y como control negativo se adicionó buffer a la solución de leche.

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

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

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

8.6.2.- Actividad coagulante exocelular

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

Para medir la actividad coagulante del medio exocelular de los cultivos en suspensión se utilizaron 500 μl de leche descremada a la que se le adicionaron 200 μl de medio de cultivo.

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

8.7. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

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

8.7.1. Caseína

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

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

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

8.7.2. Hemoglobina

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

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

8.7.3. Azocaseína

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

8.8. PROTEÍNAS TOTALES

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

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

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

8.9. ESTABILIDAD TÉRMICA

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

8.10. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

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

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

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

8.11. EFECTO DE ACTIVADORES E INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

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

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

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

8.12. PURIFICACIÓN DE LAS PREPARACIONES CRUDAS

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

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

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

8.12.1. Extracción con acetona

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

8.12.2. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

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

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

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

8.12.3. Adsorción con carbón activado

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

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

8.12.3.1. Caracterización espectrofotométrica UV y visible

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

8.12.4. Cromatografía de intercambio iónico

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

El volumen de elución fue de 180 ml, recogiendo fracciones de 2 ml. La velocidad de flujo fue de 45 cm³ h⁻¹ y se midieron los valores de absorbancia a 280 nm y la actividad proteolítica sobre hemoglobina a pH 4.

8.12.4.1. Extracto crudo de flor

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

8.12.4.2. Extracto de flor precipitado con sulfato de amonio

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

8.12.4.3. Extracto de flor adsorbido con carbón activado

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

8.12.5. Cromatografía de exclusión molecular

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

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

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

8.12.6. Cromatografía de afinidad

El *pool* del pico activo obtenido por cromatografía de intercambio aniónico de los extractivos de las flores tratados con carbón activado fueron purificados realizando una cromatografía de afinidad utilizando una columna de 10 x 1,2 cm rellena con 5 ml de pestatina-agarosa (Sigma). Se equilibró con buffer ácido acético-acetato de sodio 0,1 M de pH 5. La muestra (1 ml) fue sembrada y lavada por el pasaje del mismo buffer con el agregado de NaCl 0,1 M hasta obtener valores de absorbancia (280 nm) próximos a cero. La elución se realizó utilizando buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8 y NaCl 1 M. La velocidad de flujo aplicada fue de 30 cm³ h⁻¹ y se recogieron fracciones de 2 ml.

8.13. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE PUREZA DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

8.13.1. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida

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

8.13.2. Electroforesis bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

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

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

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

8.13.3. Isoelectroenfoque

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

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

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

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

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

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

8.13.4. Actividad enzimática en geles

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

8.13.4.1. Zimograma con gelatina incluida

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

8.13.4.2. Zimograma con gelatina overlay

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

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

8.13.4.3. Zimograma con hemoglobina

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

8.14. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

8.14.1. Plan de inmunización

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

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

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

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

8.14.2. Producción y título de anticuerpos

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

8.14.2.1. Inmunelectroforesis

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

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

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

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

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

8.14.2.2. ELISA indirecto

El extracto de la peptidasa utilizada para inmunizar el conejo con una concentración de 10 µg ml⁻¹ en buffer carbonato/bicarbonato 50 mM de pH 9,6 (100 µl por pocillo) se adsorbió en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos, incubando toda la noche a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó incubando durante 1 hora a 37°C con 200 µl de leche en polvo descremada (Molico) al 8 % en PBS (KH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 1,8 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7-7,4). Después de lavar las placas cuatro veces con PBS conteniendo 0,3 ml l⁻¹ de Tween 20 (PBST), se agregaron 100 µl de las diluciones seriadas al medio en PBST de los sueros inmunes y control y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavaron cuatro veces con PBST y se cubrieron con 100 µl de anticuerpos de cabra anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma A-8275), diluído 1/2000 en PBST. Las placas se incubaron una hora a 37°C y luego se lavaron cinco veces con PBST. El revelado se realizó agregando a cada pocillo 100 µl de ortofenilendiamina (OPD) 1 mg ml⁻¹ en buffer citrato-fosfato de sodio 0,1 M de pH 5 con 0,025 % de agua oxigenada e incubando en la oscuridad durante 10 minutos. La reacción se detuvo con el agregado de 50 µl de ácido sulfúrico 2N y se realizó la lectura en un espectrofotómetro para policubetas (Metrolab) a 492 nm.

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

8.14.3. Electrotransferencia (*blotting*)

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

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

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

8.14.4. Western blotting

Las membranas de nitrocelulosa conteniendo las proteínas electrotransferidas fueron lavadas con buffer PBS e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, en buffer de bloqueo (100 ml PBS conteniendo 3 g leche descremada y 100 μl de Tween 20) con la finalidad de rellenar los sitios de la membrana a los cuales no se hubieran unido las proteínas proveniente del gel de poliacrilamida. Luego, las membranas se sumergieron durante tres horas (con agitación) en 30 ml de una dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal anti-peptidasa de alcaucil (anticuerpo primario) en buffer de lavado (PBST), consistente en una solución al 3 ‰ de Tween 20 en PBS. Las membranas se lavaron tres veces con PBST durante 10 minutos para retirar el exceso de anticuerpo o el que estuviera unido inespecíficamente a proteínas. Luego se incubaron durante 1 hora con una dilución 1:1000 en PBST del anticuerpo secundario: anticuerpo de cabra anti IgG (H+L) de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Zymed Laboratories®). Después de lavar las membranas con PBST tres veces durante 10 minutos cada una, se reveló la actividad peroxidásica con diazaminobencidina (DAB) en presencia de 0,1 % de H_2O_2 (30 vol). La reacción se detuvo lavando las membranas con agua destilada, las que luego se secaron al aire.

8.15. SECUENCIA AMINOTERMINAL

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

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

8.16. ESPECTROMETRÍA DE MASA

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

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

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

8.17. ELABORACIÓN Y ANÁLISIS DE QUESOS

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

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

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

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

8.17.1. Elaboración de quesos con leche de vaca

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

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

Se traspasaron 200 litros de leche pasteurizada a una tina quesera de 500 litros (Bauducco) y usando ácido acético de grado alimentario se llevó la acidez a los grados Dornic¹ adecuados para el queso a elaborar. A la leche acidificada se le agregó el fermento según el tipo de queso y de acuerdo a las concentraciones recomendadas por

¹ 10 grados Dornic equivalen a 0,1 % de ácido láctico.

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

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

8.17.1.1. Quesos de pasta blanda

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

8.17.1.2. Quesos de pasta semidura

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

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

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

8.17.2. Elaboración de quesos con leche de cabra

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

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

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

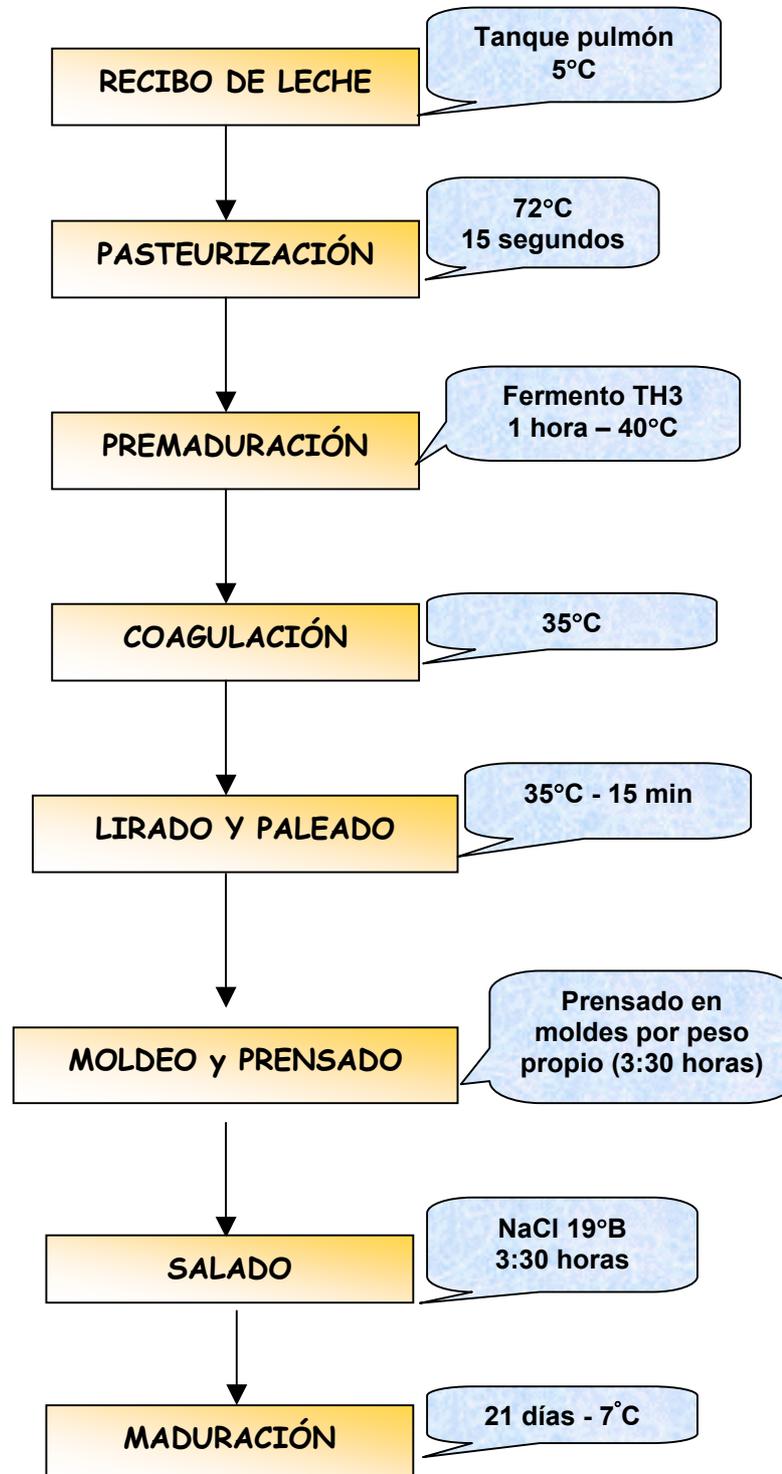


Figura 6.- Operaciones y parámetros tecnológicos en la elaboración de queso Cuartirolo

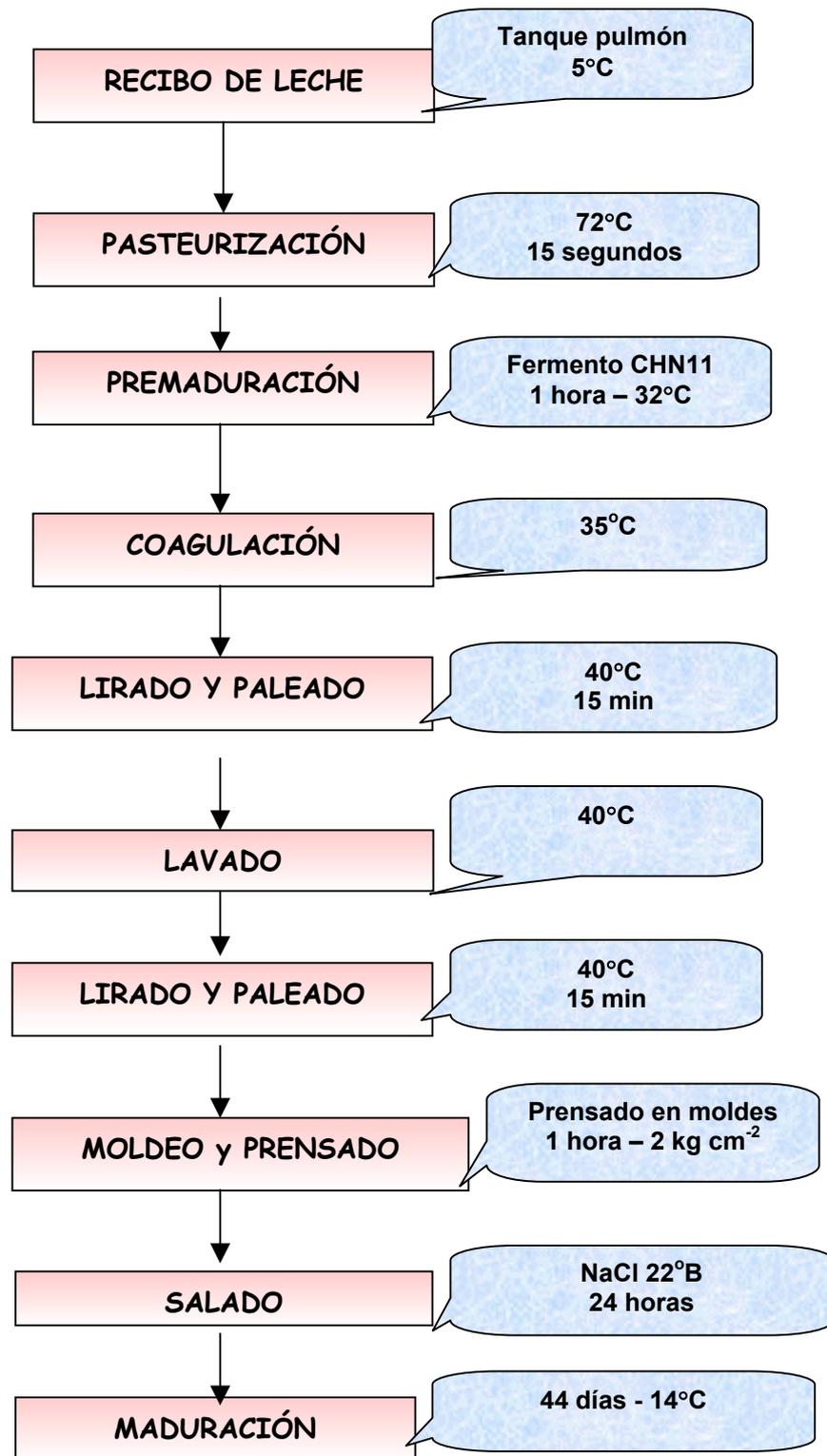


Figura 7.- Operaciones y parámetros tecnológicos en la elaboración de queso Gouda.

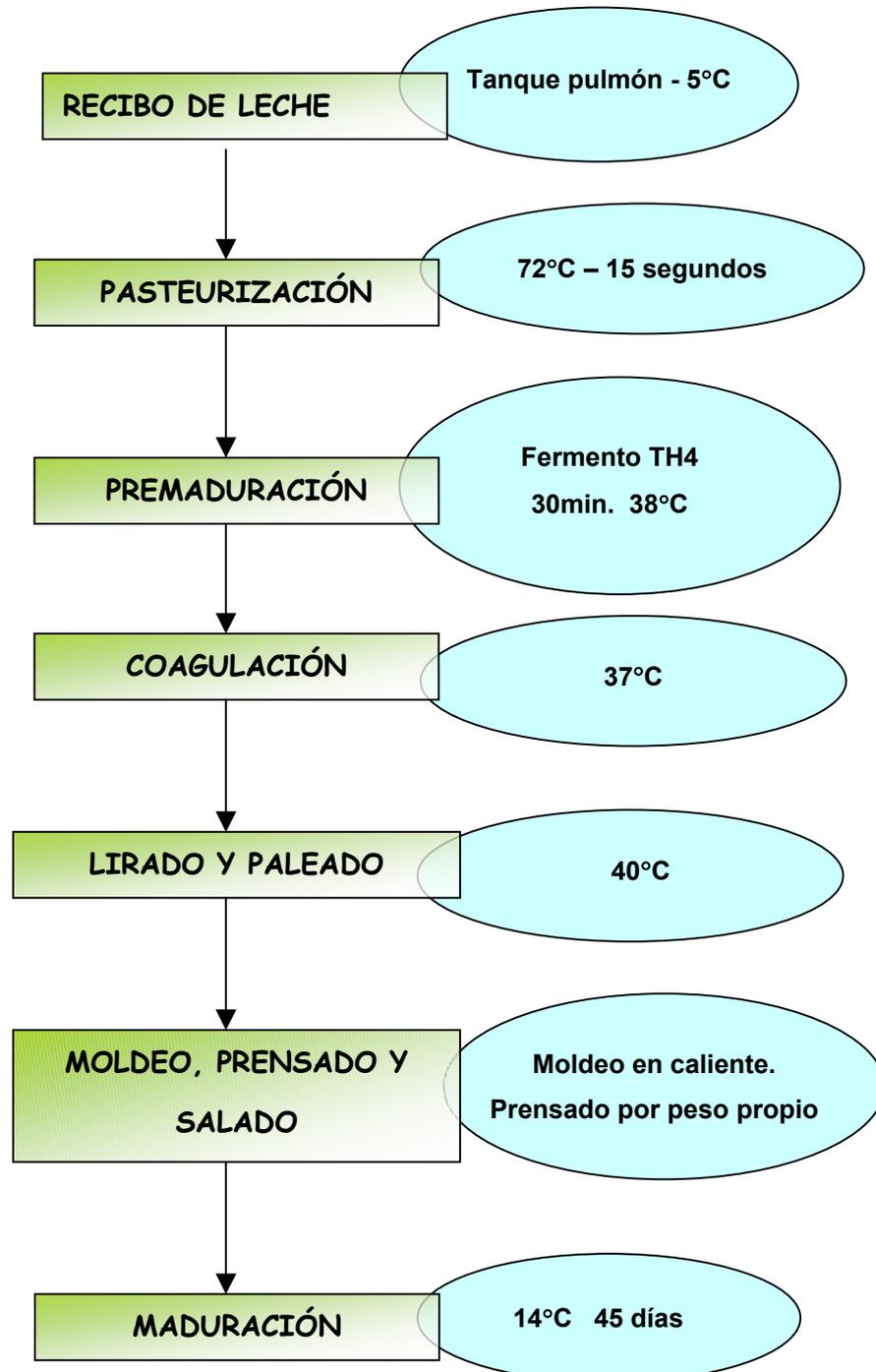


Figura 8.- Operaciones y parámetros tecnológicos en la producción de quesos de cabra

8.17.3. Análisis fisicoquímicos

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

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

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

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

8.17.4. Electroforesis de quesos

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

8.17.4.1. Preparación de las muestras

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

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

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

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

8.17.4.2. Desarrollo de la electroforesis

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

8.17.4.3. Análisis de los resultados

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

8.17.5. Análisis sensorial

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

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

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).

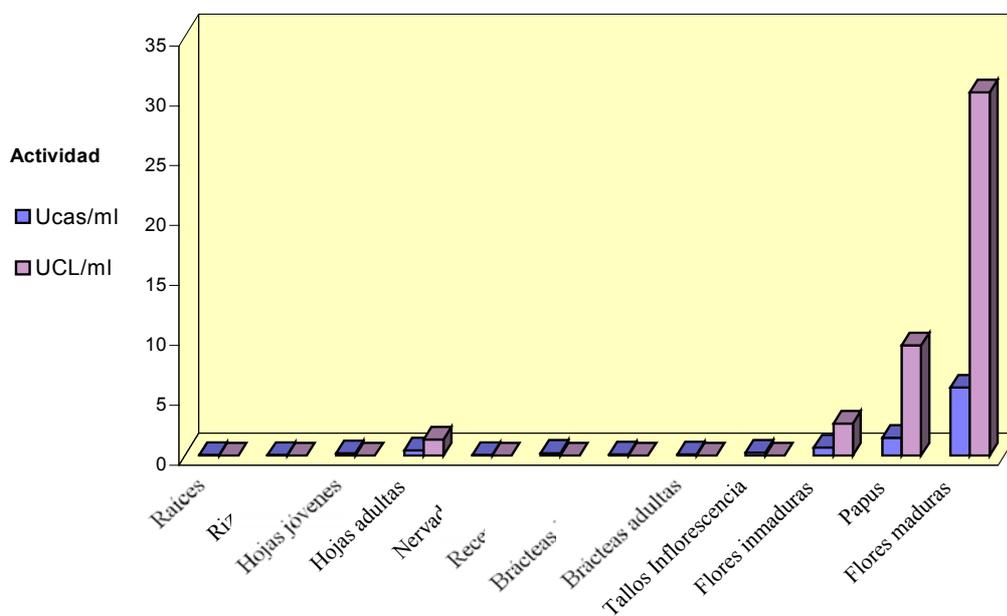


Figura 9.- Actividad proteolítica (Ucas ml^{-1}) y coagulante de la leche (UCL ml^{-1}) de diferentes órganos de *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe.

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 µM)	E-64 (10 µM)	
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

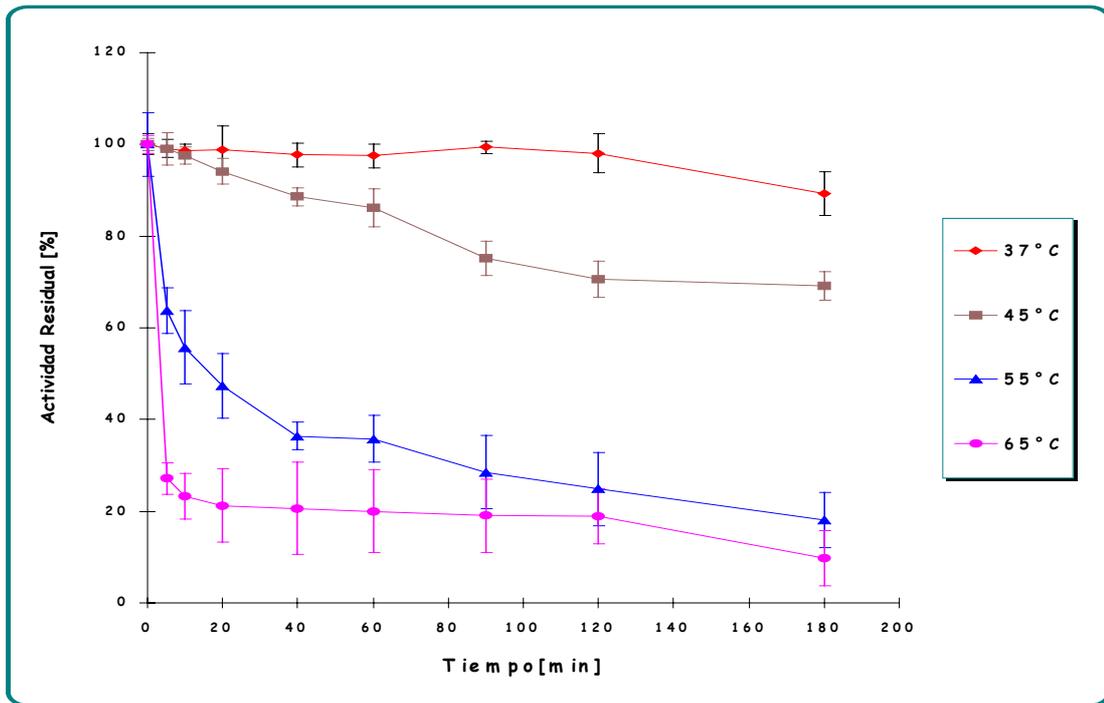


Figura 10.- Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre la actividad de la preparación cruda de las flores maduras. Se midió la actividad residual sobre caseína (pH 6) al finalizar cada período de incubación y a cada una de las temperaturas ensayadas. Los datos resultan de promediar dos ensayos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

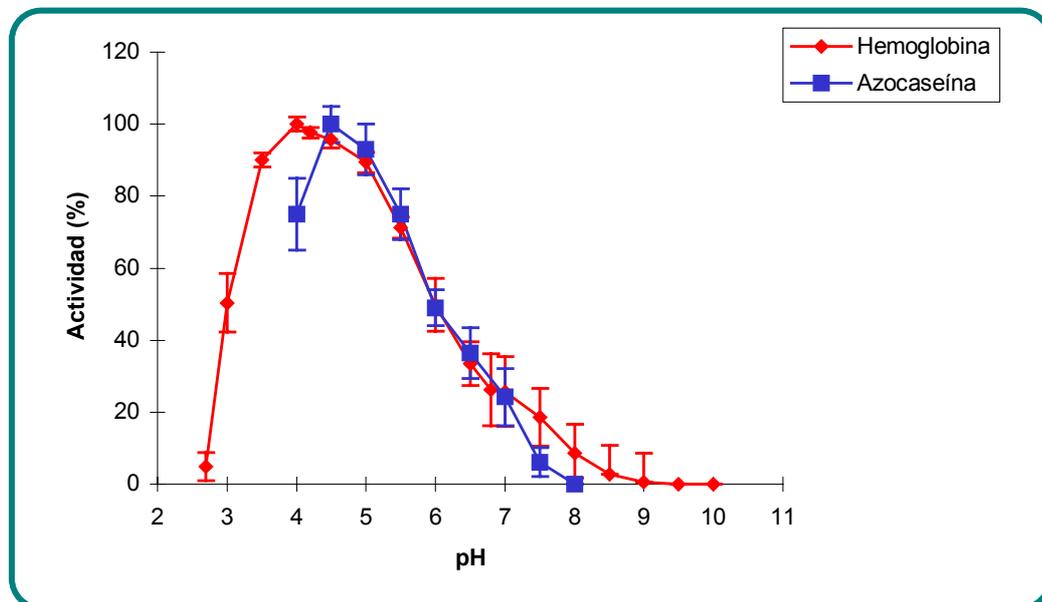


Figura 11.- Efecto del pH sobre la actividad peptidásica de la preparación cruda de las flores maduras. Los valores consignados corresponden al pH de las mezclas de reacción. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n=5). Las barras representan la desviación estándar de las medias.

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.

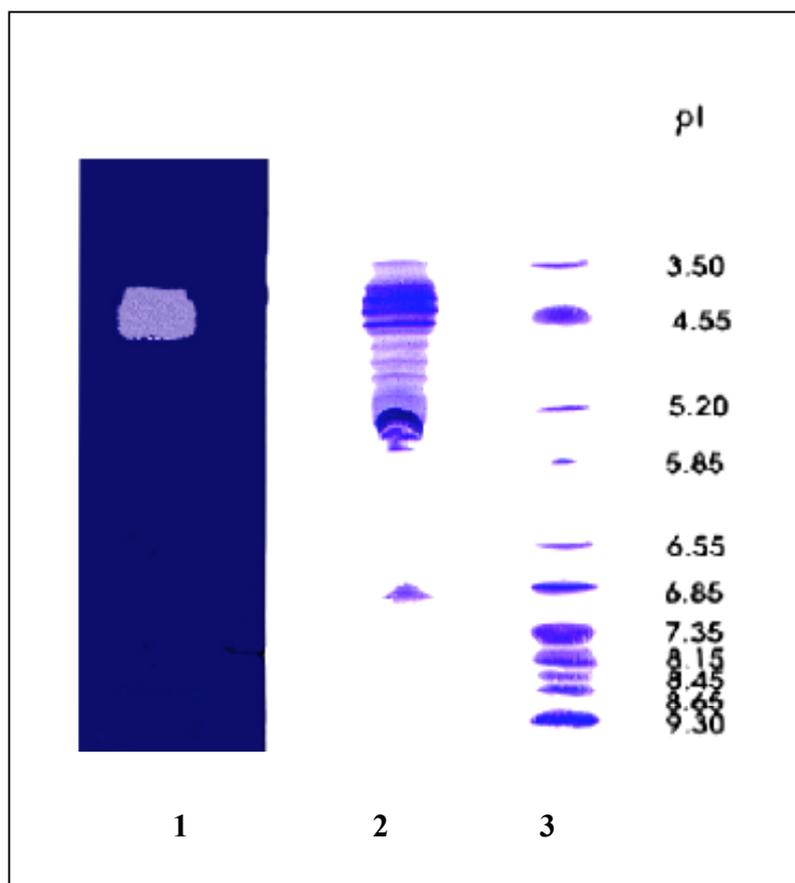


Figura 12.- Isoelectroenfoque y zimograma de las peptidasas del extracto crudo de las flores de alcaucil. Calle 1: zimograma revelado con hemoglobina a pH 4. Calle 2: IEF del extracto crudo. Calle 3: marcadores de pI (Broad pI kit, Pharmacia).

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.

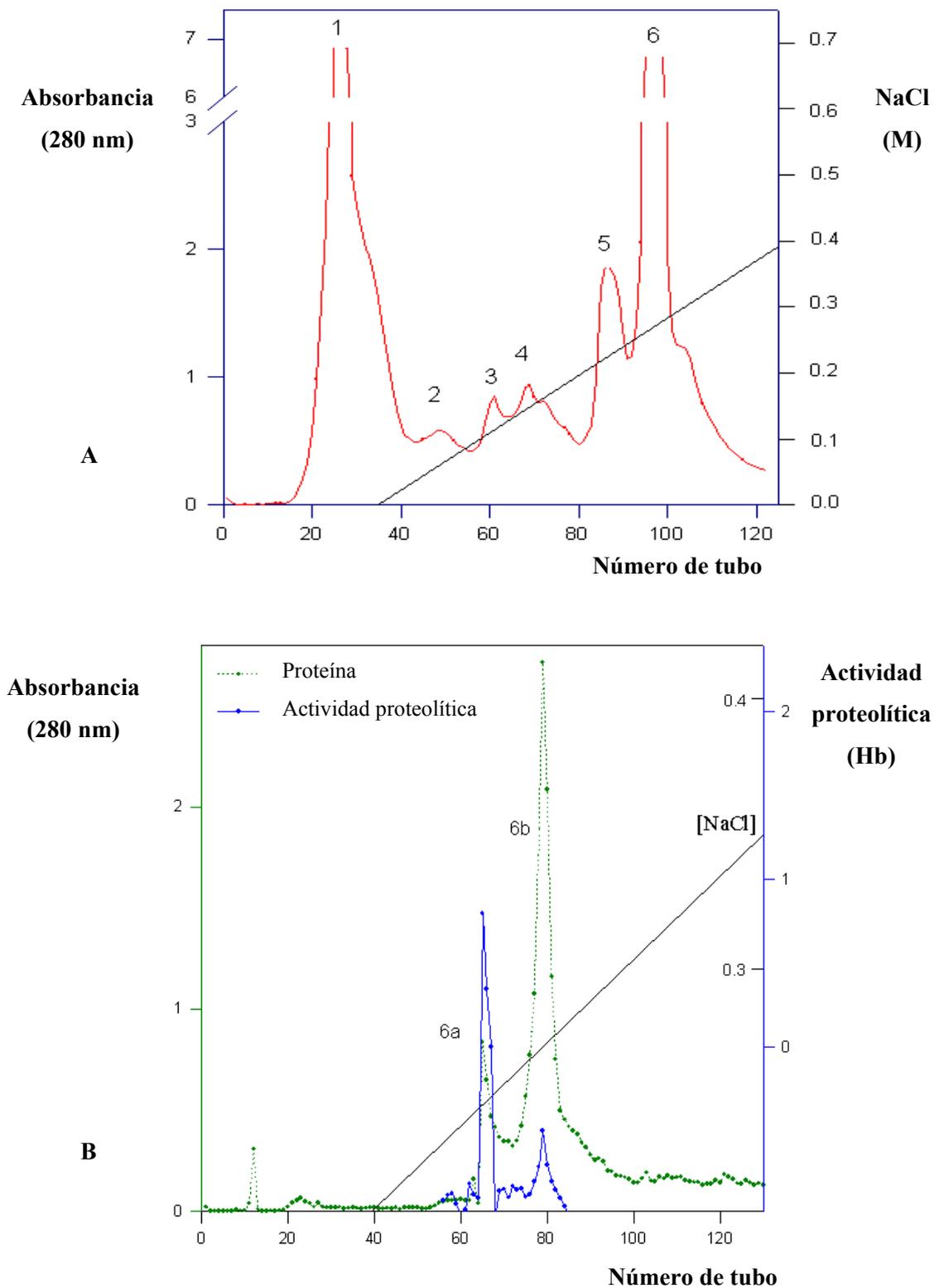


Figura 13.- Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose). A) Extracto crudo de las flores de alcaucil. B) Recromatografía del pico 6.

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).

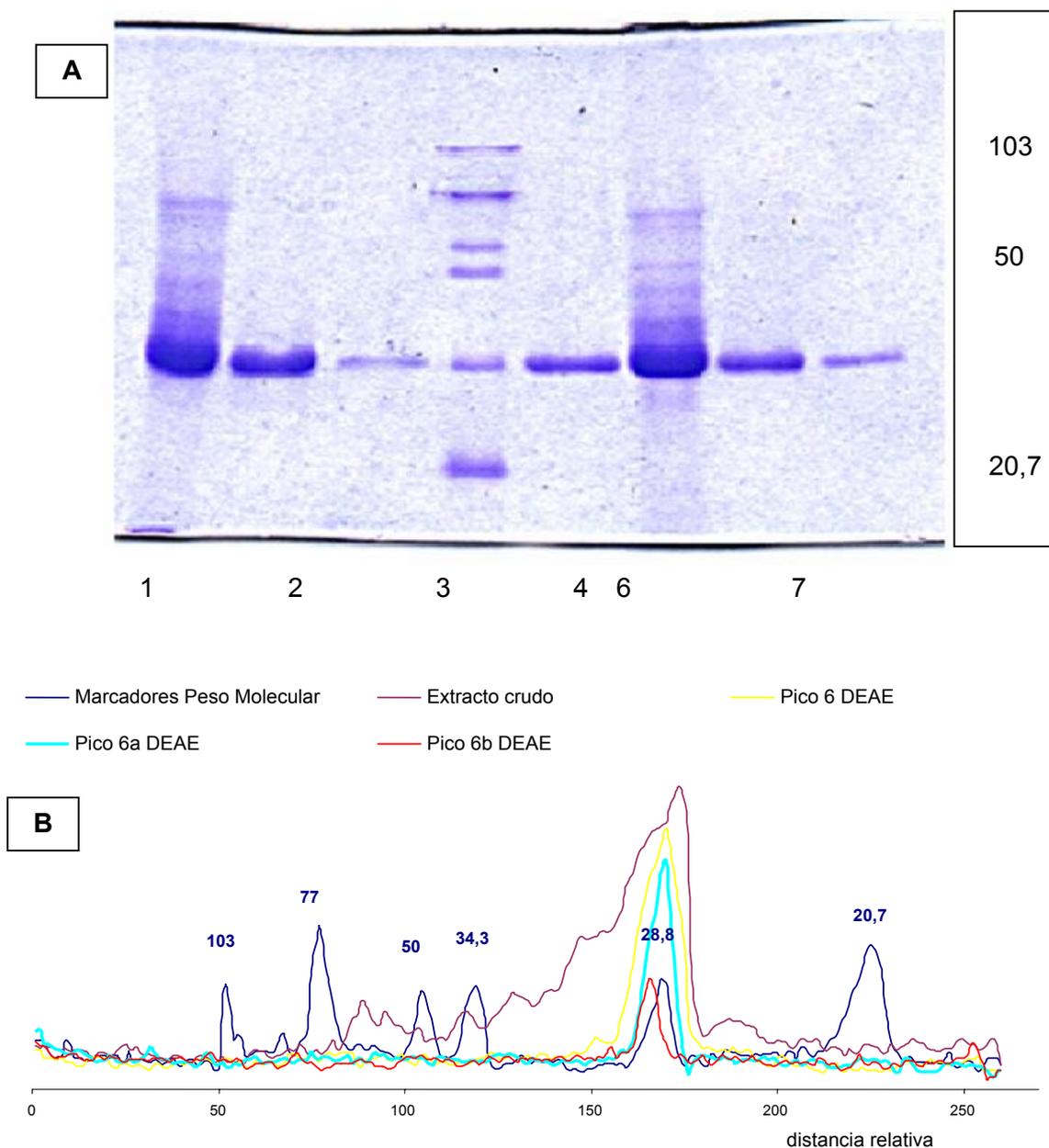


Figura 14.- (A) SDS-PAGE (14 %) y **(B)** densitograma de las peptidasas de *C. scolymus* L. Calles **1 y 6**: extracto crudo. Calle **2**: pico 6 (Fig. 13A). Calles **3 y 8**: pico 6b (Fig. 13B). Calle **4**: marcadores de peso molecular (Bio-Rad low range). Calles **5 y 7**: pico 6a (Fig. 13B)

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).

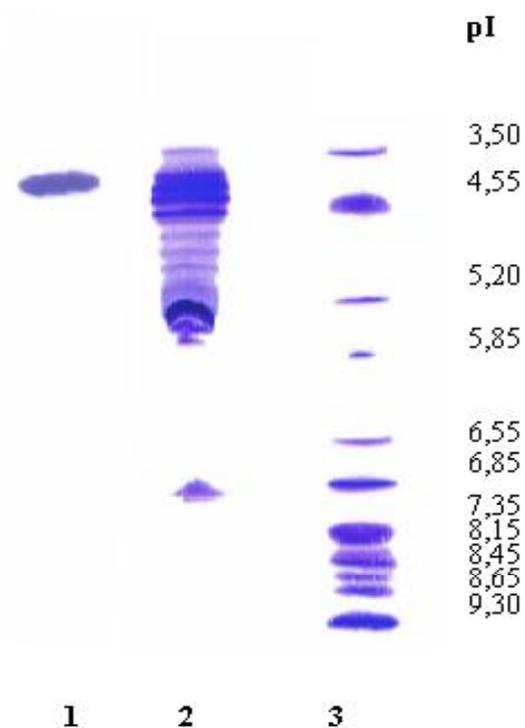


Figura 15.- Isoelectroenfoque de las peptidasas de *C. scolymus* L. Calle 1: Fracción 6a (Fig. 13B). Calle 2: Extracto crudo de flor. Calle 3: Marcadores de pI (Broad pI kit, Pharmacia).

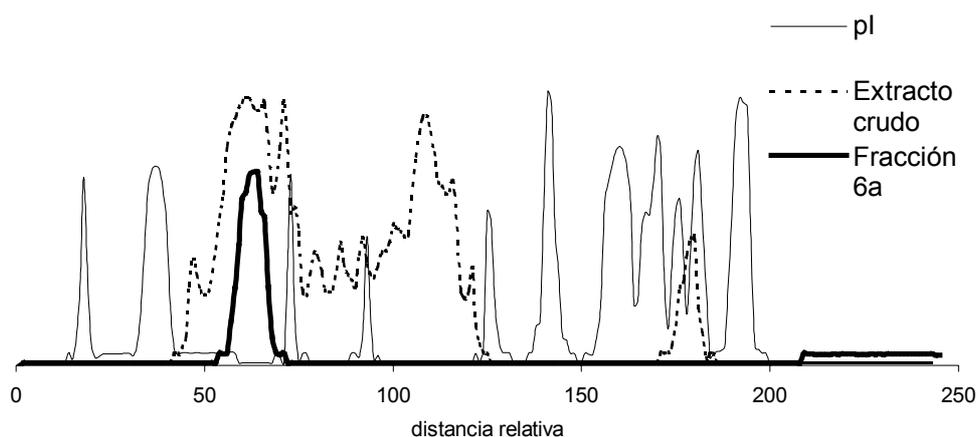


Figura 16.- Densitograma del isoelectroenfoque del extracto crudo de las flores de alcaucil y de la fracción 6a purificada por cromatografía de intercambio iónico.

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*).

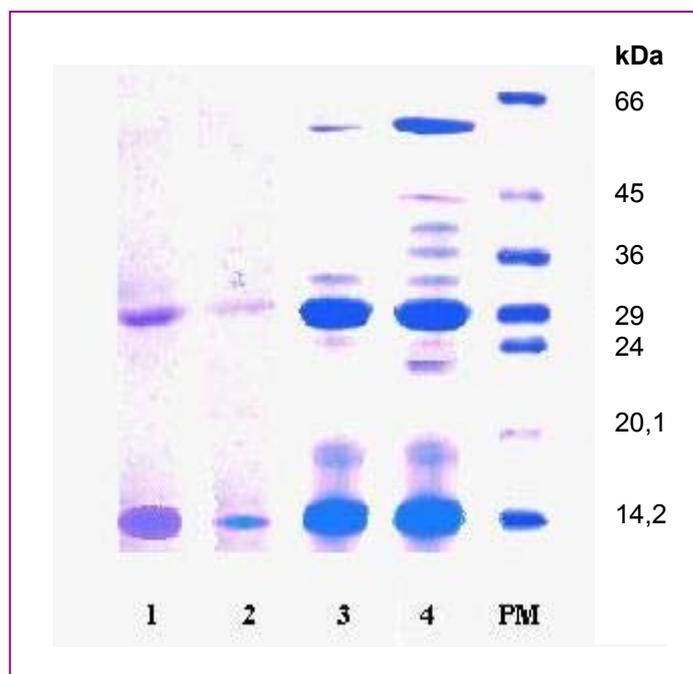


Figura 17.- SDS-PAGE (14%-5%) del extracto crudo de flores de alcaucil precipitado con sulfato de amonio. Calle 1- 30 %; Calle 2- 45 %; Calle 3- 60 %; Calle 4- 80 %; **PM**: marcadores de peso molecular (Sigma MW-SDS-70L)

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).

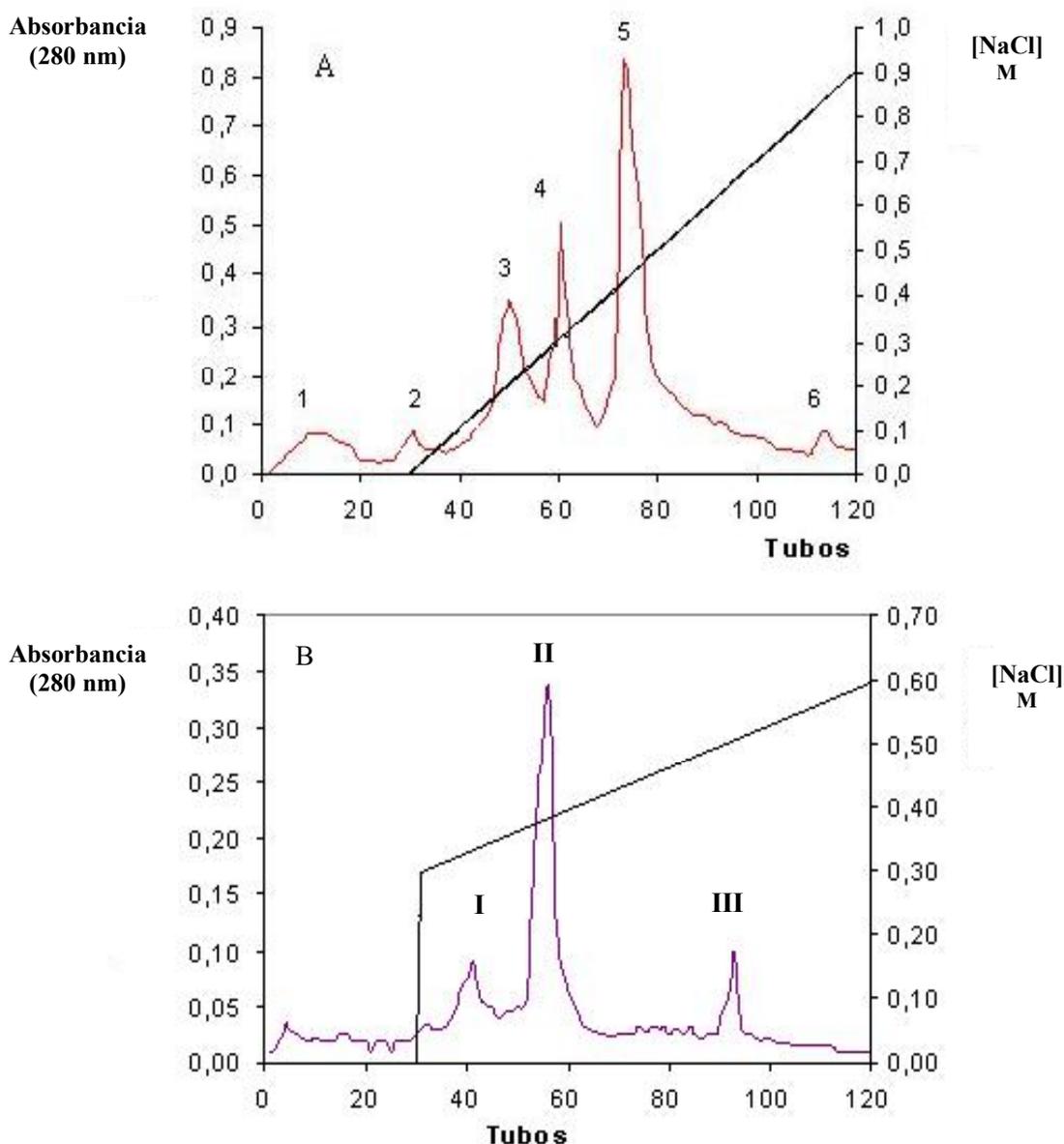


Figura 18.- A.- Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose) del extractivo de flores precipitado con sulfato de amonio 60-80 % con gradiente de cloruro de sodio: 0-0,9 M.

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.

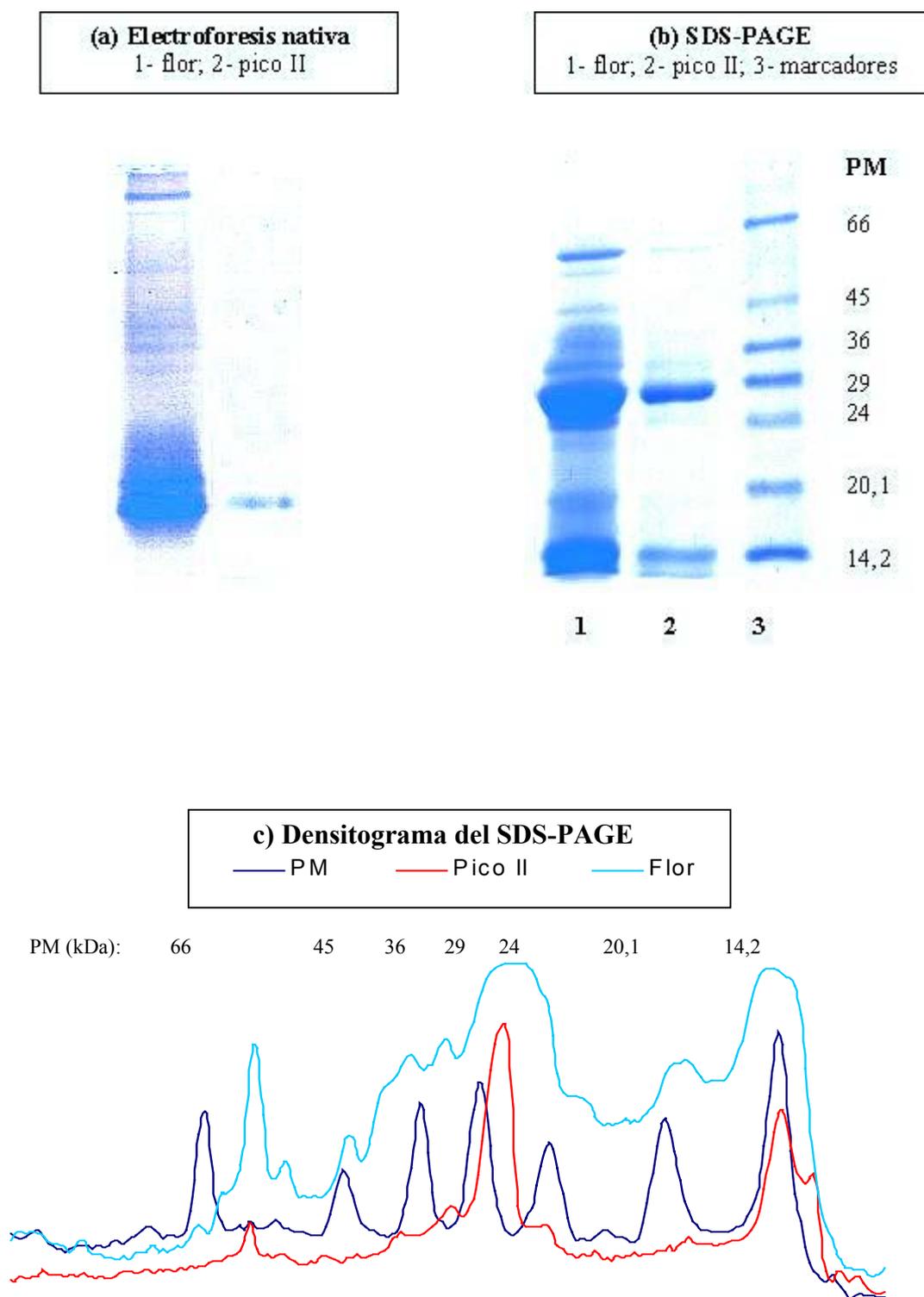


Figura 19.- (A) Electroforesis nativa, **(B)** electroforesis desnaturalizante y **(C)** densitograma del SDS-PAGE del extracto crudo de flores de alcauil y del pico II de la recromatografía de intercambio aniónico. PM: marcadores de peso molecular (Sigma MW-SDS-70L).

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.

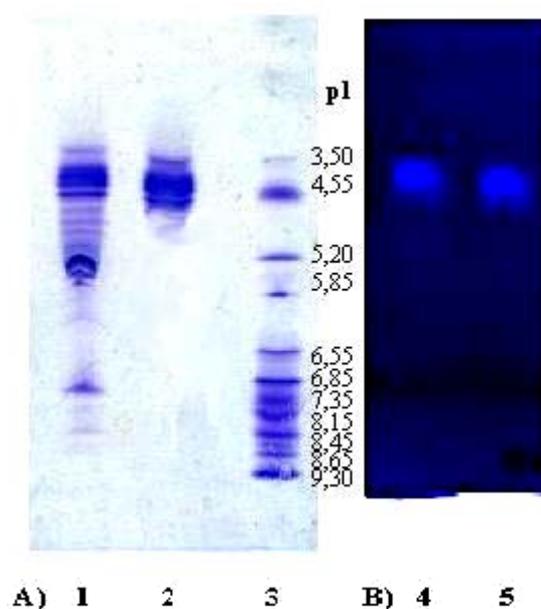


Figura 20.- A) Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida de los extractos de flores de alcaucil. Calle 1: extracto crudo. Calle 2: extracto crudo tratado con carbón. Calle 3: patrones de pI 3,5-9,3 (Farmacia). **B)** Zimograma. Calle 4: extracto crudo tratado con carbón. Calle 5: extracto crudo.

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 %.

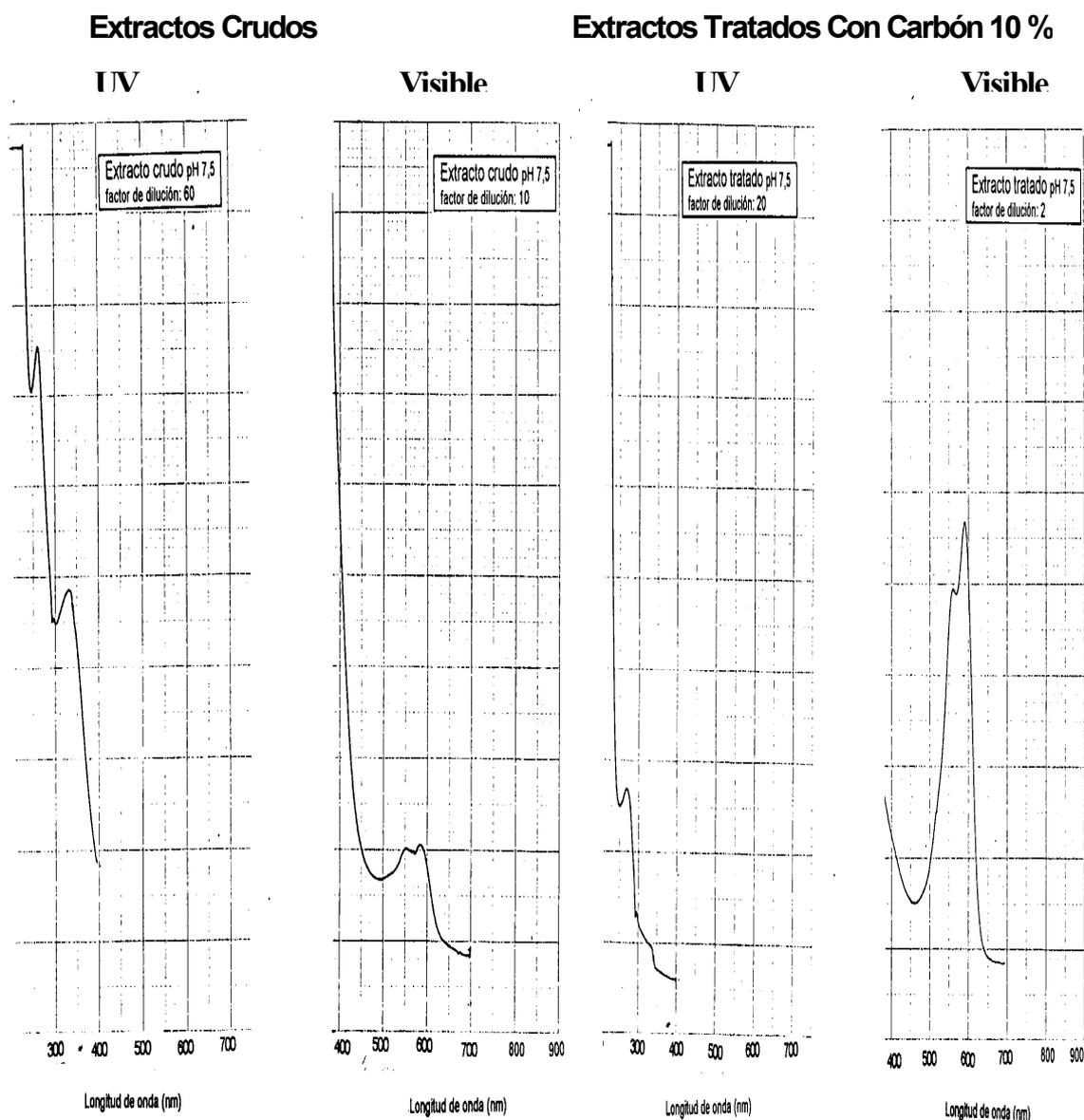


Figura 21.- Espectros UV y visibles de los extractivos de flores antes y después de tratarlos con carbón activado al 10 %.

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.

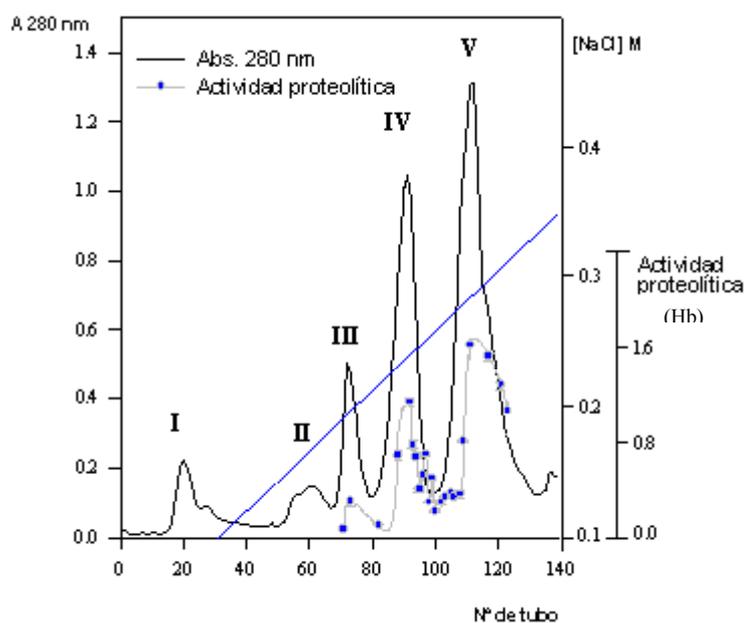


Figura 22.- Cromatografía de intercambio aniónico del extracto crudo de flor tratado con carbón al 10 %. III, IV y V: fracciones proteolíticas sobre hemoglobina a pH 4.

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 redisoluidos 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.

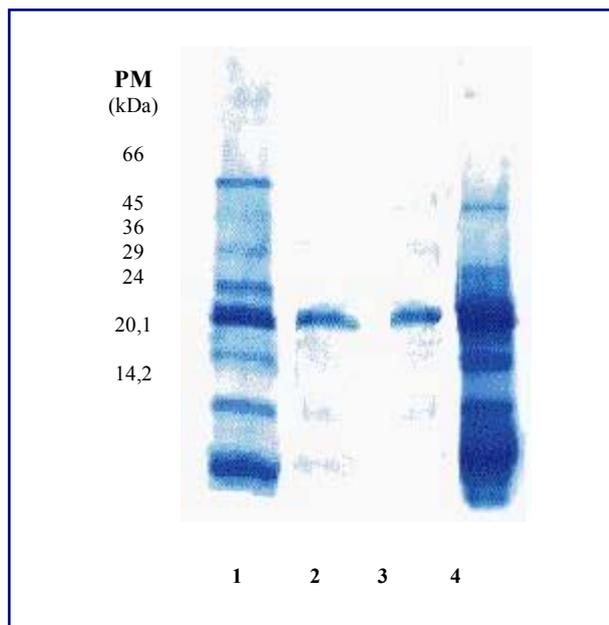


Figura 23.- SDS-PAGE. (14 % - stacking al 5 %) Calle 1: marcadores de peso molecular (Sigma MW-70L). Calle 2: fracción IV. Calle 3: fracción V. Calle 4: extracto crudo de flor de alcaucil.

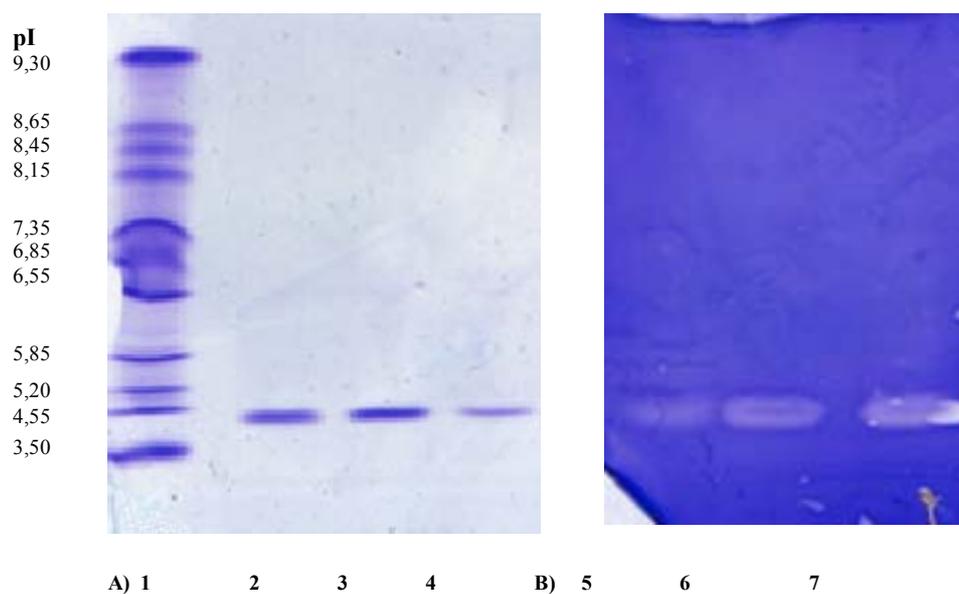


Figura 24.- A) Isoelectroenfoque a pH 3-10. Calle 1: patrones de punto isoeléctrico (Pharmacia). Calle 2 y 3: fracción V. Calle 4: fracción IV. **B)** Zimograma. Calle 5: fracción IV. Calle 6: fracción V. Calle 7: extracto crudo tratado con carbón activado

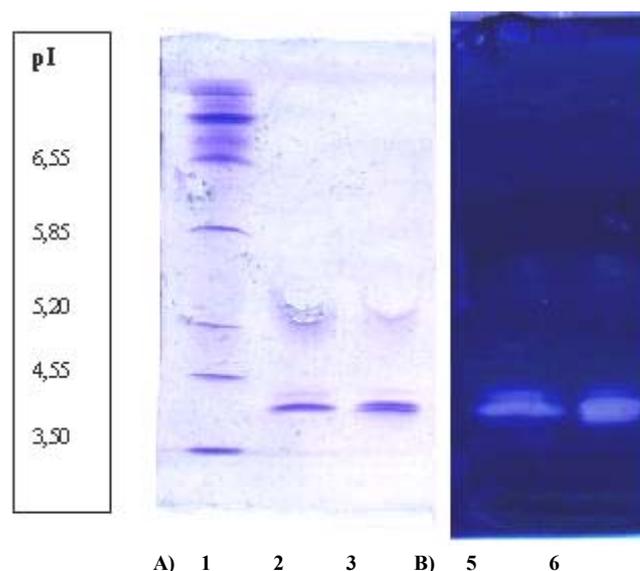


Figura 25.- A) Isoelectroenfoque a pH 4-6,5. Calle 1: patrones de punto isoeléctrico (Pharmacia). Calle 2: fracción IV. Calle 3: fracción V. **B)** Zimograma. Calle 5: fracción IV. Calle 6: fracción V.

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.

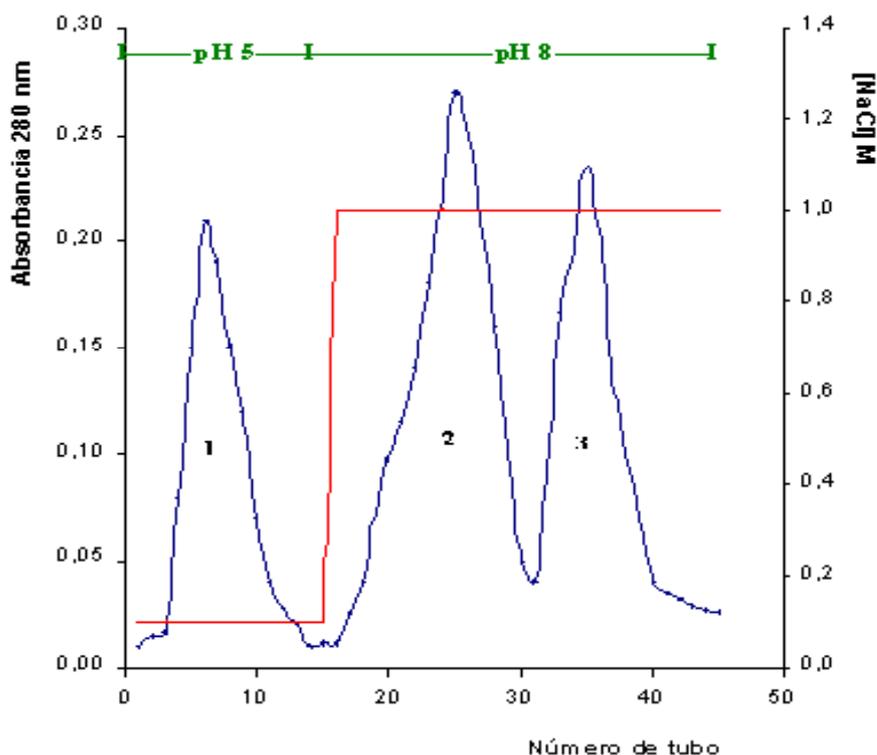
La fracción V obtenida en la cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose del extracto de las flores adsorbido con carbón al 10 % se analizó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75. La determinación se realizó por triplicado y el peso molecular fue de 61 ± 4 kDa.

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).

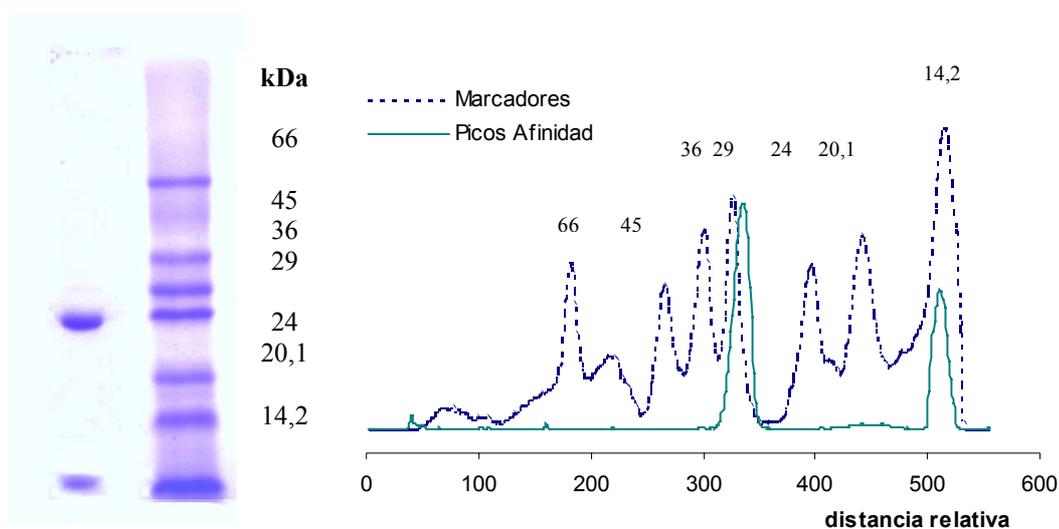


Figura 27.- SDS-PAGE (14%-5%) de la fracción 3 obtenida por cromatografía de afinidad. Marcadores de peso molecular Sigma (MW-SDS-70L).

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.

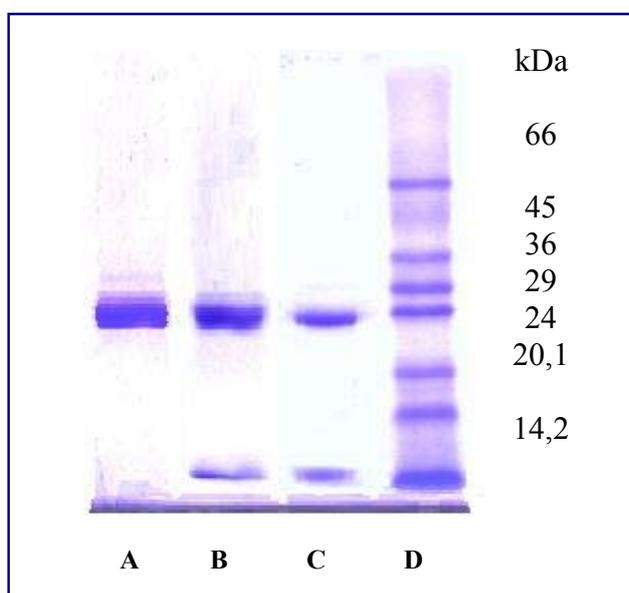


Figura 28.- SDS-PAGE (14%-5%) que evidencia el procesamiento de la proteína obtenida por cromatografía de afinidad (fracción 3) **A)** muestra sin manipular, mantenida a 4°C durante **B)** 3 días y **C)** 7 días. **D)** patrones de peso molecular (Sigma MW-SDS-70L)

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*).

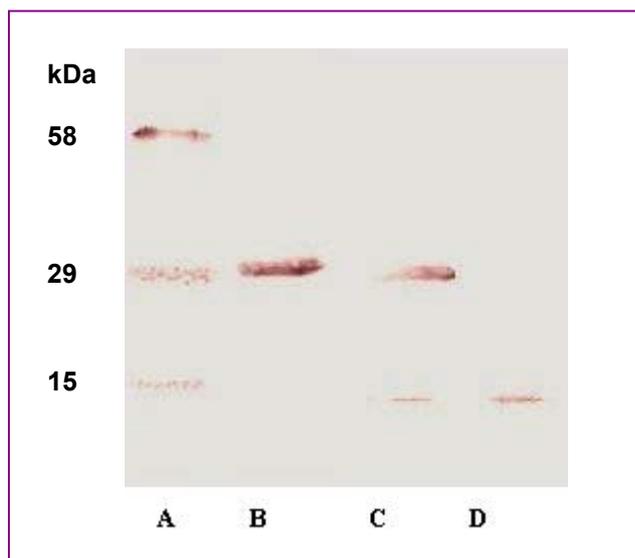


Figura 29.- Inmunodetección de la subunidad menor de la peptidasa de alcaucil en extractos crudos de flores maduras (**A**) y en la muestra purificada por cromatografía de afinidad y almacenada **B)** 0 días; **C)** 3 días; **D)** 7 días.

La presencia de las bandas mencionadas en la peptidasa aspártica de las flores de *C. scolymus* 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.

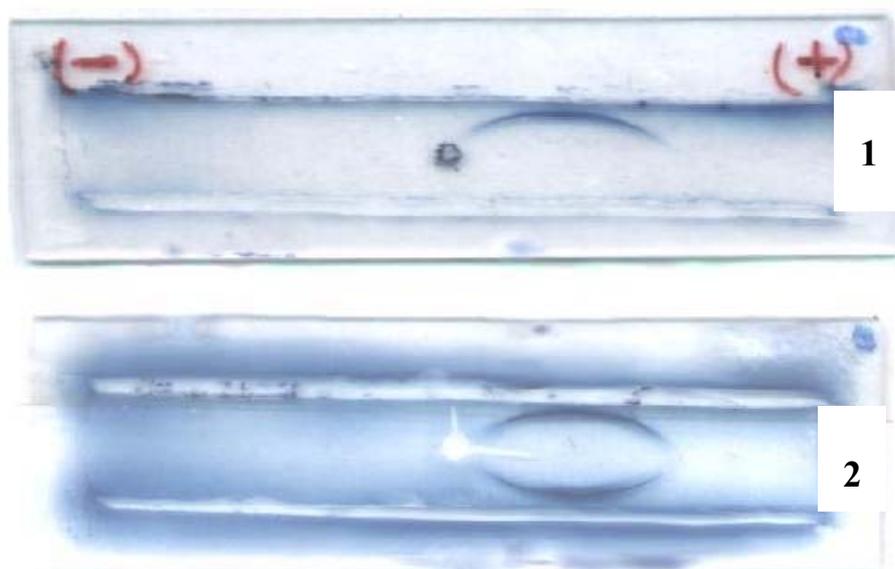


Figura 30.- Inmunoelectroforesis de la peptidasa aspártica de alcaucil.

En la inmunoelectroforesis 1 se enfrentó el antígeno ($0,6 \text{ mg ml}^{-1}$) 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)	EELQVDCNTLSMPNVSFTIGGKKF 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 SAVDCAQLSTMP TVSLTIGGKVF 1 28	59	Fujikura & Karszen (1995)
<i>Hordeum vulgare</i> (subunidad 11 kDa fitepsina)	ESAVDCGSLGSMPTDIEFTIGGKVF 1 24	56	Runeberg-Ross <i>et al.</i> (1991)
SECUENCIAS DEDUCIDAS DE cDNA			
<i>C. cardunculus</i> L. (precardosina A)	SSEELQVDCNTLSSMPNVSFTIGGKVF 416 442	96	Faro <i>et al.</i> (1999)
<i>Helianthus annuus</i>	PMGE SAVDCQTLSPNIAFTIGGKVF 420 446	63	Park <i>et al.</i> (1990) no publicado
<i>Centaurea calcitrapa</i>	PMGE SAVDCNDLSSMPNIAFTIGGKVF 420 446	63	Domingos <i>et al.</i> (1998)
<i>Brassica napus</i>	PMGE SAVDCAQLSTMP TVSLTIGGKVF 417 443	59	D'Hondt <i>et al.</i> (1997)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PMGE SAVDCAQLSTMP TVSLTIGGKVF 395 423	59	D'Hondt <i>et al.</i> (1997)
<i>C. cardunculus</i> L. (ciprosina)	PMGE SAVDCSSLSSMPNIAFTVGGKVF 382 410	56	Cordeiro <i>et al.</i> (1994b)
<i>Oryza sativa</i> (orizasina1)	PMGE SSVDCGSLASMP EISFTIGAKKF 420 446	56	Asakura <i>et al.</i> (1995b)
<i>Hordeum vulgare</i> (cadenas A de profitepsina)	PMGE SAVDCGSLGSMPTDIEFTIGGKVF 389 415	56	Kervinen <i>et al.</i> (1999)
<i>Hordeum vulgare</i> (profitepsina)	PMGE SAVDCGSLGSMPTDIEFTIGGKVF 419 445	56	Runeberg-Ross <i>et al.</i> (1991)
<i>Cucurbita pepo</i>	PMGQSAVDCGQLSSMP TVSFTIGGKVF 424 450	52	Hiraiwa <i>et al.</i> (1997)

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. ESPECTROMETRÍA 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*).

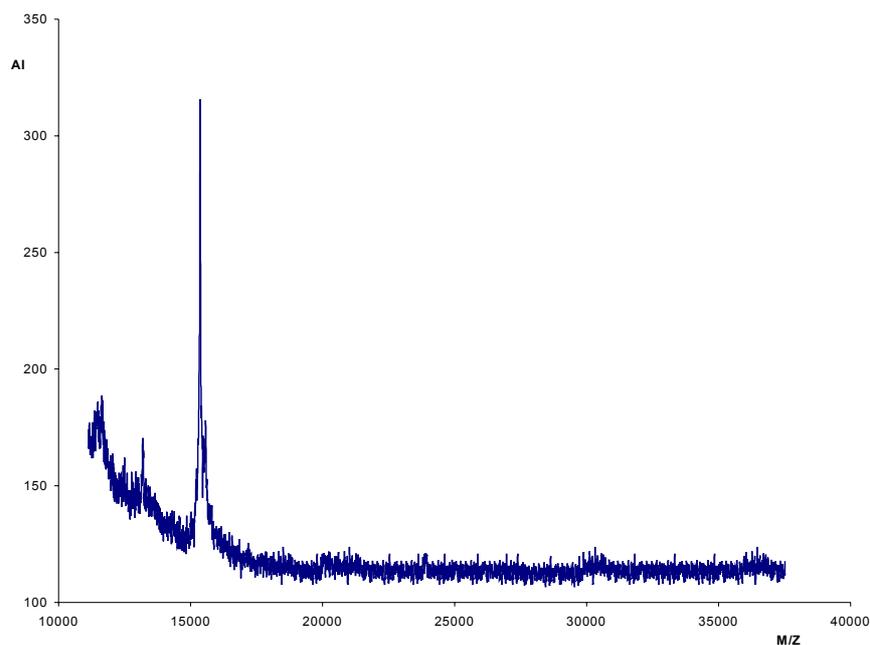


Figura 31.- Espectrometría de masas MALDI de la subunidad menor de scolymina.

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.

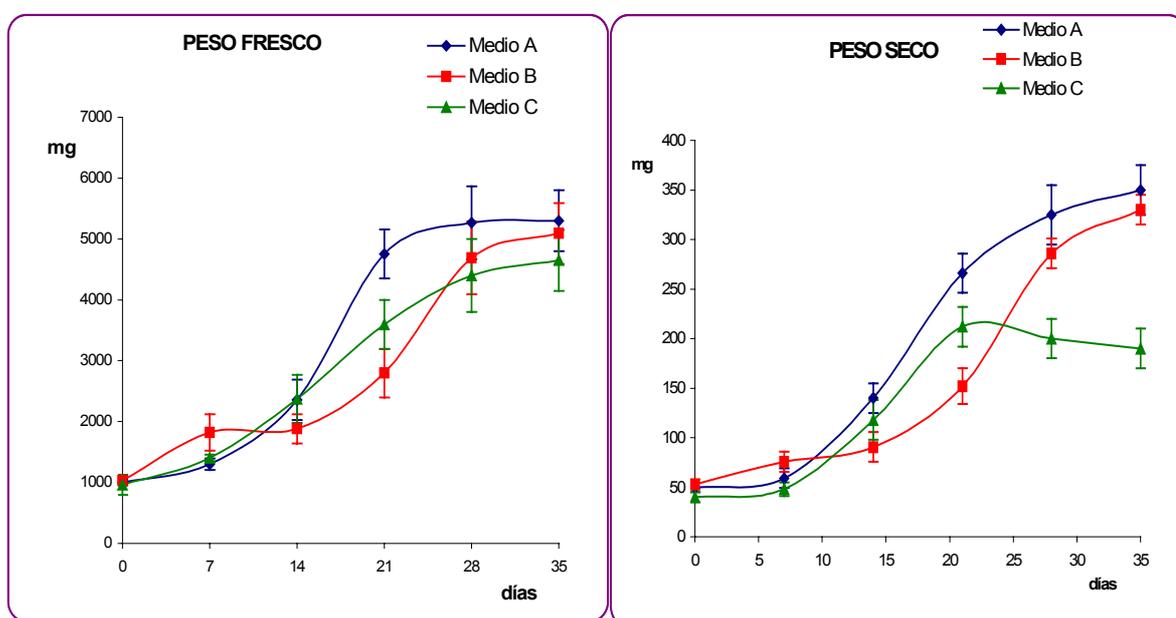


Figura 32.- Evolución de la biomasa en función del tiempo de callos de *C. scolymus* L. cv. Francés Precoz en medios de cultivo suplementados con diferentes relaciones de ANA/BA (mg l^{-1}). Medio A: 1/0,1 - Medio B: 2,5/0,1 - Medio C: 5/0,1. Las barras indican la desviación estándar de 3 experimentos.

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.

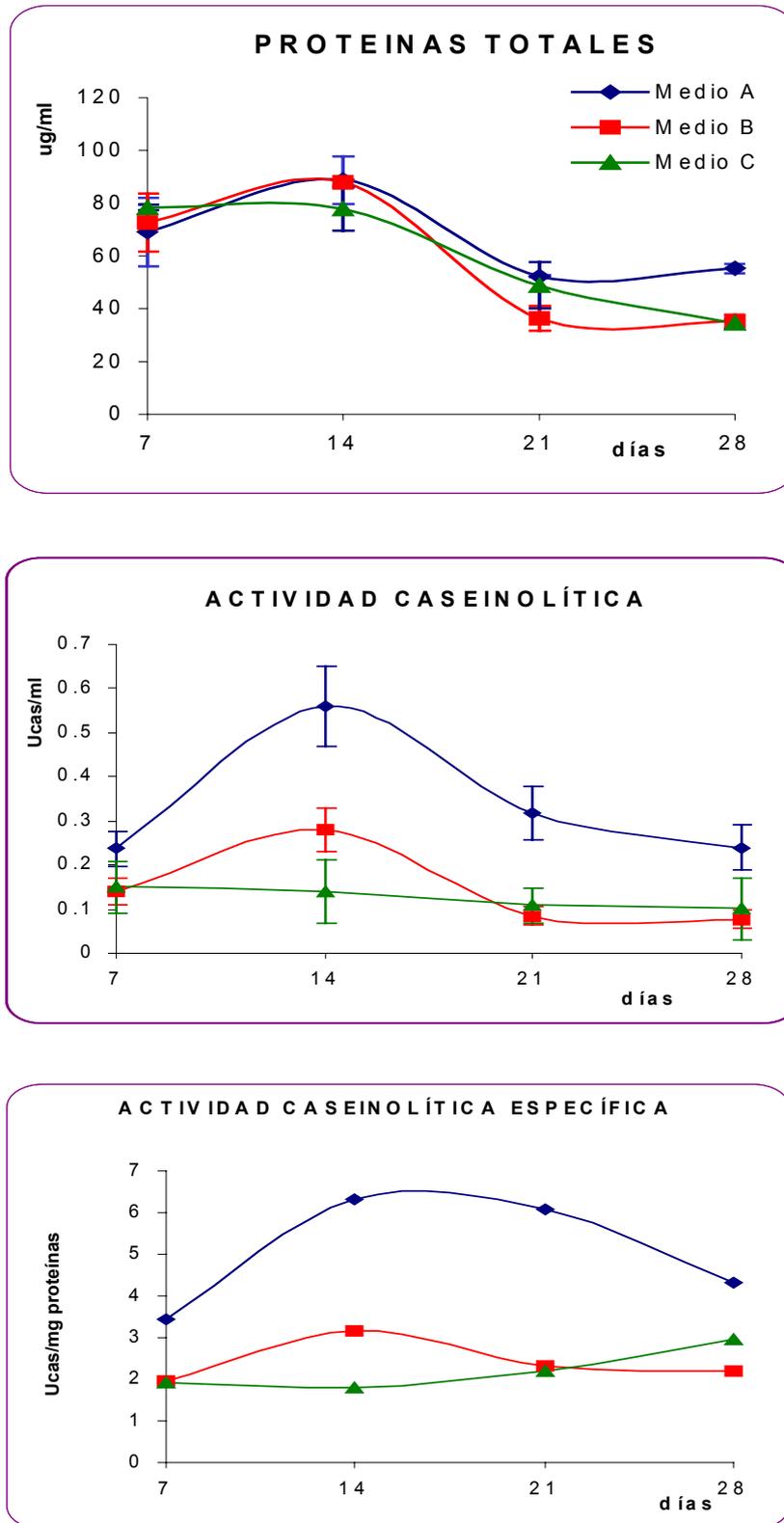


Figura 33.- Proteínas totales y actividad proteolítica sobre caseína a pH 6 de los callos de *C. scolymus* L. cv. Francés Precoz en función del tiempo, en medios de cultivo suplementados con diferentes relaciones de ANA/BA (en mg l^{-1}). Medio A: 1/0,1 - Medio B: 2,5/0,1 - Medio C: 5/0,1.

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).

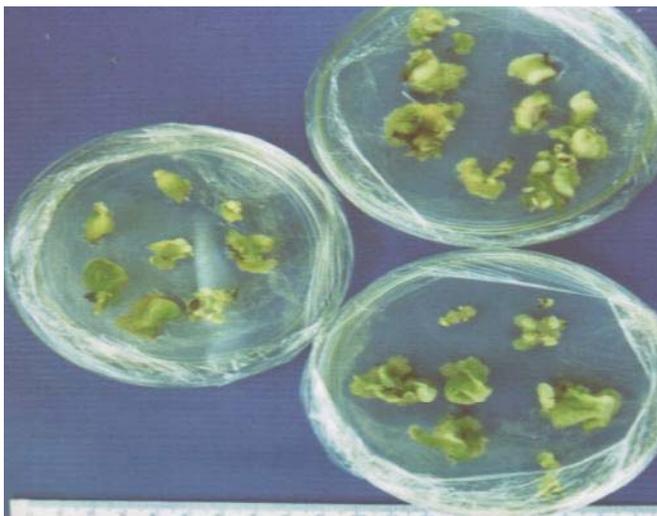


Figura 34.- Establecimiento de los cultivos de callos a partir de brácteas de *C. scolyms* L.



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).

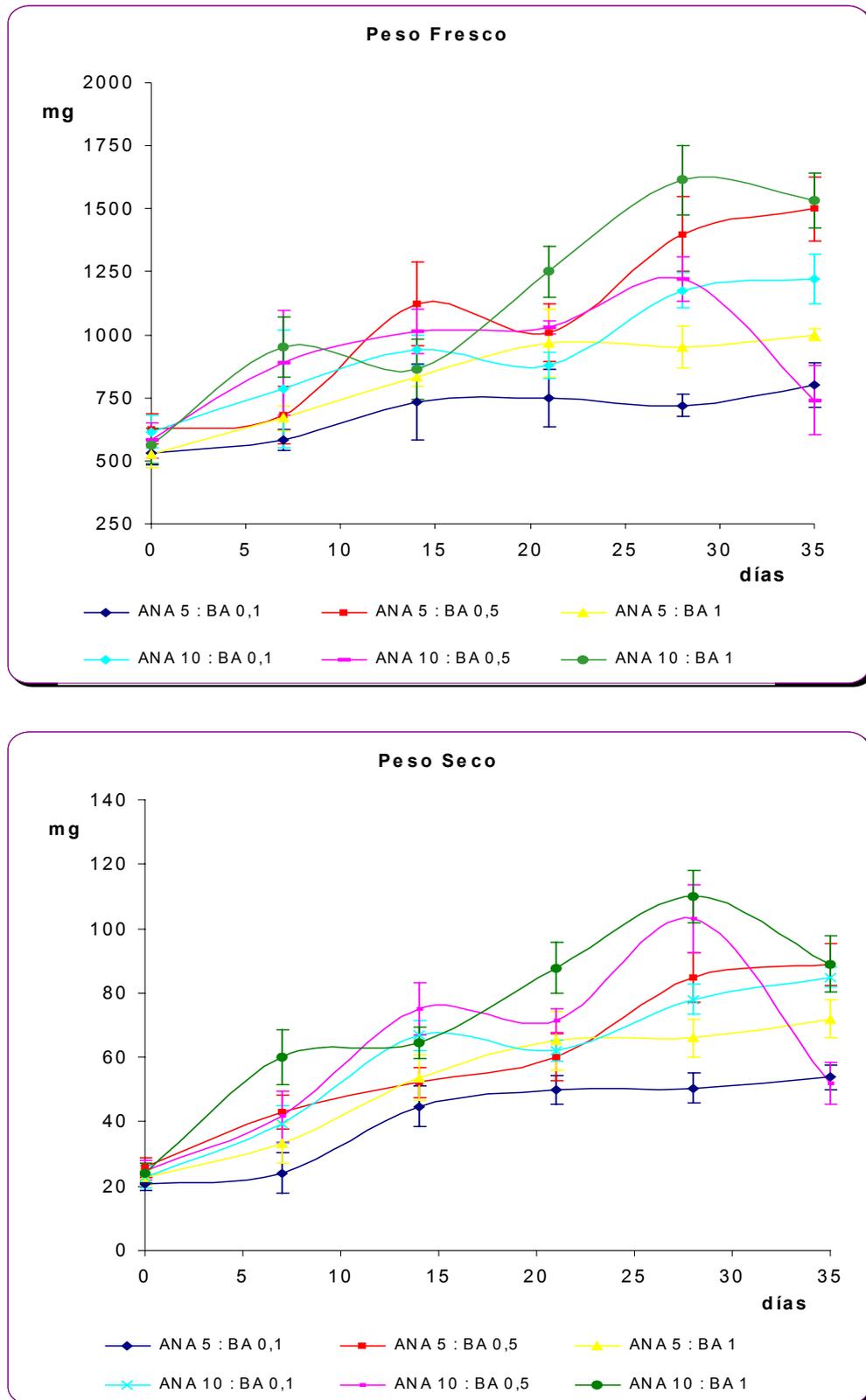


Figura 36.- Biomasa, representada por mg de peso fresco y seco, de los callos (tercera generación) de *C. scolyms* L. cv. Green Globe en función del tiempo, en los medios de cultivo suplementados con diferentes relaciones de ANA/BA (mg l^{-1}). Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos

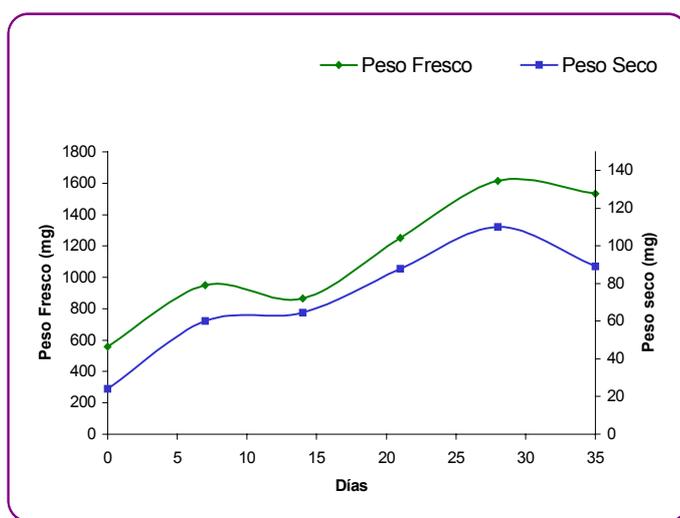


Figura 37.- Peso fresco y peso seco de los callos de *C. scolymus* L. cv. Green Globe crecidos en medio 6 [ANA 10 : BA 1 (mg l^{-1})] durante 35 días

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.

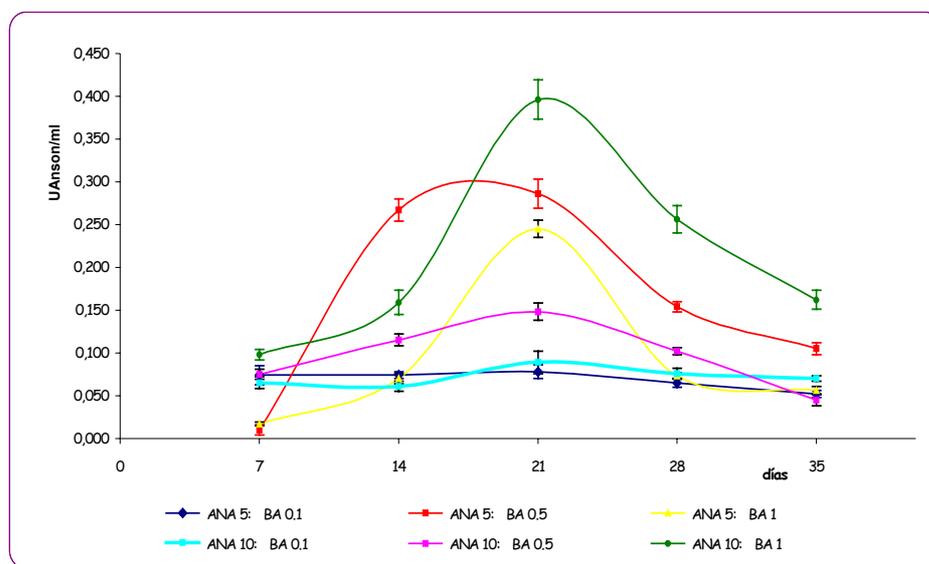


Fig. 39.- Actividad hemoglobínica de los callos de tercera generación de *C. scolymus* L. cv. Green Globe en función del tiempo en medios de cultivo suplementados con diferentes relaciones ANA/BA (en $mg\ l^{-1}$). Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos.

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. scolymus* 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)

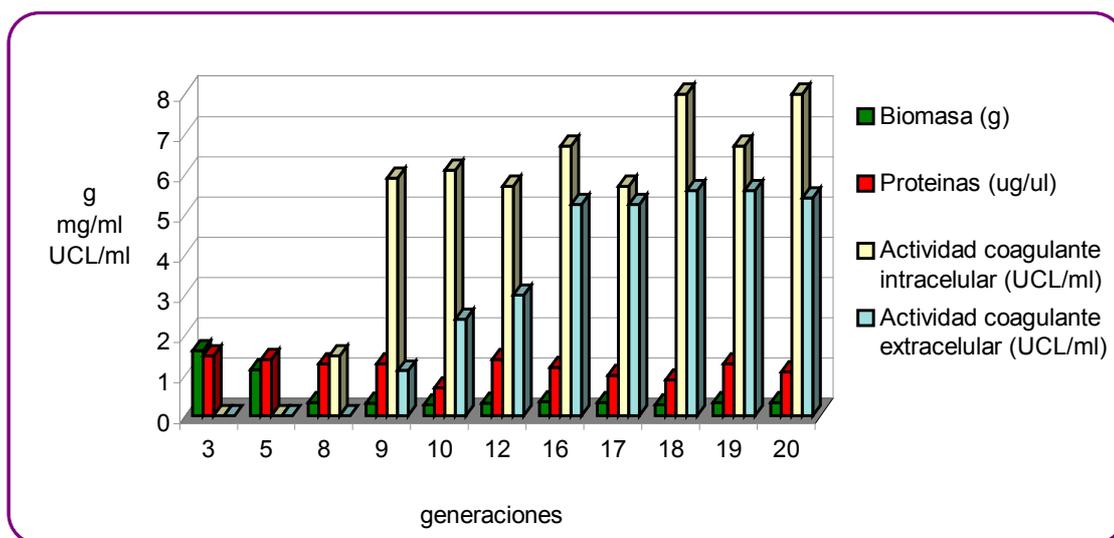


Figura 40.- Biomasa, proteínas totales y actividad coagulante de la leche intra- y exocelular de callos de *C. scolymus* L. cv. Green Globe cultivados en el medio 6 (ANA 10 mg l⁻¹ / BA 1 mg l⁻¹), en diferentes subcultivos, al cabo de 35 días de cultivo.

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 alcaucil.

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.

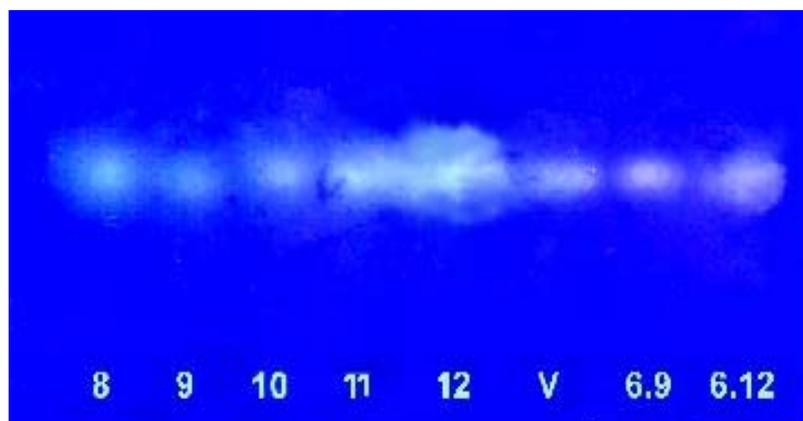
Como se indica en párrafos anteriores, la incorporación de GA₃ en concentraciones de 5 y 10 mg l⁻¹ no incrementó la producción de peptidasas aspárticas coagulantes de la leche. Esto coincide con los resultados de Bethke *et al.* (1996), quienes encontraron que si bien la actividad de las peptidasas cisteínicas (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

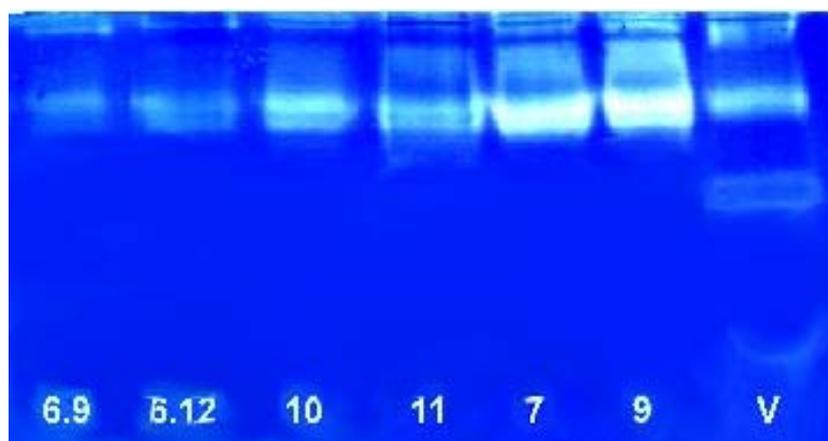
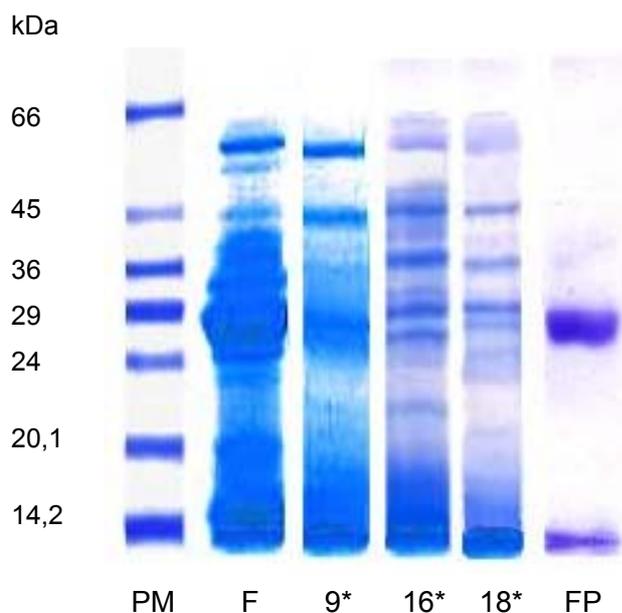


Figura 41.- Zimogramas de los extractivos de las flores maduras y de callos de *C. scolytus* L. cv. Green Globe obtenidos por electroforesis nativa (PAGE) y usando gelatina como sustrato.



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.

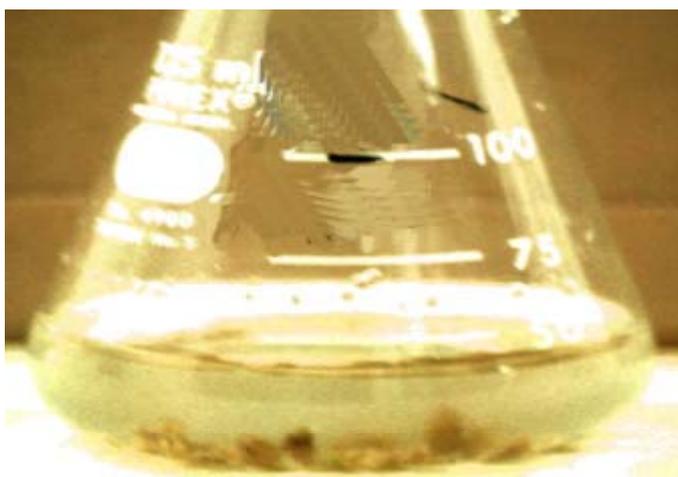


Figura 44.- Cultivo de agregados celulares de alcaucil en medio con ANA 10 : BA 1.

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 biomاسas 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*).

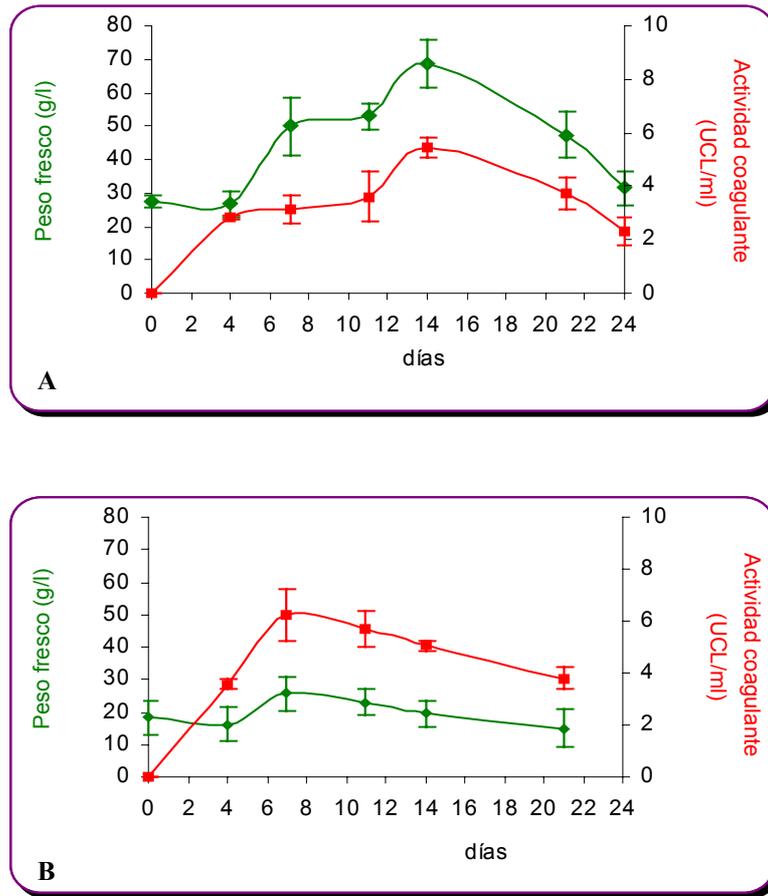


Figura 45.- Cinética de crecimiento y de liberación exocelular de peptidasas por los cultivos de agregados celulares de *C. scolyms* L. cv. Green Globe obtenidos a partir de callos en **A)** fase estacionaria y **B)** fase exponencial. Las barras indican la desviaciones estándar de 4 mediciones.

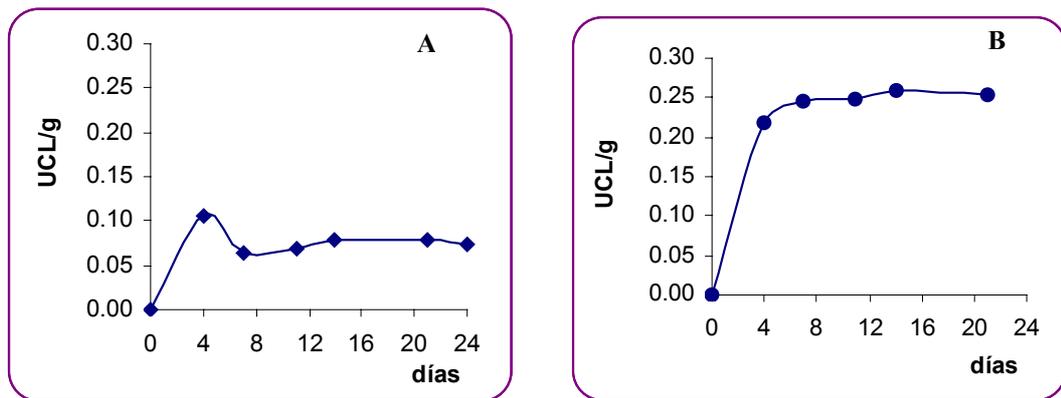


Figura 46.- Actividad peptidásica exocelular por gramo de peso fresco de los cultivos de agregados celulares de *C. scolyms* L. cv. Green Globe obtenidos a partir de callos en **A)** fase estacionaria y **B)** fase exponencial.

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.

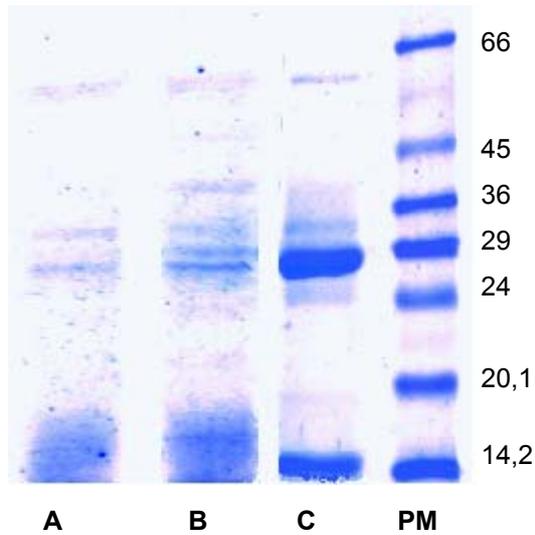


Figura 47.- SDS-PAGE de las proteínas liberadas al medio exocelular por agregados celulares de *Cynara scolymus* L.

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)

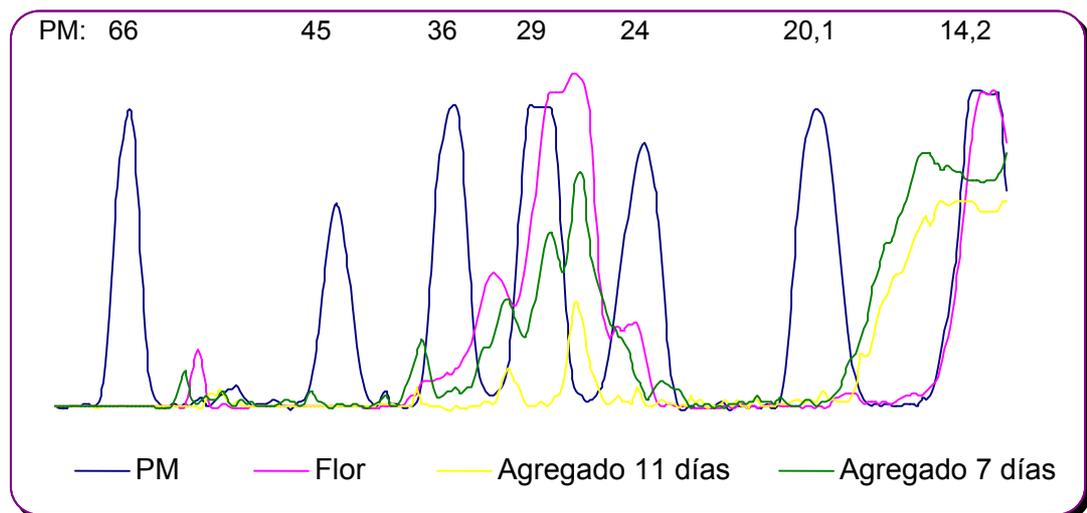


Figura 48.- Densitograma del SDS-PAGE de la Figura 47.

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*).

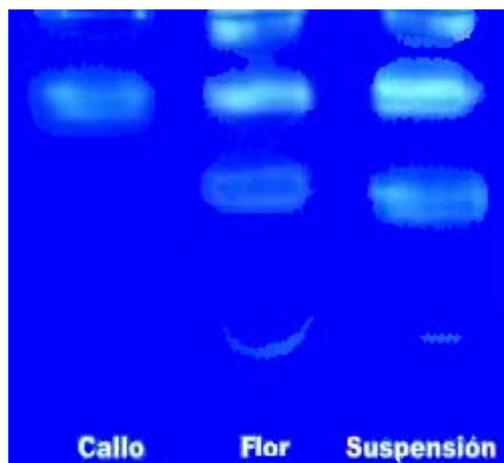
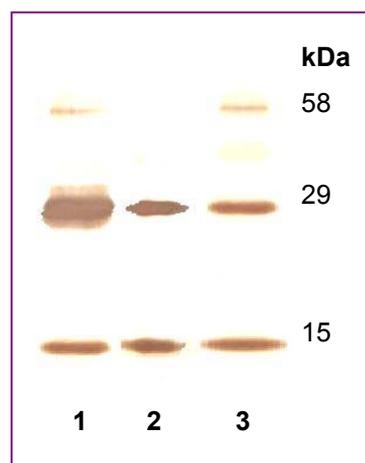


Figura 49.- Zimograma de los extractivos de callos y flores maduras y del medio exocelular de los cultivos de agregados celulares por electroforesis nativa usando gelatina incluida como sustrato.

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%.

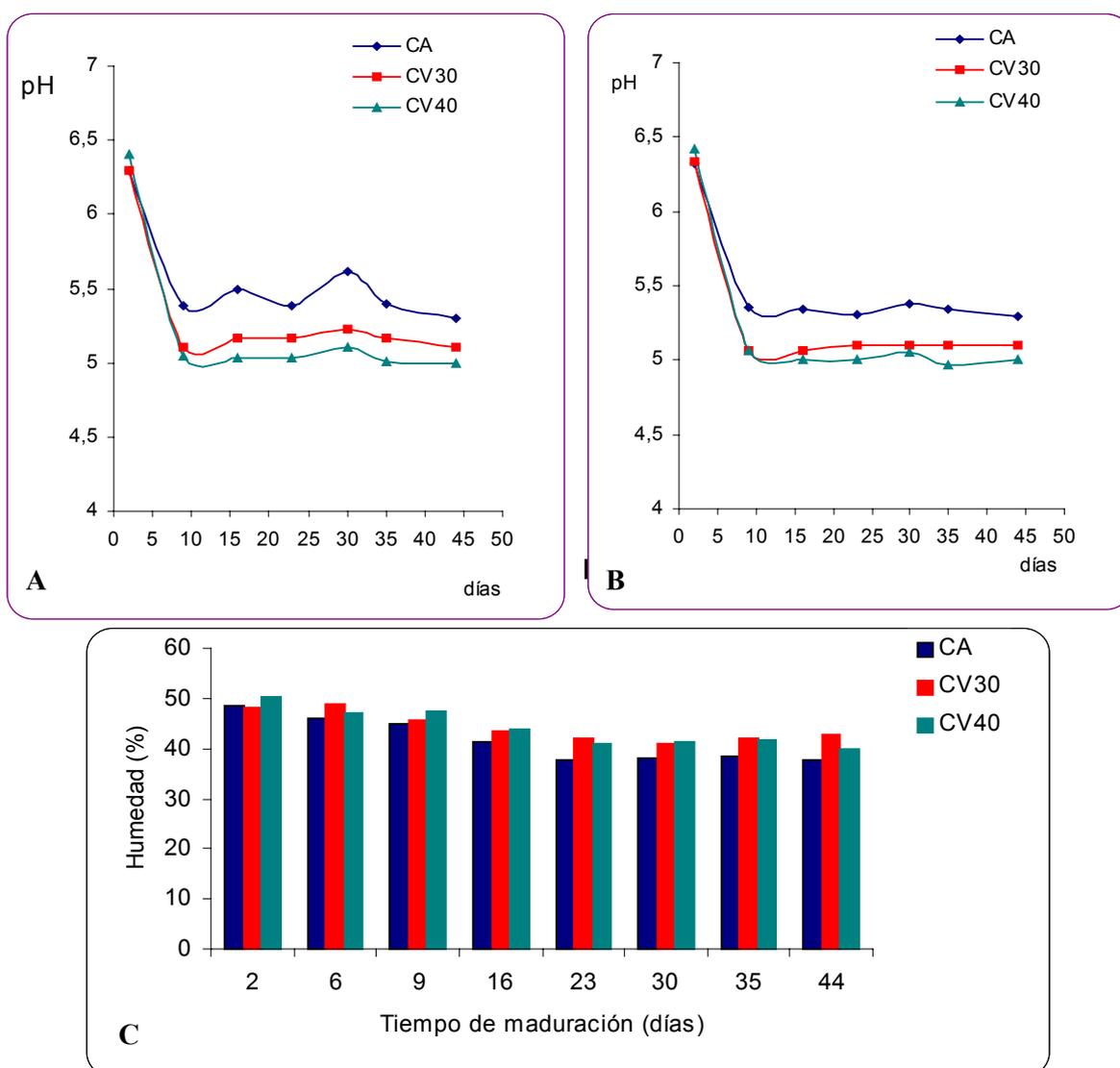


Figura 51.- Evolución de: (A) pH en la superficie, (B) pH en el centro y (C) la humedad (C) durante la maduración de quesos tipo Gouda elaborados con cuajo animal (CA) en condiciones estándar y con cuajo vegetal salado durante 30 horas (CV30) o 40 horas (CV40).

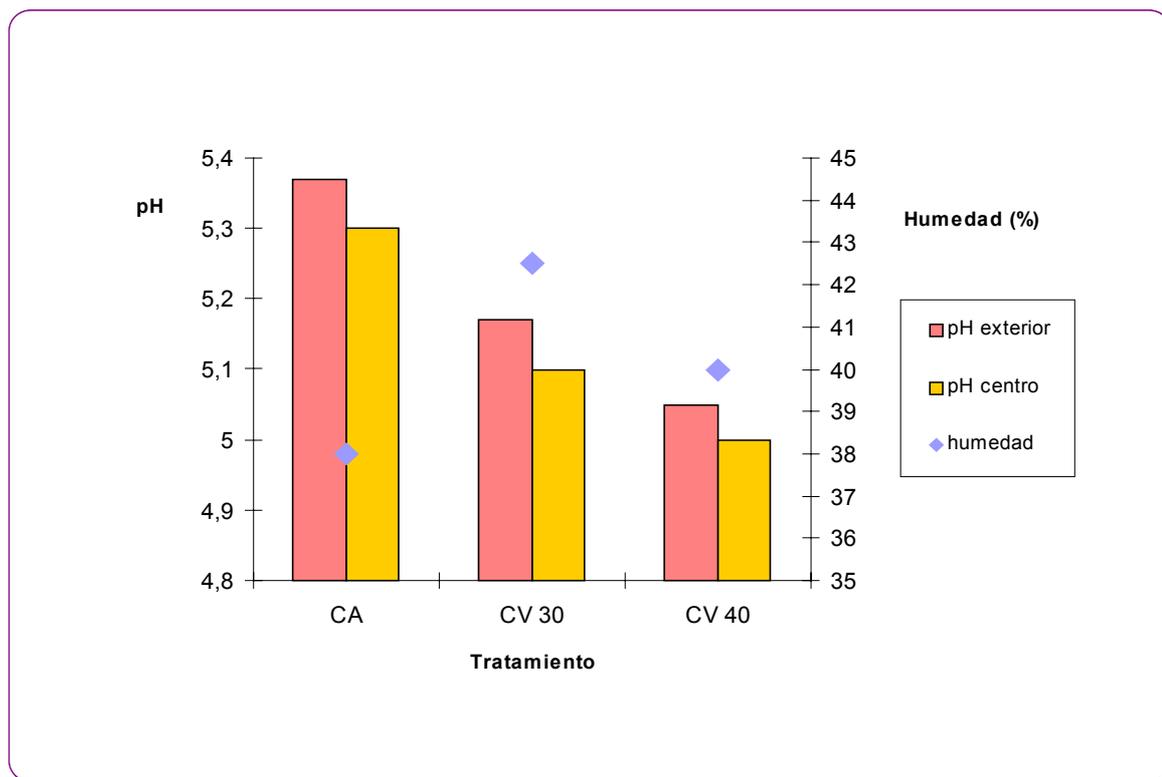


Figura 52.- Porcentaje de humedad y pH en la superficie y en el centro de los quesos Gouda elaborados con cuajo animal (CA) y con cuajo vegetal salados durante 30 horas (CV30) y 40 horas (CV40), al final de la maduración (44 días)

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.

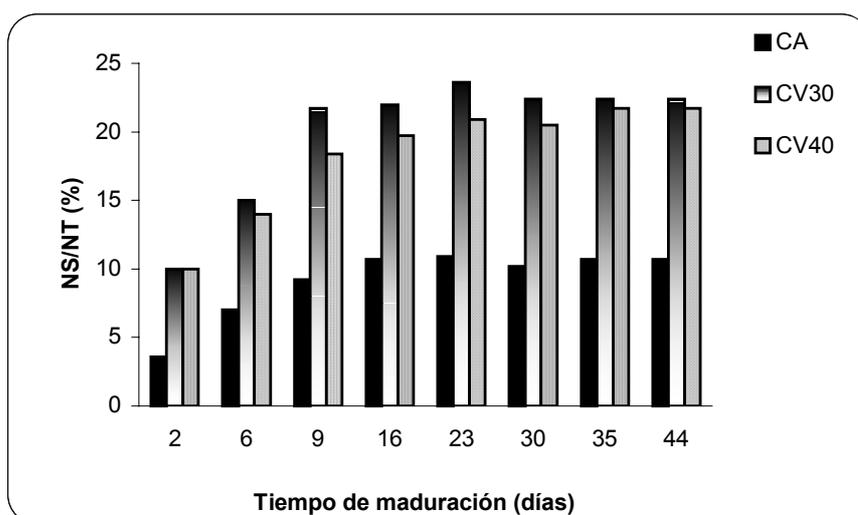


Figura 53.- Relación del nitrógeno soluble en agua (NS) como proporción del nitrógeno total (NT) en los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y vegetal con 30 horas (CV30) o 40 horas (CV40) de salado, durante la maduración de quesos tipo Gouda.

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).

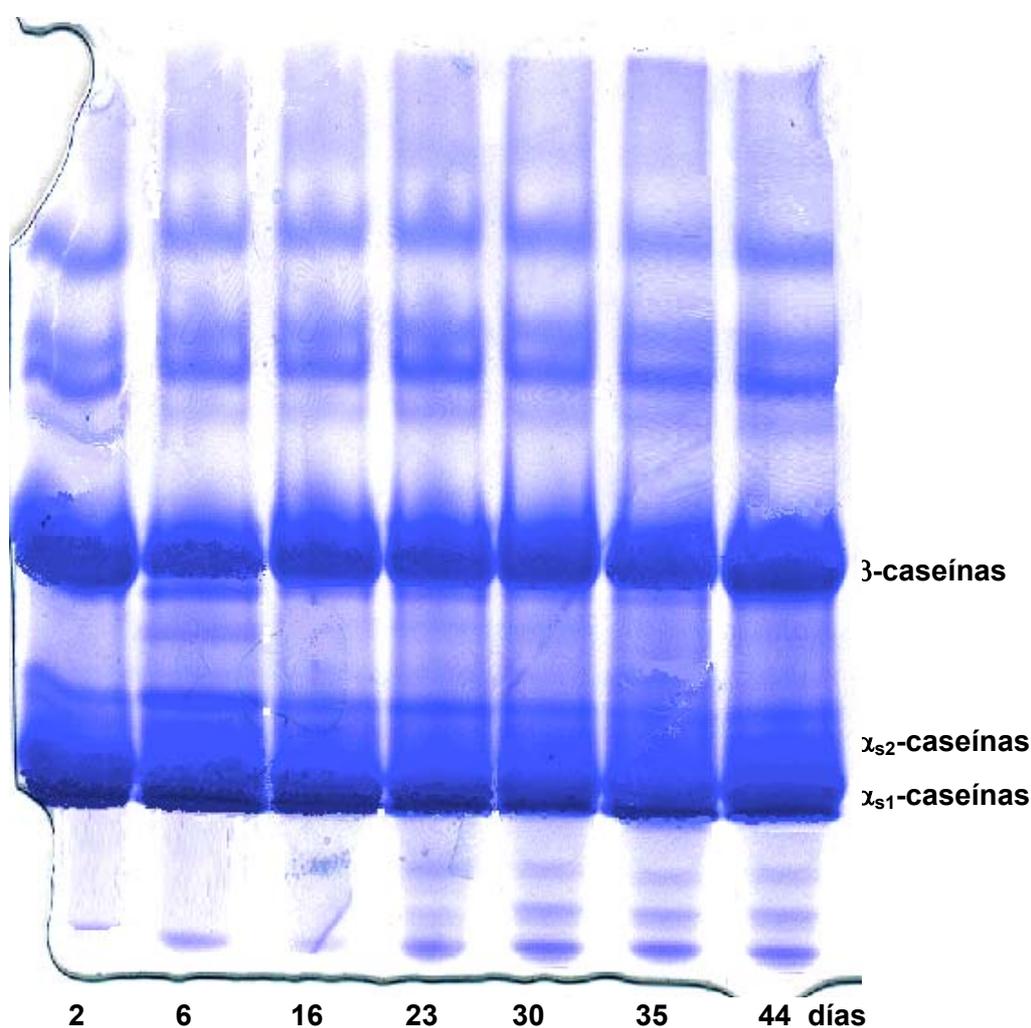


Figura 54.- Electroforesis urea-PAGE de la fracción insoluble en agua de quesos tipo Gouda elaborados con cuajo animal, a lo largo de la maduración.

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.

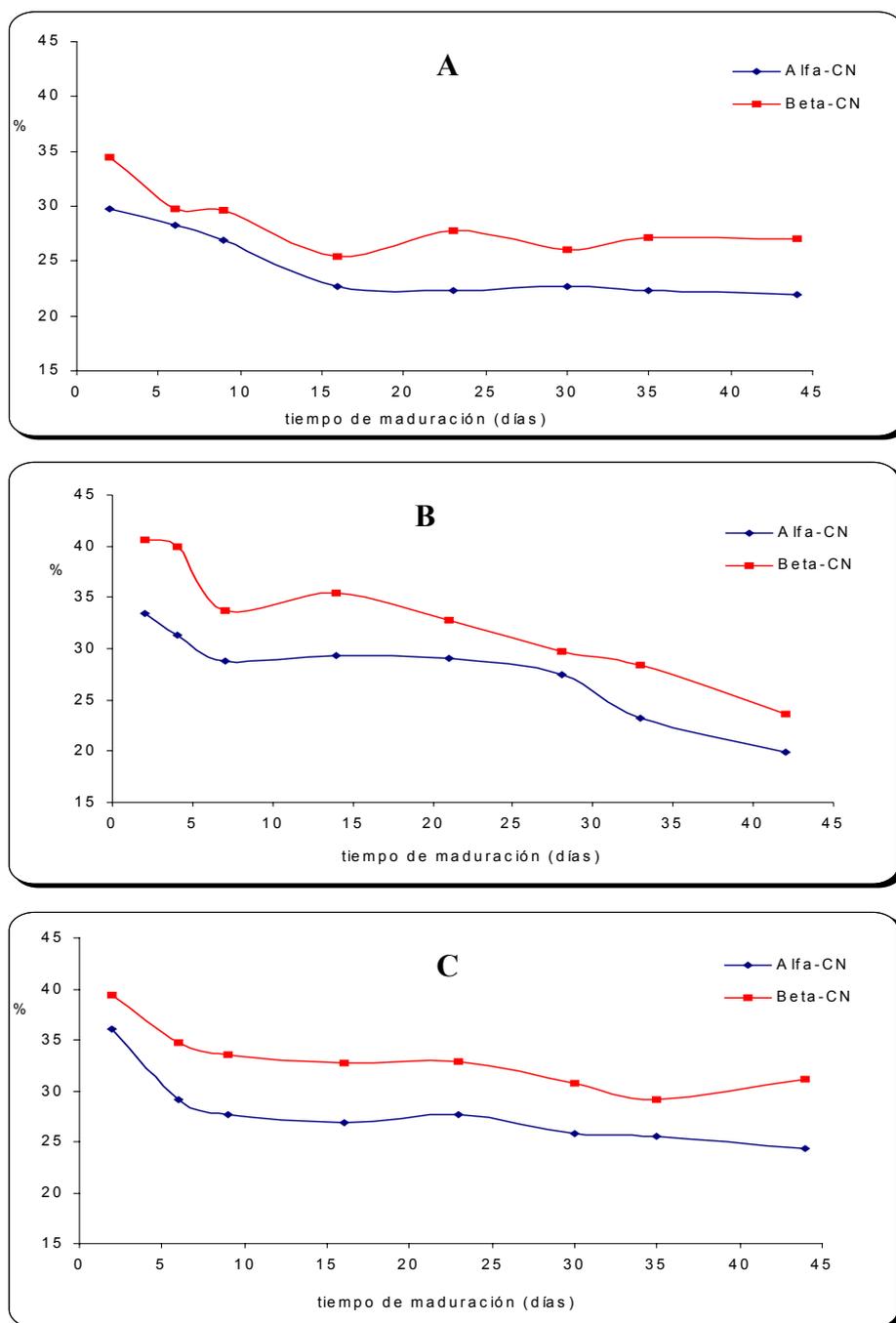


Figura 55.- Evolución durante la maduración de α_s - y β -caseínas (como porcentaje de las proteínas totales) de la fracción insoluble en agua de los quesos Gouda preparados con (A) cuajo animal en condiciones estándar, (B) cuajo vegetal-30 horas de salado y (C) cuajo vegetal-40 horas de salado.

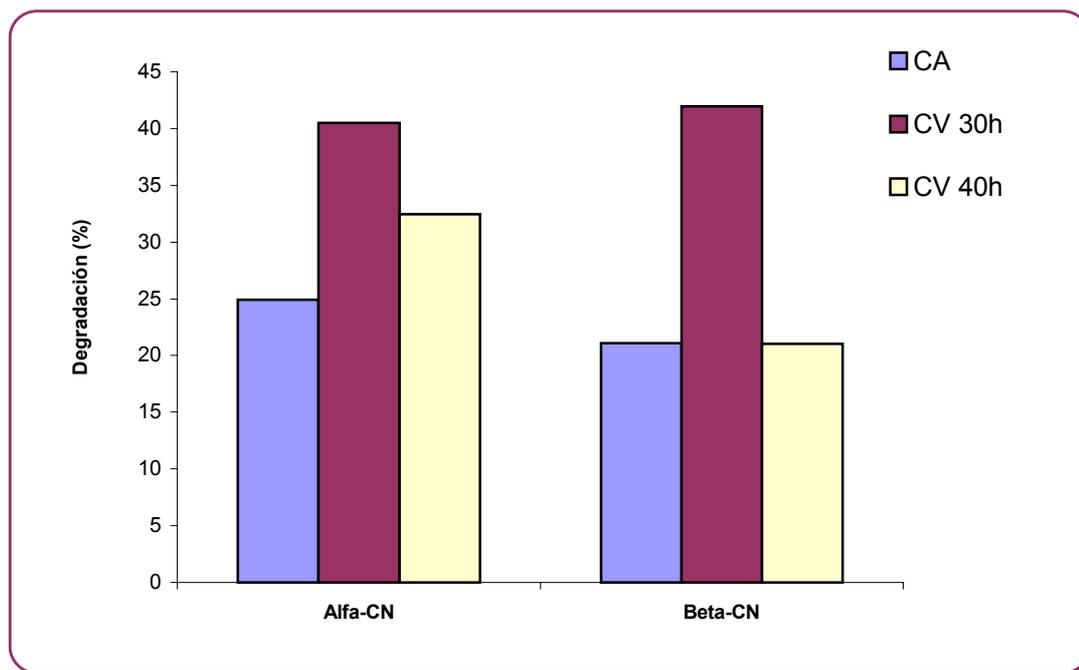


Figura 56.- Porcentajes de degradación de α - y β -caseínas (CN) [referido al contenido inicial de cada caseína] al cabo de 44 días de maduración de los quesos Gouda elaborados con cuajo animal (CA) y cuajo vegetal (CV) con 30 y 40 horas de salado, respectivamente.

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.

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 Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -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 isoelectroenfoque 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 autoprocésamiento 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 scolyms* 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⁻¹) 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⁻¹) 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 GA₃ en concentraciones de 5 y 10 mg l⁻¹ 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 α_s - y β -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 β -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*.

11.- BIBLIOGRAFIA

- Abel S & Theologis A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111: 9-17.
- Allen CA & Trewavas AJ (1994) Abscisic acid and gibberellin perception, inside or out? *Plant Physiol.* 104: 1107-1108.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Alvarez MA, Miranda MV, Cascone O & Giulietti AM (1995) Peroxidase production by *Armoracia lapathifolia* transformed roots. In: *Current Topics in Plant Physiology*. (DL Gustine & HE Flores, eds.). Vol. 15, pp. 305-307. American Society of Plant Physiologists Series. Phytochemicals and Health. USA.
- Amagase S (1972) Digestive enzymes in insectivorous plants III. Acid proteases in the genus *Nepenthes* and *Drosera peltata*. *J. Biochem.* 72: 73-81.
- Amagase S, Nakayama S & Tsugita A (1969) Acid protease in *Nepenthes*. II. Study on the specificity of nepenthesin, *J. Biochem.* 66: 431-439.
- Ancora G (1986) Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 2: Crops 1 (YPS Bajaj, ed.), pp.: 471-484. Springer-Verlag. Berlin.
- Ancora G, Belli-Donini ML & Cuozzo L (1981) Globe artichoke obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Scientia Hortic.* 14: 207-213.
- Anderson JW (1968) Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochem.* 7: 1973-88.
- Andrews AT (1983) Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50: 45-55.
- Anson I (1938) The estimation of pepsin, tripsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
- AOAC (1984) *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Inc. (S Williams, ed.). 14th edition. Arlington. Virginia. USA.
- Apte PV, Kaklij GS & Heble MR (1979) Proteolytic enzymes (bromelains) in tissue cultures of *Ananas sativus* (pineapple). *Plant Sci. Lett.* 14: 57-62.
- Areces LB, Biscoglio MJ, Parry MA, Fraile ER, Fernandez HM & Cascone O (1992) Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 37: 283-294.
- Arima K, Yu J & Iwasaki S (1970) Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. *Meth. Enzymol.* 19: 446-459.

- Arribére MC, Cortadi AA, Gattuso MA, Bettiol MP, Priolo NS & Caffini NO (1998) Comparison of *Asclepiadaceae* latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. cysteine peptidase. *Phytochem. Anal.* 9: 1-7.
- Arribére MC, Vairo Cavalli SE, Priolo NS, Caffini NO, Gattuso MA & Cortadi AA (1999) Proteolytic enzymes from the latex of *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*). *Acta Hort.* 501: 259-268
- Asakura T, Abe K & Arai S (1995a). Evidence for the occurrence of multiple aspartic proteinases in rice seeds. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (9): 1793-1794.
- Asakura T, Watanabe H, Abe K & Arai S (1995b). Rice aspartic proteinase, oryzasin, expressed during seed ripening and germination, has a gene organization distinct from those of animal and microbial aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* 232: 77-83.
- Asakura T, Watanabe H, Abe K & Arai S (1997) Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization, and application to milk clotting. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1070-1075.
- Avila EA (1987) *El alcaucil o alcachofa. Planta hortícola y medicinal.* pp:1-28. El Ateneo. Bs.As.
- Aword OC & Muller HG (1987) Cheese-making properties of vegetable rennet from Sodom apple (*Calotropis procera*). *Food Chem.* 26: 71-79.
- Aword OC & Nakai S (1986) Extraction of milk clotting enzyme from Sodom apple (*Calotropis procera*). *J. Food Sci.* 51: 1569-1570.
- Baaziz M, Aissam F, Brakez Z, Bendiab K, El Hadrami I & Cheikh R (1994) Electrophoretic patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxidase and polyphenoloxidase typifying calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars in Morocco. *Euphytica* 76: 159-168.
- Bajaj YPS (1988) *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- Barendse GWM & Peeters TJM (1995) Multiple hormonal control in plants. *Acta Bot. Neerl.* 44: 3-17.
- Barrett AJ (1994) Classification of peptidases. *Meth. Enzymol.* 244: 1-15.
- Barrett AJ, Rawlings ND & Woessner JF (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes.* Academic Press, UK.
- Barros MT, Carvalho MG, García FAP & Pires EMV. (1992) Stability performance of *Cynara cardunculus* L. acid protease in aqueous-organic biphasic systems. *Biotechnol. Lett.* 14: 179-184.
- Batkin S, Taussing SJ & Szekerczes J (1988a) Modulation of pulmonary metastasis (Lewis lung carcinoma) by bromelain, an extract of pineapple stem (*Ananas comosus*). *Cancer Invest.* 6: 241-242.

- Batkin S, Taussing SJ & Szekerczes J (1988b) Antimetastatic effect of bromelain with or without its proteolytic and anticoagulant activity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114: 507-508.
- Behrend J & Mateles RI (1975) Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I. Effect of amino acids on growth. *Plant Physiol.* 56: 584-589.
- Bell AA (1981) The physiological role(s) of secondary (natural) products. In: *The Biochemistry of Plants. 7: Secondary Plant Products.* (EE Conn,ed.), pp: 1-19. Academic Press. New York. USA.
- Belozersky MA, Dunaevsky YE, Rudenskaya GN & Stepanov VM (1984) Carboxyl proteinases from buckwheat seeds. *Biochemistry (USSR)* 49: 401-407.
- Belozersky MA, Sarbakanova ST & Dunaevsky YE (1989) Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. *Planta* 177: 321-326.
- Bernholdt HF (1982) The use of enzymes en the tenderization of meat. In: *Use of Enzymes in Food Technology*, (P Dupuy, ed.), pp.: 395-398. Technique et Documentation Lavoisier. Paris.
- Bernstein NK & James MNG (1999) Nobel ways to prevent proteolysis – prophytepsin and proplasmepsin II. *Curr. Opin. Structr. Biol.* 9: 684-689.
- Bethke PC, Hillmer S & Jones RI (1996) Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone: Identification of aspartic and cysteine proteases. *Plant Physiol.* 110: 521-529.
- Biehl B, Heinrichs H, Ziegeler-Berghausen H, Srivastava S, Xiong Q, Passern D, Senyuk VI & Hammour M (1993) The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angew. Bot.* 67: 59-65.
- Bigot C & Foury C (1984) Multiplication *in vitro* d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) á partir de semences: comparaison au champ de quelques clones á la lignée dont ils sont issus. *Agronomie* 4: 699-710.
- Blinda A, Abou-Mandour A, Azarkovich M, Brune A & Dietz K (1996) Heavy metal-induced changes in peroxidase activity inleaves, roots and cell suspension cultures of *Hordeum vulgare* L. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (C Obinger, U Burner, R Ebermann, C Penel & H Greppin, eds.), pp.: 374-379. University of Geneve, Switzerland.
- Boller T (1986) Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms. In: *Plant Proteolytic Enzymes.* Vol. 1 (MJ Dalling, ed.) pp: 67-96. CRC Press Inc. Boca Ratón. Florida. USA.
- Bouque V, Bourgaud F, Nguyen C & Guckert A (1998) Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53: 35-40.
- Bourgeois J & Malek L (1991) Purification and characterization of an aspartyl proteinase from dry jack pine seeds. *Seed Sci. Res.* 1: 139-147.

- Bouza L, Jacques M, Sotta B & Miginiac E (1993) The differential effect of N⁶-benzyladenine and N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine on *in vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. is correlated with different hormone contents. *Plant Cell Rep.* 12: 593-596.
- Bradford MB (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 528-530.
- Brain KR (1976) Accumulation of L-DOPA in cultures from *Macuna pruriens*. *Plant Sci. Lett.* 7: 157-161.
- Bricage P (1988) The isoperoxidase pattern changes and the pigment changes of *Pedilanthus tithymaloides* L. *variegatus* calli as a result of sucrose concentration and phytohormone content of the culture medium and daily temperature differences. *Plant Sci.* 55: 169-173.
- Brito C (1986) Desarrollo de variedades de quesos elaborados con leche de cabra y mezclada con leche de vaca. In: *Manual de Elaboración de Quesos*. Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Lechería de FAO para América Latina. Santiago. Chile.
- Brule G & Lenoir J (1990) La coagulación de la leche. En: *El Queso* (A Eck, ed.), pp.: 3-13. Ediciones Omega. Barcelona. España.
- Brutti C, Apóstolo N, Ferrarotti S, Llorente B & Krymkiewicz N (2000). Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. *Scientia Hort.* 83: 1-10.
- Caffini NO, Lopez LMI, Natalucci CL & Priolo NS (1988) Proteasas de Plantas Superiores I. Características generales, rol fisiológico y aplicaciones. *Acta Farm. Bonaerense* 7: 195-213.
- Charney J & Tomarelli RM (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* 171: 501-505.
- Choisy C, Desmazeaud M, Gripon JC, Lamberet G, Lenoir J & Tourneur C (1990) Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. In: *El Queso*, ed. A Eck, pp: 57-91. Ediciones Omega. Barcelona. España.
- Christianson ML & Hornbuckle JS (1999) Phenylurea cytokinins assayed for induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. *Amer. J. Bot.* 86: 1645-1648.
- Chrzanowska J, Kolaczowska M, Dryjanski M, Stachowiak D & Polanowski A. (1995) Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: purification, properties, and substrate specificity. *Enz. Microb. Technol.* 17: 719-724.
- Cleland RE (1995) Auxin and cell elongation. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (PJ Davies, ed.), pp: 214-227. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands.
- Coleman GD & Ernst SG (1991) Protein differences among *Populus deltoides* internodal stem explants determined for shoot regeneration or callus growth. *Plant Sci.* 75: 83-92.

- Conger BV (1987) *Cloning Agricultural Plants Via In Vitro Techniques*. CRC Press. Florida. USA.
- Constabel F & Tyler RT (1994) Cell culture for production of secondary metabolites. In: *Plant Cell and Tissue Culture* (IK Vasil & TA Thorpe, eds.), pp.: 271-289. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands.
- Cordeiro MC, Jakob E, Puhan Z, Pais MS & Brodelius PE. (1992) Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus*: a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft* 47: 681-687.
- Cordeiro MC, Pais MS & Brodelius PE. (1994a) Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiol. Plant.* 92: 645-653.
- Cordeiro MC, Pais MS & Brodelius PE. (1998) *Cynara cardunculus*. subsp. *flavescens* (cardo): in vitro culture, and the production of cyprosin (milk-clotting enzymes). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 41 Medicinal and Aromatic Plants X* (YPS Bajaj, ed.), pp.: 132-153. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. Germany.
- Cordeiro MC, Xue ZT, Pietrzak M, Pais MS & Brodelius PE. (1993) Proteases from cell suspension cultures of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry* 33: 1323-1326.
- Cordeiro MC, Xue ZT, Pietrzak M, Pais MS & Brodelius PE. (1994b) Isolation and characterization of a cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant Mol. Biol.* 24: 733-741.
- Cormier F, Charest C & Dufresne C (1989) Partial purification and properties of proteases from fig (*Ficus carica*) callus cultures. *Biotechnol. Lett.* 11: 797-802.
- Costa J, Ashford DA, Nimitz M, Bento I, Frazao C, Esteves CL, Faro CJ, Kervinen J, Pires E Verissimo P, Wlodawer A & Carondo MA (1997) The glycosylation of the aspartic proteinases from barley (*Hordeum L.*) and cardoon (*Cynara cardunculus L.*) *Eur. J. Biochem.* 243: 695-700
- Cramer C, Boothe J & Oishi K (1999) Transgenic plants for therapeutic proteins. Linking upstream and downstream strategies. In: *Plant Biotechnology. New Products and Applications* (J Hammond, P McGarvey & V Yusibov, eds.), pp.: 95-118. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Creche J, Guiller J, Andreu F, Grass M, Chenieux JC & Rideau M (1987) Variability in tissue cultures of *Choisya ternata* originating from a single tree. *Phytochemistry* 26: 1947-1953.
- Cuenca J, García-Florenciano E, Ros Barceló A & Muñoz R (1989) Sequential release of both basic and acidic isoperoxidases to the media of suspension cultured *Capsicum annum*. *Plant Cell Rep.* 8: 471-474.
- Dalgleish DG (1992) The enzymatic coagulation of milk. In: *Advanced Dairy Chemistry I: Proteins* (PF Fox, ed.), pp.: 579-619. Elsevier Applied Science. Elsevier Science Publishers Ltd. England.

- Davies BJ (1964) Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Davies DR (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19: 189-215.
- Davies PJ (1995) The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (PJ Davies, ed.), pp.: 1-12. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands.
- De Fossard RA (1976) *Tissue Culture for Plant Propagators*. University of New England. Dept. of Botany. Armidale. Australia.
- Debergh P, Harbouy Y, Lemeur R (1981) Mass propagation of Globe artichoke (*Cynara scolymus*). Evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53: 181-187.
- Del Grosso E, Grazia S & Maraldi AC (1987) Peroxidase activity in *Phaseolus vulgaris* seedling tissues and callus cultures: a comparison of fenotypes and development stages. *Environ. Exp. Bot.* 27: 387-394.
- Devos P, De Bruijne E, De Langhe E (1975) Influence of 2,4-D on the propagation of *Cynara scolymus* L. *in vitro*. *Meded. Fac. Landb. Rijksuniv. Gent.* 40: 829-836.
- D'Hondt K, Bosch D, Van Damme J, Goethals M, Vanderckhove J & Krebbers E (1993) An aspartic proteinase present in seeds cleaves *Arabidopsis* 2S albumin precursors *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 268: 20884-20891.
- D'Hondt K, Stack S, Gutteridge S, Vandekerckhove J, Krebbers E, Gal S (1997) Aspartic proteinase genes in the Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 33: 187-192.
- Di Cosmo F & Misawa M (1995) Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnol. Adv.* 13: 425-453.
- Di Cosmo F & Towers GHN (1984) Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In: *Phytochemical Adaptations to Stress* (BN Timmermann, C Steelink & FA Loewus, eds.) pp.: 97-175. Plenum Press. New York. USA.
- Dimitri, MJ (1979) *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Tomo I, Vol. II, pp.: 1064-1065. Editorial Acme. Buenos Aires. Argentina.
- Dix PJ, Butler Y, Dix Y & Parkinson M (1993) Influence of calcium ions and stress on peroxidase secretion by horseradish cell suspension cultures. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel & H Greppin, eds.), pp.: 457-460. University of Copenhagen and University of Geneva.
- Dixon RA (1985) *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. IRL Press Ltd. Oxford. UK.
- Doi E, Shibata D, Matoba T & Yonezawa D (1980) Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds. *Agric. Biol. Chem.* 44: 741-747.
- Domingos A, Xue Z, Guruprasad K, Clemente a, Blundell T, Pais MS & Brodelius PE (1998) An aspartic proteinase from flowers of *Centaurea calcitrapa*. Purification,

- characterization, molecular cloning, and modelling of its three-dimensional structure. In: *Aspartic Proteinases* (MNG James, ed.), pp.: 465-472. Plenum Press. New York. USA.
- Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 199-204.
- Dougall DK (1980) Nutrition and metabolism. In: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals* (EJ Staba, ed.), pp: 21-58. CRC Press. Boca ratón. Florida. USA.
- Dunaevsky YE, Sarbakanova ST & Belozersky MA (1989) Wheat seed carboxypeptidase and join action on gliadin of proteases from dry and germinating seeds. *J. Exp. Bot.* 40: 1323-1329.
- Dziuba J, Minkiewicz P, Nalecz D, Iwaniak A (1999) Database of biologically active peptide sequences. *Die Nahrung* 43: 190-195.
- Eck A (1990) La coagulación de la leche. En: *El Queso* (A Eck, ed.), pp.: 3-20. Ediciones Omega. Barcelona. España.
- Elleman CJ & Dickinson HG (1990) The role of exine coating in pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea* L. *New Phytol.* 114: 511-518.
- Elleman CJ & Dickinson HG (1994) Pollen-stigma interactions during sporophytic self-incompatibility in *Brassica oleracea*. In: *Genetic Control of Self-incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants* (EG Williams, AE Clarke & RB Knox, eds.), pp.: 67-87. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- El-Negoumy SI, El-Ansari MAI, Saleh NAM (1987) Flavonoid glycosides of *Cynara scolymus*. *Fitoterapia* 58: 178-180.
- Elpidina EN, Dunaevsky YE & Belozersky MA (1990) Protein bodies from buckwheat seed cotyledons: isolation and characteristics. *J.Exp. Bot.* 41: 969-977.
- Ertola RJ, Giulietti AM & Castillo FJ (1994) Design, formulation and optimization of media. In: *Bioreactors Systems Design* (J Asenjo & J Merchuk, eds.), pp.: 89-137. Marcel Dekker. New York. USA.
- Espino FJ & Vazquez AM (1985) Phytohormone influence on the expression of two isozyme systems in *Nicotiana suaveolens* calluses. *Plant Sci.* 39: 195-198.
- FAO (1986) Fundamentos químicos, físicos y microbiológicos en la elaboración y maduración de quesos. En: *Manual de Elaboración de Quesos*. Capítulo 6. Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Lechería de FAO para América Latina. Santiago. Chile.
- FAO/OMS (1973) Code des Principes Concernant le Lait et les Produits Latieres. CAC M/1, 137 pp.
- Faro CJ, Alface JS & Pires EV. (1987) Purification of a protease from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *Ciênc.Biol.* 12(5A): 201.

- Faro CJ, Moir AJG & Pires EV. (1992) Specificity of a milk clotting enzyme extracted from the thistle *Cynara cardunculus* L.: action on oxidised insulin and κ -casein. *Biotechnol. Lett.* 14: 841-846.
- Faro CJ, Ramalho-Santos M, Veríssimo P, Pissarra J, Frazão C, Costa J, Tang J & Pires E (1998) Structural and functional aspects of cardosins. In: *Aspartic Proteinases* (MNG James, ed.), pp.: 423-433. Plenum Press. New York. USA.
- Faro CJ, Ramalho-Santos M, Vieira M, Mendes A, Simões I, Andrade R, Veríssimo P, Lin X, Tang J & Pires E (1999) Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *J. Biol. Chem.* 274: 28724-28729.
- Faro C, Veríssimo P, Lin Y, Tang J & Pires E (1995) Cardosin A and B, aspartic proteases from the flowers of cardoon. In: *Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology and, Biomedical Implications* (K Takahashi, ed.), pp.: 373-377. Plenum Press. New York. USA.
- Fernández-Salguero J & Sanjuán E (1999) Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chem.* 64: 177-183.
- Fett-Neto AG, Zhang WY & DiCosmo F (1994) Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 205-210.
- Fevreiro P, Cabral JMS, Fonseca M, Novais JM & Pais S. (1986) Callus and suspension culture of *Sylibum marianum* biosynthesis of proteins with clotting activity. *Biotechnol. Lett.* 8: 19-24.
- Fiat AM, Migliore-Samour D, Jolles P, Drouet L, Sollier CB & Caen J (1993) Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.* 76: 301-310.
- Figueiredo AC, Fevreiro P, Cabral JMS, Novais JM & Pais S. (1987) Callus and suspension cultures for biomass production of *Cynara cardunculus* (Compositae). *Biotechnol. Lett.* 9: 213-218.
- Flocco CG, Alvarez MA & Giulietti AM (1998) Peroxidase production *in vitro* by *A Armoracia lapathifolia* (horseradish)-transformed root cultures: effect of elicitation on level and profile of isoenzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28: 33-38.
- Flocco CG & Giulietti AM (1999) Detoxification of phenol by alfalfa seedling. In: *Proceedings of the Global Symposium on Recycling Waste Treatment and Clean Technology. Vol III* (I Gaballah, J Hager & R Solozabal, eds.) 2259-2265. ISBN 84-92-3445-55.
- Foltmann B & Szecsi PB (1998) Chymosin. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, eds. AJ Barrett, ND Rawlings & JF Woessner, pp: 815-819. Academic Press. London. UK.
- Foltmann B (1993) General and molecular aspects of rennets. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 1*, ed. PF Fox, pp: 37-68. Chapman S Hall. London. UK.

- Fowler M & Stafford A (1992) Plant cell culture, process systems and product synthesis. In: *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology. Second Supplement*, (M Fowler, G Warren & M Moo-Young, eds.) pp.: 79-98. Pergamon Press. England.
- Frazão C, Bento I, Costa J, Soares CM, Veríssimo P, Faro C, Pires E, Cooper J & Carrondo MA (1999) Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *J. Biol. Chem.* 274: 27694-27711.
- Frith GJT, Peoples MB & Dalling MJ (1978) Proteolytic enzymes in green wheat leaves III. Inactivation of acid proteinase by diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester and 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)-propane. *Plant Cell Physiol.* 19: 819-824.
- Fujikura Y & Karssen CM (1995) Molecular studies on osmoprimed seeds of cauliflower: a partial amino acid sequence of a vigour related protein and osmopriming enhanced expression of putative aspartic protease. *Seed Sci. Res.* 5: 177-181.
- Fujita Y, Hara Y, Suga C & Morimoto T (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep.* 1: 61-63.
- Galleschi L, Capocchi A, Giannoni P & Floris C (1989) Proteinase activities in quiescent and germinating seeds of *xHaynaldoticum sardoum*. *Physiol. Plant.* 75: 1-6.
- Gamborg OL (1970) The effect of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 45: 372-375.
- Gamborg OL, Miller RA & Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- García-Martínez JL & Moreno J (1986) Proteolysis of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase /oxygenase in Citrus leaf extracts. *Physiol. Plant* 66: 377-383
- Garg KG & Virupaksha TK (1970) Acid protease from germinated sorghum. 2. Substrate specificity with synthetic peptidos and ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.* 17: 13-18
- Gazaryan IG, Urmantseva VV, Veryovkin AN & Fechina VA (1991) Peroxidase preparation from *Medicago sativa* L cell culture. In: *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (J Lobarzewski, H Greppin, C Penel & T Gaspar, eds.), pp.: 505-506. University of Geneve. Switzerland.
- Gebhardt R (1998) Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 286: 1122-1128.
- George EF (1987a). Factors affecting growth and morphogenesis. I. Genotype and the physical environment. In: *Plant Propagation by Tissue Culture. Part I: The Technology* (E. George, ed.), pp.: 183-230. 2nd Ed. Exegetics. Edington. UK.
- George EF (1987b). Plant growth regulators. In: *Plant Propagation by Tissue Culture. Part I: The Technology* (E. George, ed.), pp.: 420-463. 2nd Ed. Exegetics. Edington. UK.

- Gil Díaz V, Martínez Turiño S & Mas Castellanos L (1998) Transformación genética. In: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología* (JN Pérez Ponce, ed.), pp.: 369-390. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. Cuba.
- Giulietti AM & Ertola RJ (1999) Biotechnological strategies for production of plants and secondary metabolites of pharmaceutical interest. *Acta Hort.* 502: 269-280.
- Glathe S, Kervinen J, Nimtz M, Li G, Tobin G, Copeland T, Ashford D, Wlodawer A & Costa J (1998) Transport and activation of the vacuolar aspartic proteinase phytepsin in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Biol. Chem.* 273: 31230-31236.
- Gómez Kosky R (1998a) Cultivo de células y tejidos. In: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, ed. JN Pérez Ponce, pp: 25-44. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. Cuba.
- Gómez Kosky R (1998b) Embriogénesis somática. In: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, ed. JN Pérez Ponce, pp: 57-79. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. Cuba.
- Gray WM & Estelle M (1998) Biochemical genetics of plant growth. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 196-201.
- Guevara MG, Oliva CR, Machinandiarena M & Daleo GR (1999) Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase. *Physiol. Plant.* 106: 164-169.
- Gupta CB & Eskin NAM (1977) Potencial use of vegetable rennet en the production of cheese. *Food Technol.* 77: 62-65.
- Guruprasad K, Tormakangas K, Kervinen J & Blundell TL (1994) Comparative modelling of barley-grain aspartic proteinase: a structural rationale for observed hydrolytic specificity. *FEBS Lett.* 352: 131-136
- Hammond J (1999) Overview: the many uses and applications of transgenic plants. In: *Plant Biotechnology. New Products and Applications* (J Hammond, P McGarvey & V Yusibov, eds.), pp.: 1-20. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Germany.
- Hammouda FM, Seif-EI-Nasr MM, Shahat AA (1993) Flavonoids of *Cynara scolymus* L. cultivated in Egypt. *Plant Foods Hum. Nutr.* 44: 163-169.
- Harbaoui Y, Samijn G, Welvaert W & Debergh P (1982) Assainissement viral de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par la culture in vitro d'apex méristématiques. *Phytopath. Medit.* 21: 15-19.
- Hashimoto H, Nishi R, Uchimiya H & Kato A (1992) Nucleotide sequence of a cDNA encoding aspartic proteinase in rice. *EMBO Data Library D12777*.
- Heimgartner U, Pietrzak M, Geertsen R, Brodelius P, Da Silva Figueredo AC & Pais MSS (1990) Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry* 29: 1405-1410.
- Heller R (1953) Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 14: 1-223.
- Heller R (1954) Les besoins mineraux des tissus en culture. *Année Biolog.* 30: 260-281.

- Herbers K & Sonnewald U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 163-168.
- Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M & Hara-Nishimura I (1997) An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. *Eur. J. Biochem.* 246: 133-141.
- Hofmann T, Dunn BM & Fink AL (1984) Cryoenzymology of penicillopepsin. Appendix: Mechanism of action of aspartyl proteinases. *Biochem.* 23: 5247-5256.
- Huang L & Murashige T (1977) Plant tissue culture media: major constituents; their preparation and some applications. *Tissue Cult. Assoc. Man.* 3: 539-545.
- Illanes A (1994) *Biología de Enzimas*. OEA. Editorial Universidad de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. Chile
- Jiménez González E (1998) Generalidades del cultivo *in vitro*. In: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología* (JN Pérez Ponce, ed.), pp.: 13-24. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. Cuba.
- Joersbo M, Andersen JM, Okkels FT & Pedersen MG (1989) Effect of extracellular peroxidases on growth of carrot and sugar beet suspension cells. *J Plant Physiol.* 135: 369-372.
- Jones AM (1994) Auxin binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 45: 393-420.
- Kanakakis AG & Demetriou K (1993) *In vitro* shoot regeneration of globe artichoke from shoot apices treated with thidiazuron and from mature zygotic embryos treated with cytokinins. *J. Hort. Sci.* 68: 439-445.
- Kato Y, Uozumi N, Kimura T, Honda HI & Kobayashi T (1991) Enhancement of peroxidase production and excretion from horseradish hairy roots by light, NaCl and peroxidase-adsorption in situ. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 8: 158-165.
- Kaur-Sawhney R & Galston AW (1986) The role of polyamines in the regulation of proteolysis. In: *Plant Proteolytic Enzymes*. Vol. I (MJ Dalling, ed.), pp.: 141-148. CRC Press Inc. Boca Ratón. Florida. USA.
- Kervinen J, Sarkkinen P, Kalkkinen N, Mikola L & Saarma M (1993) Hydrolytic specificity of the barley grain aspartic proteinase. *Phytochemistry* 32: 799-803.
- Kervinen J, Tobin GJ, Costa J, Waugh DS, Wlodawer A & Zdanov A (1999) Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. *EMBO J.* 18: 3947-3955.
- Kervinen J, Tormakangas K, Runeberg-Roos P, Guruprasad K, Blundell T & Teeri TH (1995) Structure and possible function of aspartic proteinases in barley and others plants. In: *Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology and Biomedical Implications* (K Takahashi, ed.), pp.: 241-254. Plenum Press. New York.
- Kevers C, Sticher L, Penel C, Greppin H & Gaspar T (1983) The effect of ergosterol, ergocalciferol and cholecalciferol on calcium-controlled peroxidase secretion by sugarbeet cells. *Physiol Plant.* 57: 17-20.

- Khan AR & James MNG (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* 7: 815-836.
- Kim JW & Minamikawa T (1997) Expression and characterization of endopeptidase in suspension-cultured cells of french bean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 113-117.
- Kim YH & Yoo YJ (1996) Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. *Enz. Microbiol. Technol.* 18: 531-535.
- Kinnersly AM & Dougall DK (1980) Correlation between the nicotine content of tobacco plants and callus culture. *Planta* 154: 447-453.
- Knorr D & Miazga SM (1987) Production of protease from cell cultures of common milweed (*Asclepias syriaca* L.). *J. Agric. Food Chem.* 35: 621-624.
- Kobayashi H, Kim H, Itoh T, Sasamo K, Kusakabe I & Murakami K (1994) Screening for milk-clotting enzyme from basidiomycetes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 440-441.
- Krikorian AD (1991) Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: *Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (WM Roca & LA Mroginski, eds.), pp.: 41-70. CIAT. Cali. Colombia.
- Krikorian AD (1995) Hormones in tissue culture and micropropagation. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (PJ Davies, ed.), pp.: 774-796. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands.
- Kurz WGW, Chatson RB & Constabel F (1985) Biosynthesis and accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cultivars. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures* (KH Neuman, W Barz & E Reinhard, eds.) pp.: 143-53. Springer-Verlag. Berlin. Germany.
- Kuwabara T & Suzuki K (1995) Reversible changes in conformation of the 23-kDa protein of photosystem II and their relationship to the susceptibility of the protein to a proteinase from photosystem II membranes. *Plant Cell Physiol.* 36: 495-504.
- Kwak SS, Kim SK, Lee MS, Jung KH, Park IH & Liu JR (1995) Acidic peroxidases from suspension-cultures of sweet potato. *Phytochemistry* 39: 981-984.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lauzer D & Vieth J (1990) Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 21: 237-244.
- Lawless HT & Heymann H (1999) *Sensory Evaluation of Food*. Aspen Publ. USA.
- Lee M & Phillips RL (1988) The cromosomal basis of somaclonal variation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 39: 413-437.
- Lenoir J, Auberger B & Gripon JC (1979) Les caracteres du systeme proteolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caracterisation d' une protease acide. *Lait* 585/586: 244-268.

- Libbenga KR & Mennes AM (1995) Hormones binding and signal transduction. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (PJ Davies, ed.). pp.: 272-297. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands.
- Lima Costa ME, van Gulik WM, ten Hoopen HJG, Pais MSS & Cabral JMS (1996) Protease and phenol production of *Cynara cardunculus* L. cell suspension in a chemostat. *Enz. Microbiol. Technol.* 19: 493-500.
- Linnaeus C (1753) *Species Plantarum*, 2.
- Litz RE & Jarret RL (1991) Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: *Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (WM Roca & LA Mroginski, eds.), pp.: 143-152. CIAT. Cali. Colombia.
- López LMI (1995) Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (*Moraceae*). Tesis. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- López LMI, Sequeiros C, Natalucci CL, Brullo A, Maras B, Barra D & Caffini NO (2000) Purification and characterization of macrodontan I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudonanas macrodontes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*). *Prot. Expr. Purif.* 18: 133-140.
- Loukas S, Varoucha D, Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA (1983) Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins. *Biochem.* 22: 4567-4573.
- Macedo YQ, Faro CJ & Pires EM (1993) Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine κ -casein. *J.Agric. Food Chem.* 41: 1537-1540.
- Macek T, Macková M, Oéénásková J, Demnerová K, Pazlarová J & Koen V (1996) Peroxidase isoenzyme pattern and total activity changes in plant cells cultivated in vitro under abiotic stress. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (C Obinger, U Burner, R Ebermann, C Penel & H Greppin, eds.), pp.: 380-385. Universidad de Ginebra. Suiza
- Mader M & Walter C (1986) De-novo synthesis and release of peroxidases in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 169: 273-277.
- Makowski GS & Ramsby ML (1997) Protein molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Protein Structure, a Practical Approach* (TE Creighton, ed.), pp.: 1-26. Second edition. IRL Press. Oxford University Press. Oxford. UK.
- Mannerlöf M, Tuveesson S, Stern P & Tenning P (1997) Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. *Euphytica* 94: 83-91.
- Mantell SH & Smith H (1983) Cultural factors that influences secondary metabolites accumulation in plant cell and tissue culture. In: *Plant Biotechnology* (SH Mantell & H Smith, eds.), pp.: 75-108. Cambridge University Press. Cambridge.
- Marín JA (1993) Micropropagación de especies frutales. *HortoFrutic.* 1: 56-62.

- Marten I, Lohse G & Hedrich R (1991) Plant growth hormones control voltage dependent activity of anion channels in plasma membrane in guard cells. *Nature* 353: 759-763.
- Martin P (1984) Hydrolysis of the synthetic chromophoric hexapeptide Leu-Ser-Phe(NO₂)-Nle-ala-Leu-oMe catalysed by bovine pepsin A. *Biochem. Biophys. Acta* 791: 28-36.
- Maurer HR, Hozumi M, Honma Y & Okabe-Kado J (1988) Bromelain induces the differentiation of leukemic cells *in vitro*: an explanation for its citostatic effects? *Planta Medica* 1988: 377-380.
- McKeon TA, Fernández-Maculet JC & Yang SF (1995) Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (PJ Davies, ed.), pp.: 118-139. Kluwer Acad. Pub. The Netherlands.
- Medora RS, Campbell JM & Mell GP (1973) Proteolytic enzymes in papaya tissue cultures. *Lloydia* 36: 214-216.
- Melo NS, Larsen E, Welinder KG & Fevereiro PS (1996) Characterisation of two major cationic peroxidases from cell suspension cultures of *Vaccinium myrtillus*. *Plant Science*. 122: 1-9.
- Michaud D & Asselin A (1995) Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. *J. Chromatog. A*. 698: 263-279.
- Mikkonen A (1986) Activities of some peptidases and proteinases in germinating kidney bean *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 68: 282-286.
- Mikola L & Mikola J (1986) Occurrence and properties of different types of peptidases in higher plants. In: *Plant Proteolytic Enzymes*. Vol I (MJ Dalling, ed.), pp.: 98-117. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. USA.
- Misawa M (1985) Production of useful plant metabolites. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (A Fiechter, ed.). Vol 31, pp.: 59-88. Springer-Verlag. Berlin.
- Moncousin C (1981) Multiplication végétative accéléré. *Revue Hort. Suisse* 54, 105-116.
- Moreno OA, Vazquez-Duhalt R & Ochoa L (1989) Peroxidase activity in calluses and cell suspension cultures of radish *Raphanus sativus* var. Cherry Bell. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 18: 321-327.
- Morris P, Scragg AH, Smart NJ & Stafford A (1985) Secondary product formation by cell suspension cultures. In: *Plant Cell Culture, a Practical Approach* (RA Dixon, ed.), pp.: 127-167. IRL Press Ltd. Oxford. UK.
- Morzadec JM & Hourmant A (1997). *In vitro* rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA₃. *Scientia Hort.* 72: 59-62.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.
- Mutlu A & Gal S (1999) Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiol. Plant.* 105: 569-576.

- Mutlu A, Chen X, Reddy S & Gal S (1999) The aspartic proteinase of *Arabidopsis thaliana* is expressed in seeds and localized in the protein bodies. *Seed Sci. Res.* 9: 75-84.
- Nakagawa K, Konagai A, Fukui H & Tabata M (1984) Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension culture. *Plant Cell Rep.* 3: 254-257.
- Natalucci CL, Brullo A, López LMI, Hillal RM & Caffini NO (1996) Macrodontain, a new protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*). *J. Food Biochem.* 19: 443-454.
- NC-IUBMB (1992) Enzyme Nomenclature 1992. *Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. Academic Press. Orlando. Florida. USA.
- Nigra HM, Alvarez MA & Giulietti AM (1990) Effect of carbon and nitrogen sources on growth and solasodine production in batch suspension cultures of *Solanum eleagnifolium* Cav. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21: 55-60.
- Ordas RJ, Tavazza R & Ancora G (1990) *In vitro* morphogenesis in globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) *Plant Sci.* 71: 223-237.
- Ordas RJ, Tavazza R & Ancora G (1991) Callus formation from isolated globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) suspension protoplasts. *Plant Sci.* 77: 253-259.
- Padmanabhan S, Chitre A & Shastri N (1993) Milk clotting protease isolated from *Dieffenbachia maculata*. *Die Nahrung* 37: 99-101.
- Paniego NB (1995) Producción de lactonas sesquiterpénicas por cultivo in vitro de células y tejidos vegetales. *Tesis*. Facultad Farmacia y Bioquímica. UBA. Argentina
- Panizzi L & Scarpati M (1954) Constitution of cynarine, the active principle of the artichoke. *Nature* 174: 1062.
- Paquet J & Gripon JC (1980) Intracellular peptide hydrolases of *Penicillium roqueforti*. *Milchwiss.* 35: 72-74.
- Pardo MF, López LMI, Canals F, Avilés FX, Natalucci CL & Caffini NO (2000) Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (*Bromeliaceae*). *J. Agric. Food Chem.* 48: 3795-3800.
- Park H, Yamanaka N, Mikkonen A, Kusakabe I & Kobayashi H. (1996) Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Gene Bank* AB025359.2. *Accession* BAA76870. No publicado.
- Parkinson M, Cotter T & Dix PJ (1990) Peroxidase production by cell suspension and hairy root cultures of horseradish (*Armoracia rusticana*). *Plant Sci.* 66: 271-277.
- Pécaut P & Foury C (1992) L'artichaut. In: *Amélioration des Espèces Végétales Cultivées: Objectifs et Critères de Sélection* (A Gallais & H Bannerot, eds.), pp.: 460-469. INRA. Paris. Francia.
- Pécaut P, Dumas de Vaulx R & Lof, H (1983) Virus-free clones of globe artichoke (*Cynara scolymus*) obtained after *in vitro* propagation. *Acta Hort.* 131, 303-309.

- Pérez Ponce JN (1998) *Propagación y Mejora genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. Cuba.
- Piñol MT & Palazón J (1993) Metabolismo secundario. In: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, (J Azcon-Bieto & M Talon, eds.), pp.: 237-283. Interamericana. Mc Graw-Hill. España.
- Pitta-Alvarez SI, Todríguez Talou J, Flocco C, Spollansky T, Desmarchelier C & Giulietti AM (1999) Effect of elicitation on tropane alkaloid production and release in transformed root cultures of *Brugmansia candida*. *Acta Hort.* 502: 133-138.
- Polanowski A, Wilusz T, Kolaczowska MK, Wieczorek M, Wilimowska-Pelc A (1985) Purification and characterization of aspartic proteinases from *Cucumis sativus* and *Cucurbita maxima* seed. In: *Aspartic Proteinases and their Inhibitors* (V Kostka, ed.), pp.: 49-52. Walter de Gruyter, New York. USA.
- Pollard JW & Walker JM (1990) *Plant Cell and Tissue Culture. Methods in Molecular Biology*. Vol. 6. Humana Press Inc. Clifton, New Jersey. USA.
- Preziosi P & Loscalzo B (1956) L'azione sulla coleresi, sul colesterolo ematico e sulla lipoidosi colesterolica del principio attivo del carciofo e di sostanze ad esse correlate. *Fitoterapia* 27: 266-272.
- Priolo NS, López LMI, Arribére MC, Natalucci CL & Caffini NO (1991) New purified plant proteinases for the food industry. *Acta Alim. (Budapest)* 20: 189-196.
- Priolo NS, Morcelle del Valle S, Arribére MC, López LMI & Caffini NO (2000) Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Prot. Chem.* 19: 39-49.
- Radlowski M, Kalinowski A, Adamczyk J, Królikowski Z & Bartkowiak S (1996) Proteolytic activity in the maize pollen wall. *Physiol. Plant.* 98: 172-178.
- Ramalho-Santos M, Pissarra J, Pires E & Faro C (1998a) Cardosinogen A, the precursor form of the major aspartic proteinase from cardoon. In: *Aspartic Proteinase* (NMG James, ed.), pp.: 253-258. Plenum Press. New York. USA.
- Ramalho-Santos M, Pissarra J, Veríssimo P, Pereira S, Salema R, Pires E & Faro C (1997) Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta* 203: 204-212.
- Ramalho-Santos M, Veríssimo P, Cortes L, Samyn B, Van Beeumen J, Pires E & Faro C (1998b) Identification and proteolytic processing of procardosin A. *Eur. J. Biochem.* 255: 133-138.
- Rawlings ND & Barrett AJ (1995) Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Meth. Enzymol.* 248: 105-180.
- Rhodes MJC, Parr AJ, Giulietti AM & Aird ELH (1994) Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38: 143-151.

- Rice R, Alderson P, Hall J & Ranchhod A (1992) Micropropagation: principles and commercial practice. In: *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology*. Second Supplement (M Fowler, G Warren & M Moo-Young, eds.), pp.: 130-149. Pergamon Press. England.
- Richter L & Kipp P (1999) Transgenic plants as edible vaccines. In: *Plant Bioetecology. New Products and Appications* (J Hammond, P McGarvey & V Yusibov, eds.), pp.: 159-176. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. Germany.
- Robert ML, Reyes J & Loyola VM (1991) Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas in vitro. En: *Cultivos de Tejidos en la Agricultura* (WM Roca & LA Mroginski, eds.), pp.: 211-238. CIAT. Cali. Colombia.
- Roberts SC & Shuler ML (1997) Large-scale cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 154-159.
- Robins R, Walton N, Parr AJ, Lindsay E, Aird H, Rhodes MJC & Hamill JD (1994) Progress in the genetic engineering of the pyridine and tropane alkaloid biosynthetic pathways of solanaceous plants. In: *Genetics Engineering of Plant Secondary Metabolism* (BE Ellis, GW Kuroki & HA Stafford, eds.), pp.: 1-33. Plenum Press. New York. USA.
- Roca WM & Mroginski LA (1991) *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali. Colombia.
- Rodrigo I, Vera P & Conejero V (1989) Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37-kDa aspartyl endoproteinase. *Eur. J. Biochem.* 184: 663-669.
- Rodrigo I, Vera P, van Loon LC & Conejero V (1991) Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins: evidence for conserved mechanisms of degradation of pathogenesis-related proteins in plants. *Plant Physiol.* 95: 616-622.
- Rodríguez JP, Martinengo I, Murray R, Daorden ME & Triccó HR (1996) *El cultivo del alcaucil*. Proyecto de Diversificación Productiva Serie B 5. pp: 1-35. INTA. Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación. Argentina.
- Roller U (1978) Selection of plant tissue cultures of *Catharantus roseus* with high content of serpentine and ajmalicine. In: *Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods* (AW Alferman & E Reinhard, eds.), pp.: 95-108. GSF München. Germany
- Rossi V & De Paoli G (1992) Micropropagation of artichoke (*Cynara scolymus*). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 19. High-Tech and Micropropagation III* (YPS Bajaj, ed.), Vol. 19, pp.: 118-134. Springer-Verlag, Berlín. Germany.
- Rottenberg A & Zohary D (1996) The wild ancestry of cultivated artichoke. *Gen. Res. Crop Evol.* 43: 53-58.
- Runeberg-Roos P & Saarma M. (1998) Phytpepsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. *Plant J.* 15: 139-145.

- Runeberg-Roos P, Kervinen J, Kovaleva V, Raikhe NV & Gal S. (1994) The aspartic proteinase of barley is a vacuolar enzyme that processes probarley lectin in vitro. *Plant Physiol.* 105: 321-329.
- Runeberg-Roos P, Törmäkangas K & Östman A. (1991) Primary structure of a barley-grain aspartic proteinase. *Eur. J. Biochem.* 202: 1021-1027.
- Sá FV & Barbosa M (1972) Cheese-making with a vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus*). *J. Dairy Res.* 39: 335-343.
- Saitou T, Kamada H & Harada H (1991) Isoperoxidase in hairy roots and regenerated plants of horseradish (*A Armoracia laphatifolia*). *Plant Sci.* 75: 195-201.
- Salisbury FB & Ross CW (1994) *Fisiología Vegetal*. pp: 395-451. Grupo Editorial Iberoamericana. México.
- Salmia MA (1981) Proteinase activities in resting and germinating seeds of Scots pine, *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.* 53: 39-47.
- Salmia MA, Nyman SA, Mikola JJ (1978) Characterization of the proteinases present in germinating seeds of Scots pine *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.* 42: 252-256
- Sarah G, de la Motte RS & Wagner F (1989) Protease assay methods. In: *Proteolytic Enzymes: a Practical Approach* (RJ Beynon & JS Bond, eds.), pp.: 25-55. IRL Press. Oxford. UK.
- Sarkkinen P, Kalkkinen N, Tilgmann C, Siuro J, Kervinen J & Mikola L (1992) Aspartic proteinase from barley grains is related to mammalian lysosomal cathepsin D. *Planta (Berlin)* 186: 317-323.
- Schaller A. & Ryan CA (1996) Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic proteinase, a systemic wound response protein. *Plant Mol. Biol.* 31: 1073-1077
- Scheidtmann KH, Reinartz S & Schlebusch H (1997) Immunological detection of proteins of know sequence. In: *Protein Structure: a Practical Approach* (TE Creighton, ed.), pp.: 59-89. 2nd. Ed. IRL Press. Oxford University Press. Oxford. UK.
- Schenk RV & Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Schiel O, Jarchow-Redecker K, Piehl GW, Lehmann J & Berlin J (1984) Increased formation of cinnamoyl putrescines by feedbatch fermentation of cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Rep.* 3: 18-20.
- Schnall J, Hwang C, Cooke T & Zimmerman J (1991) An evaluation of gene expression during somatic embryogenesis of two temperature-sensitive carrot variants unable to complete embryo development. *Physiol. Plant.* 82: 498-504.
- Scott R (1992) Fabricación de quesos. Ed. Acribia. España.
- Scragg A (1990) Fermentation systems for plant cells. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture* (B Charlwood & M Rhodes, eds.), pp.: 243-263. Clarendon Press. Oxford. UK.

- Scragg A (1992) Bioreactors for the mass cultivation of plant cells. In: *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology*. Second Supplement (M Fowler, G Warren & M Moo-Young, eds.), pp.: 45-78. Pergamon Press. England.
- Sesto P & van Huystee R (1989) Purification and yield of a cationic peroxidase from peanut suspension cell culture. *Plant Sci*. 61: 163-168.
- Shalabi SI & Fox PF (1987) Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. *Ir. J. Food Sci. Technol.* 11: 135-151.
- Shinano, S & Fukushima K (1971) Studies on lotus protease. III. Some physicochemical and enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* 35: 1488-1494.
- Sicard P (1982) Applications industrielles des enzymes. In: *Les enzymes. Productions et Utilisations Industrielles*, eds. G Durand & P Monsan, pp: 121-164. Gauthier-Villars. Paris. France.
- Smeets R (1995) Enzyme-coagulation. *Dairy Technol. Paper* 5: 14-17.
- Sousa MJ & Malcata X (1997) Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of *Cynara cardunculus*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*. 205: 97-103.
- Spencer M, Ashton S & Scollick S (1993) Characterization of novel peroxidases from plant cell cultures: evidence of widely different substrate specificities. In: *Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology* (K Welinder, S Rasmussen, C Penel & H Greppin, eds.), pp.: 435-440. University of Copenhagen and University of Geneva.
- Sponsel VM (1995) The biosynthesis and metabolism of gibberellins in higher plants. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (PJ Davies, ed.), pp.: 66-97. Kluwer Acad. Pub. The Netherlands.
- St Angelo AJ & Ory RL (1970) Properties of a purified proteinase from hempseed. *Phytochemistry* 9: 1933-1938.
- St Angelo AJ, Ory RL & Hansen HJ (1969) Localization of an acid proteinase in hempseed. *Phytochemistry* 8: 1135-1138.
- Stachowiak D, Wilimowska-Pelc A, Kolaczowska M, Polanowski A, Wilusz T & Larsen LB (1994) Aspartic proteinase from the seeds of figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*). *Acta Biochim. Pol.* 41: 181-182.
- Stirn S & Jacobsen HJ (1987) Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep.* 6: 50-54.
- Storey RD & Wagner FW (1986) Plant proteases: a need for uniformity. *Phytochemistry* 25: 2701-2709.
- Swanson SJ & Jones RL (1996) Gibberellic acid induces vacuolar acidification in barley aleurone. *Plant Cell* 8: 2211-2221.
- Swanson SJ, Bethke PC, Jones RL (1998) Barley aleurone cells contain two types of vacuoles: characterization of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell* 10: 685-698.

- Szabados L, Mroginski L & Roca WM (1991) Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. En: *Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (WM Roca & LA Mroginski, eds.), pp.: 173-210. CIAT. Cali. Colombia.
- Takahashi K, Chang W.-J and Ko J.-S (1974) Specific inhibition of acid proteases from bran, kidney, skeletal muscle, and insectivorous plants by diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester and by pepstatin. *J. Biochem.* 76: 897-904.
- Tamer IM & Mavituna F (1996) Protease from callus and cell suspension cultures of *Onopordum turcicum*. *Biotechnol. Lett.* 18: 361-366.
- Tamer IM (1993) Identification and parcial purification of a novel milk enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnol. Lett.* 15: 427-432.
- Tang J & Wong RNS (1987) Evolution in the structure and function of aspartic proteinases. *J. Cell Biochem.* 33: 53-63.
- Tavaria FK, Sousa MJ, Domingos A, Malcata FX, Brodelius P, Clemente A & Pais MS (1997) Degradation of casein from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. *J. Agric. Chem.* 45: 3760-3765.
- Tökes ZA, Woon WC & Chambers SM (1974) Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei* L. *Planta (Berlin)* 119: 39-46.
- Toponi M (1960) Recherches sur le développement de fragments de bractées d'artichaut. *C.R. Acad. Sci.* 250: 2439-2441.
- Törmäkangas K, Kervinen J, Östman A & Teeri T (1994) Tissue-specific localization of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains. *Planta* 195: 116-125.
- Trevisan MTS, Scheffer JJC & Verpoorte R (1997) Effect of elicitation on the peroxidase activity in some cell suspension cultures of hop, *Humulus lupulus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 48: 121-126.
- Uhlig H (1998) Enzymes in the meat industry. In: *Industrial Enzymes and their Applications* (Uhlig H, ed.), pp.: 337-339. John Willey & Sons. USA.
- Vaccaro AM, Tatti M, Ciaffoni F, Salvioli R, Maras B & Barca A (1993) Function of saposin C in the reconstitution of glucosylceramidase by phosphatidylserine liposomes. *FEBS Lett.* 336: 159-161
- Vallon U & Kull U (1994) Localization of proteasomes in plant cells. *Protoplasma* 182: 15-18.
- Valpuesta V, Quesada M & Reid M (1993) Senescencia y abscisión. In: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. (J Azcón-Bieto & M Talon, eds.), Cap. 24. pp.: 479-492. Interamericana. Mc Graw Hill. España.
- Verissimo P, Esteves C, Faro C & Pires E (1995) The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnol. Lett.* 17: 621-626.

- Veríssimo P, Faro C, Moir A, Lin Y, Tang J & Pires E (1996) Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *Eur. J. Biochem.* 235: 762-768.
- Veríssimo P, Ramalho-Santos M, Faro C & Pires E (1998) A comparative study on the aspartic proteinases from different species of *Cynara*. In: *Aspartic Proteinases* (NMG James, ed.), pp.: 459-463. Plenum Press. New York. USA.
- Verpoorte R, van der Heijden R, ten Hoopen HJG & Memelink J (1998) Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 4: 3-20.
- Vidalie H (1986) *Cultivo in vitro*. Editorial Científica, S.A. de C.V. México.
- Voet D & Voet J (1992) *Bioquímica*. Capítulo 5: *Técnicas de purificación de las proteínas*. pp.: 79-113. Ediciones Omega. Barcelona. España.
- Voigt G, Biehl B, Heinrichs H & Voigt J (1997) Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperms. *Phytochemistry* 44: 389-392.
- Voigt J, Biehl B, Heinrichs H, Kamaruddin S, Gaim Marsoner G & Hugi A (1994) In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxipeptidase. *Food Chem.* 49: 173-180.
- Walreavens V, Jaziri M, van Beeumen J, Schnek AG, Kleinschmidt T & Looze Y (1993) Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374: 501-506.
- Warren G (1992) The cell biology of plant cell culture systems. In: *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology*. Second Supplement (M Fowler, G Warren & M Moo-Young, eds.), pp.: 1-32. Pergamon Press. England.
- Wegener T & Fintelmann V (1999) Pharmacological properties and therapeutic profile of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Wien. Med. Wochenschr.* 149: 241-247.
- Westergaard JL, Hackbarth C, Treuhaft MW & Roberts RC (1980) Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures. *J. Immunol Meth.* 34: 167-175.
- White PC, Cordeiro MC, Arnold D, Brodelius PE & Kay J (1999) Processing, activity and, inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*). *J. Biol. Chem.* 274: 16685-16693.
- White PR (1963) *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. Ronald Press. New York. USA.
- Wiklund A (1992) The genus *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae). *Bot. J. Linn. Soc.* 109: 75-123.
- Williams PD & Mavituna F (1992) Immobilized plant cells. In: *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology*. Second Supplement (M Fowler, G Warren & M Moo-Young, eds.), pp.: 63-78. Pergamon Press. England.

- Yamada Y, Kobayashi S, Watanabe K & Hayashi U (1987) Production of horseradish peroxidase by plant cell culture. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 38: 31-39.
- Yamaguchi T, Yamashita Y, Takeda Y & Kiso H (1982) Proteolytic enzymes in green asparagus, kiwi fruit and miut: occurrence and partial characterization. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1983-1986.
- Yanagawa Y, Ohhashi A, Murakami Y, Saeki Y, Yokosawa H, Tanaka K, Hashimoto J, Sato T & Nakagawa H (1999) Purification and characterization of the 26S proteasome from cultured rice (*Oryza sativa*) cells. *Plant Sci.* 149: 33-41.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P & Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
- Yeoman M, Holden M, Corchet P, Holden P, Goy J & Hobbs M (1990) Exploitation of disorganized plant cultures for the production of secondary metabolites. In: *Second Products from Plant Tissue Culture* (B Charlwood & M Rhodes, eds.), pp.: 139-166. Clarendon Press. Oxford. UK.
- Yokoyama M & Yanagi M (1991) High level production of arbutin by transformation. In: *Plant Cell Culture in Japan* (A Komamine, M Misawa & F DiCosmo, eds.), pp.: 79-91. CMC Co. Ltd. Tokyo. Japan.
- Zenk MH, El-Shagi H, Arens H, Stöckigt J, Weiler EW & Deus B (1977) Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Applications* (W Barz, E Reinhard & MH Zenk, eds.) pp.: 27-43. Springer-Verlag. Berlin. Germany.
- Zhang N & Jones BL (1995) Characterization of germinated barley endoproteolytic enzymes by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Cereal Sci.* 21: 145-153.
- Zhu Y & Conner GE (1994) Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269: 3846-3851.

MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO

Medio de Murashige & Skoog (1962) modificado

Componentes (mg l ⁻¹)	Callos		Suspensiones
	<i>cv. Francés Precoz</i>	<i>cv. Green Globe</i>	<i>cv. Green Globe</i>
Macronutrientes			
KNO ₃	950	1900	1900
NH ₄ NO ₃	825	1650	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	440
Micronutrientes			
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
KI	0,83	0,83	0,83
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
Orgánicos			
Tiamina.HCl	0,4	10	10
Piridoxina	0,5	1	1
Acido nicotínico	0,5	1	1
Mio-inositol	100	100	100
Sacarosa	30000	30000	30000
Agar	8000	8000	

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis nativa se realizó conforme a la técnica de Davies (1964), la electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970) y la electroforesis nativa con urea con modificaciones de la técnica de Andrews (1983).

Geles de poliacrilamida

	Nativa		SDS-PAGE		Urea-PAGE	
	5 (% T)	14 (% T)	5 % (%T)	14 (% T)	4,2 (% T)	12,5 (% T)
Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) [ml]	1,62	4,55	1,62	4,55		
Acrilamida-bisacrilamida (24:1) [ml]					1,68	5
Buffer Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 [ml]		2,50		2,50		
Buffer Tris-HCL 0,5 M pH 6,8 [ml]	2,50		2,50			
Buffer Tris-HCl 0,3M pH 8,9, urea 4,5M c.s.p. [ml]						10
Buffer Tris-HCl 0,06 M pH 7,6 urea 4,5M c.s.p. [ml]					10	
SDS 10 % [μl]			200	200		
TEMED [μl]	5	5	5	5	5	5
Persulfato de amonio 1,5 % [μl]	500	500	500	500	250	250
Agua c.s.p. [ml]	10	10	10	10		

Buffer de muestra

	Nativa	SDS-PAGE	Urea-PAGE
SDS (g)		2	
β -mercaptoetanol (ml)		5	10
Glicerol (ml)	5	8	25
Azul de bromofenol (mg)	5	5	4
Buffer Tris-HCl 65 mM pH 6,8 c.s.p. (ml)	100	100	
Buffer Tris-HCl 0,6 M, urea 8 M, pH 7,6 c.s.p. (ml)			50

Buffer de corrida pH 8,3

	Nativa	SDS-PAGE
Tris (g)	3	3
Glicina (g)	14,4	14,4
SDS (g)		1
Agua c.s.p. (l)	1	1

Soluciones de colorante y decolorante

	Colorante	Decolorante
Coomassie Brilliant Blue R-250 (mg)	100	
Metanol (ml)	25	25
Acido acético glacial (ml)	10	10
Agua destilada, c.s.p. (ml)	100	100

Marcadores de Peso Molecular

Proteínas	kDa Sigma (MW-SDS-70L)	kDa Bio-Rad (Low range)
Fosforilasa b		103
Albúmina bovina	66	77
Ovoalbúmina	45	50
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	36	
Anhidrasa carbónica	29	34,3
Tripsinógeno	24	
Inhibidor de tripsina	20,1	28,8
Lisozima		20,7
α -Lactoalbúmina	14,2	

ISOELECTROENFOQUE

Solución de poliacrilamida al 10 %

Acrilamida-Bisacrilamida (25%T, 3%C) [ml]	2
Glicerol (25% p/v) [ml]	2
Anfolitos (Pharmalyte 3-10 o 4-6,5) [ml]	0,5
Agua [ml]	5,5

A la solución desgasificada se le adicionaron los siguientes reactivos para iniciar la polimerización

TEMED [μ l]	3
Persulfato de amonio al 10% p/v [μ l]	60

Solución fijadora

Acido sulfosalicílico [g]	4
Metanol [ml]	30
Acido tricloroacético [g]	12,5
Agua c.s.p. [ml]	100

Solución colorante

Acido acético glacial [ml]	10
Etanol [ml]	27
Coomassie Brilliant Blue R-250 [mg]	40
CuSO ₄ [mg]	500
Agua c.s.p. [ml]	100

Solución decolorante I

Ácido acético glacial [ml]	7
Etanol [ml]	12
CuSO ₄ [mg]	500
Agua c.s.p. [ml]	100

Solución decolorante II

Acido acético glacial [ml]	7
Etanol [ml]	12
Agua c.s.p. [ml]	100

Marcadores de pI (Pharmacia)

Proteínas	pI 3,5-9,3 (Broad pI Kit)
Amiloglucosidasa	3,50
Inhibidor de tripsina	4,55
β -lactoglobulina A	5,20
Anhidrasa carbónica B (bovina)	5,85
Anhidrasa carbónica B (humana)	6,55
Mioglobina (banda ácida)	6,85
Mioglobina (banda básica)	7,35
Lentil lectina (ácida)	8,15
Lentil lectina (media)	8,45
Lentil lectina (básica)	8,65
Tripsinógeno	9,30

ZIMOGRAMA**Solución fijadora y decolorante**

Acido acético glacial [ml]	10
Metanol [ml]	45
Agua c.s.p. [ml]	100

Solución colorante

Coomassie Brilliant Blue R-250 [mg]	250
Solución fijadora c.s.p. [ml]	100

DETECCIÓN INMUNOLÓGICA**Inmunoelectroforesis****Buffer veronal sódico 50 mM, pH 8,6**

9 g veronal sódico / 6,5 ml HCl 1 N / agua destilada c.s.p. 1 litro.

Colorante

0,5 g Amido Schwartz / 45 ml alcohol metílico / 10 ml ácido acético / 45 ml agua destilada.

Decolorante

450 ml alcohol metílico / 100 ml ácido acético / 450 ml agua destilada.

ELISA indirecto**Buffer carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6**

1,58 g Na₂CO₃ / 2,9g NaHCO₃ / agua bidestilada c.s.p. 1 litro.

Substrato

Ortofenilendiamina (OPD) 1 mg/ml en buffer fosfato-citrato 0,1 M, pH 5 / H₂O₂ (30 vol) 0,025 % v/v.

Buffer citrato-fosfato de sodio pH 5, 100 mM

19,2 g ácido cítrico / 28,4 g POHNa₂ / agua destilada c.s.p. 100 ml.

Electrotransferencia y Western blotting**PBS**

Na₂HPO₄ 10 mM / KH₂PO₄ 1,8 mM / NaCl 137 mM / ClK 2,7 mM (pH 7-7,4)

Buffer de transferencia

Tris base 25 mM / glicina 192 mM / metanol 20 % (v/v). pH: 8,1-8,4

Ponceau S

0,1 g Ponceau S / 5 ml ácido acético glacial / 95 ml agua bidestilada.

Buffer de lavado (PBST)

100 ml PBS / 300 µl Tween 20.

Buffer de bloqueo

100 ml PBS / 100 µl Tween 20 / 3 g leche descremada.