

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