

# 1. INTRODUCCIÓN AL MUNDO DE LAS PROTEASAS

## 1.1. Concepto de Enzima

Químicamente las enzimas son proteínas que actúan como potentes y eficaces catalizadores. Un catalizador es una sustancia que acelera una reacción química, hasta hacerla instantánea o casi instantánea al disminuir la energía de activación. Actúan en pequeña cantidad y se recuperan indefinidamente. No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables, ni tampoco modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aceleran su consecución.

## 1.2. Características de la acción enzimática

La característica más sobresaliente de las enzimas es su elevada especificidad, que no permite que se formen subproductos y que se manifiesta como especificidad de sustrato y especificidad de acción.

- **Especificidad de sustrato.** El sustrato (S) es la molécula sobre la que la enzima ejerce su acción catalítica.
- **Especificidad de acción.** Cada reacción está catalizada por una enzima específica.

**La acción enzimática** se caracteriza por la formación de un complejo que representa el estado de transición:



donde E representa la enzima, S el sustrato, ES el complejo transitorio enzima-sustrato y P los productos de la reacción.

El sustrato se une a la enzima a través de numerosas interacciones débiles tales como puentes de hidrógeno, uniones electrostáticas, hidrofóbicas, o de van der Waals, en un lugar específico, el **centro activo**. Este centro es una pequeña

porción de la enzima, constituido por una serie de aminoácidos que interaccionan con el sustrato.

### 1.3. Clasificación de las enzimas

En función de su acción catalítica específica las enzimas se clasifican en grupos o clases. A cada enzima se le asigna un número compuesto por cuatro dígitos, así como un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza. Este sistema de nomenclatura y clasificación de las enzimas fue creado en el año 1961 por la Comisión de Enzimas ("Enzyme Commission", EC) de la International Union of Biochemistry (IUB). Actualmente el Comité de Nomenclatura de la IUBMB es el sucesor de la Comisión de Enzimas. El sistema E.C. agrupa a las enzimas en seis clases:

**Clase 1:** Oxidorreductasas

**Clase 2:** Transferasas

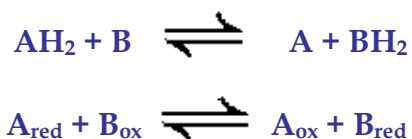
**Clase 3:** Hidrolasas

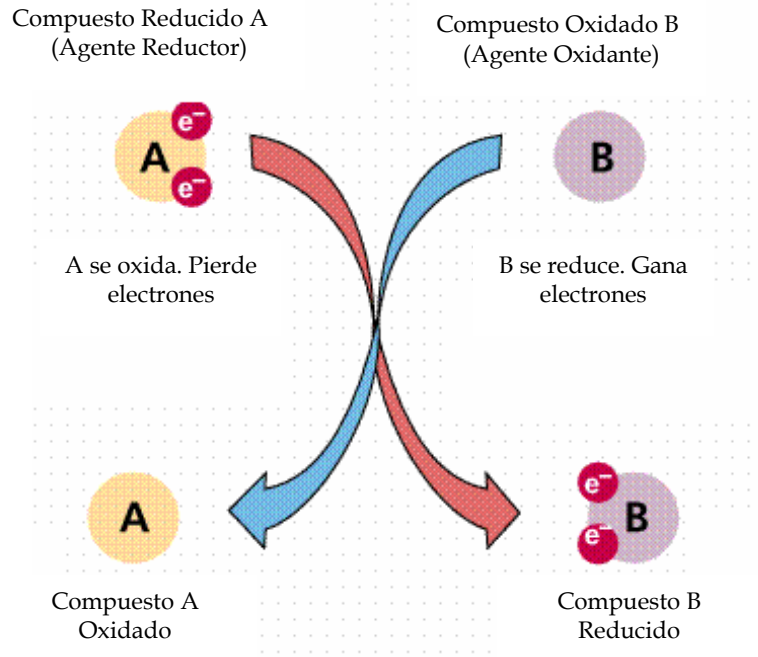
**Clase 4:** Liasas

**Clase 5:** Isomerasas

**Clase 6:** Ligasas

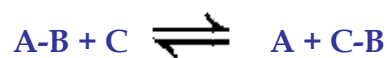
**Clase 1.** Las Oxidorreductasas catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e<sup>-</sup>) de un sustrato a otro, según la reacción general:



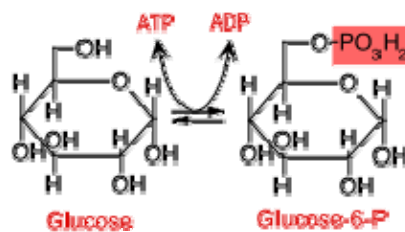


Sus funciones están básicamente relacionadas con las reacciones de óxido reducción de los organismos. Se encuentran muy comúnmente en reacciones metabólicas. Dentro de ellas existen dos subgrupos principales: Las Deshidrogenasas y las Oxidasas. Ejemplos de estas enzimas son la succinato deshidrogenasa y la citocromo oxidasa.

**Clase 2.** A esta clase de enzimas pertenecen las transferasas, que catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) desde un sustrato a otro, según la reacción:



Un ejemplo es la glucoquinasa, que cataliza la siguiente reacción :



**Clase 3.** Las hidrolasas catalizan reacciones de hidrólisis. Este grupo de enzimas permite romper moléculas de alto peso molecular, haciéndolas reaccionar con moléculas de agua. Con este método pueden romper enlaces peptídicos, ésteres o glicosídicos. La mayoría de las enzimas gástricas son de este tipo.



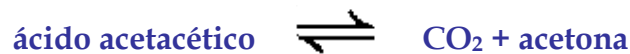
Otro ejemplo es la lactasa, que cataliza la reacción:



**Clase 4.** A esta clase de enzimas pertenecen las liasas, que catalizan reacciones de ruptura o soldadura de sustratos. Estas moléculas rompen enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno y carbono-azufre.



Un ejemplo es la acetacetato descarboxilasa, que cataliza la reacción:



**Clase 5.** Las isomerasas catalizan la interconversión de isómeros. Realizan modificaciones en una molécula, cambiando su conformación molecular, ya sea como isómero óptico, funcional o de otro tipo.



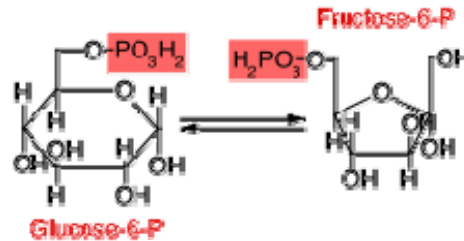
Son ejemplos de esta clase de enzimas la fosfotriosa isomerasa y la fosfoglucosa isomerasa, que catalizan las reacciones abajo representadas:

**fosfotriosaisomerasa**





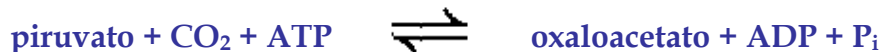
Fosfoglucosa isomerasa



**Clase 6.** Las ligasas son enzimas que catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.):



Un ejemplo de esta clase de enzimas es la piruvato carboxilasa, que cataliza la reacción:



#### 1.4. Hidrolasas vegetales

En los vegetales las hidrolasas están involucradas en procesos metabólicos vitales para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los mismos. Muchas de estas enzimas, entre ellas proteasas, pectinasas, xilanasas, esterases, poligalacturonidasas, celulasas, son de gran interés industrial por la variedad de procesos en que pueden ser aplicadas.

La mayoría de estas enzimas se encuentran presentes en el látex de muchas especies. El látex es una de las características más salientes de las familias Asclepiadaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae y Moraceae (Rajesh *et al.*, 2005).

El látex es el fluido lechoso contenido en la o las células de los tubos laticíferos. Está compuesto por una suspensión/solución de una mezcla compleja de diferentes sustancias: enzimas, terpenos, alcaloides, vitaminas,

glúcidos, lípidos y aminoácidos libres y se han detectado componentes subcelulares, tales como núcleo, mitocondrias, ribosomas y vacuolas.

La presencia de látex ha sido reportada en al menos 12000 especies de plantas pertenecientes a 900 géneros diferentes. Las enzimas detectadas en látex, tales como proteasas y quitinasas, sugieren un rol en el mecanismo de defensa de las plantas contra patógenos, parásitos y herbívoros (Freitas *et al.*, 2007).

Las pectinasas son enzimas que digieren la pectina, sustancia presente en las paredes de las células vegetales y en la lámina media (péctica) y se emplean en el procesamiento de alimentos vegetales. La pectina es un polisacárido constituido principalmente por la unión de muchas moléculas de ácido galacturónico parcialmente metoxilado. En los extractos comerciales de pectinasas usados para la fabricación de jugos de fruta coexisten tres enzimas: pectinliasa, poligalacturonasa y pectinmetilesterasa.

Las pectinasas son fundamentalmente utilizadas en la clarificación de jugos de frutos y para evitar el sabor amargo de los mismos. Algunos jugos de frutas, como los de manzana y pera, deben tener aspecto cristalino, lo cual hace necesario aclararlos, ya que el producto obtenido por prensado es viscoso y persistentemente turbio. Los jugos de naranja o pomelo, contrariamente a los anteriores, deben llegar turbios al consumidor por lo que se usan las mismas enzimas para causar un efecto contrario al aclaramiento (con el tiempo, las pectinas de alto peso molecular tienden a precipitar, a causa del calcio presente en el jugo; si se tratan de manera controlada con pectinasas, se reduce su peso molecular, no precipitan y la turbidez del jugo se estabiliza). Por otra parte, las pectinasas se aplican en los procesos de fermentación de té y café y en la extracción de aceites (Kashyap *et al.*, 2001). Asimismo, las pectinesterasas se usan como espesantes en la industria de las mermeladas (Camperi *et al.*, 1996).

Las quitinasas catalizan la hidrólisis de quitina, un biopolímero de N-acetil-D-glucosamina. Los patrones de expresión de quitinasas en estudios *in vitro* (Meins & Ahl, 1989), de inhibición del crecimiento fúngico por quitinasas (Schlumbaum *et al.*, 1986) y la mayor resistencia de plantas transgénicas a

hongos patógenos (Broglie *et al.*, 1991) son consistentes con la hipótesis de que las quitinasas constituyen un importante componente de los sistemas de defensa de las plantas. Consecuentemente, las quitinasas vegetales son objeto de intensas investigaciones que podrían finalmente conducir a cultivos resistentes a enfermedades y disminuir el uso de pesticidas ecológicamente nocivos.

Probablemente las hidrolasas de mayor interés estén representadas por las enzimas proteolíticas, que representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial (Barrett *et al.*, 2004). Se estima que en el mundo las industrias que aplican enzimas para sus productos invierten anualmente cerca de un billón de dólares en su comercialización, de las cuales el 75% son enzimas hidrolíticas; de este porcentaje, las proteasas representan el 60% de total de las ventas mundiales (Rao *et al.*, 1998).

La mayoría de estas enzimas proviene de fuentes microbianas, pero varias proteinasas vegetales tales como papaína, bromelaína y ficina siguen siendo preferidas en un gran número de procesos (Mantell *et al.*, 1986). Sin embargo el número de proteasas vegetales que han sido aisladas y caracterizadas es aún muy bajo (Trejo, 2005).

Tanto proteasas como pectinasas y quitinasas se encuentran formando parte del látex de muchas especies de la familia *Asclepiadaceae* (Freitas *et al.*, 2007).

#### **1.4.1. Enzimas proteolíticas**

Dentro de la clase 3 correspondiente a las hidrolasas, las enzimas proteolíticas también denominadas proteasas, proteinasas o peptidasas integran la subclase 3.4 y representan alrededor del 2% de todos los productos génicos (Barrett *et al.*, 2004). Estas enzimas se caracterizan porque catalizan específicamente la hidrólisis del enlace peptídico. Se han utilizado desde tiempos muy antiguos en un gran número de procesos biotecnológicos. Entre los más conocidos pueden citarse: la tiernización de carnes, la elaboración de cerveza, la panificación, la elaboración de quesos y la obtención de proteínas modificadas en la industria alimentaria. También se utilizan como aditivos en

polvos detergentes, en el tratamiento de efluentes industriales, en el proceso de manufactura de cueros, en la industria textil y más recientemente en la síntesis de péptidos en medios no convencionales (Uhlig, 1998, Guzmán *et al.*, 2007). Es así que debido a sus variadas aplicaciones, el interés de los investigadores por las enzimas proteolíticas de diverso origen se ha mantenido a lo largo de los años.

Se ha demostrado también que las peptidasas participan en procesos que conducen al desarrollo de enfermedades de fuerte impacto social. Por tal motivo también se ha despertado el interés por obtener o diseñar inhibidores que puedan actuar como agentes terapéuticos teniendo como "blanco" a las proteasas. Entre las principales enfermedades en las que aparecen involucradas las enzimas proteolíticas pueden mencionarse el cáncer (Coussens *et al.*, 2002), el SIDA (Baltimore *et al.*, 1998; Bartlett & Moore, 1998), el asma (Katz *et al.*, 1998; Rice *et al.*, 1998, Agusti *et al.*, 1998; Mulligan *et al.*, 2000), la malaria (Rosenthal *et al.*, 1998; Dahlgren *et al.*, 2003) y el mal de Alzheimer (Maccioni *et al.*, 2001; Roberts, 2002).

Las proteasas cisteínicas tipo papaína han sido identificadas como claves en patologías relacionadas con desórdenes degenerativos, invasivos y del sistema inmune (Lecaille *et al.*, 2002; Brömme & Kaleta, 2002). La catepsina K tiene como principal acción la degradación del hueso en los osteoclastos y su inhibición selectiva puede ser beneficiosa en el tratamiento de la osteoporosis y en ciertas formas de artritis (Gowen *et al.*, 2000; Yamashita & Dodds, 2000; Hou *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la catepsina S desempeña un rol fundamental en la presentación de antígenos clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC); la inhibición de la catepsina S disminuye significativamente la respuesta a antígenos, hecho que convierte a esta enzima en un nuevo blanco para drogas contra el asma y ciertas enfermedades autoinmunes (Cimerman *et al.*, 2001; Riese *et al.*, 1998). Las catepsinas han sido también implicadas en la invasión tumoral y en las metástasis (Levicar *et al.*, 2002). Recientemente se ha desarrollado un creciente interés en el rol que juegan las proteasas cisteínicas en un amplio rango de enfermedades



parasitarias como la malaria, la enfermedad de Chagas y la esquistosomiasis (Lecaille *et al.*, 2002; McKerrow, 1999). Las proteasas cisteínicas tipo papaína cumplen en los organismos parásitos roles indispensables en el crecimiento, diferenciación celular, señalización e invasión al huésped y actúan frecuentemente como factor de virulencia, atacando al sistema inmune del huésped (Sajid & McKerrow, 2002).

Si bien las proteasas que participan en cada una de las enfermedades mencionadas son específicas, el hecho de que muchas de ellas compartan un mismo mecanismo catalítico facilita el diseño de moléculas que puedan interferir en su actividad y convertirse, en consecuencia, en potenciales fármacos para el tratamiento terapéutico de aquéllas. Ello no significa necesariamente que el mismo fármaco resulte de aplicación en enfermedades de distinta etiología, pero es obvio que en la medida en que se incremente el conocimiento de la estructura y de las características catalíticas de nuevas proteasas se dispondrá de nueva información básica que redundará en la conformación de una base de datos multipropósito en constante crecimiento. Seguramente es aquí donde debe buscarse la razón del renovado interés que se advierte en muchos grupos de investigación por el estudio de proteasas y de inhibidores de distinto origen.

#### 1.4.1.1. Clasificación y Nomenclatura de las enzimas proteolíticas

El primer término con el que se denominó a las enzimas proteolíticas fue el de *proteasas* y surgió a finales del siglo XIX como un término general que abarcaba a todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Más adelante un grupo de investigadores alemán sugirió el término *proteinasas* para denominar a aquellas proteasas que tienen como sustrato a las proteínas y *peptidasas* a aquellas enzimas que tienen como sustrato a los péptidos de menor peso molecular. Sin embargo, también fue utilizado el término *peptidasa* en un sentido más amplio, abarcando a todas las hidrolasas del enlace peptídico (Barrett, 2004). Dado que el uso del término *peptidasa* ha generado confusión, el Comité de Nomenclatura de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica

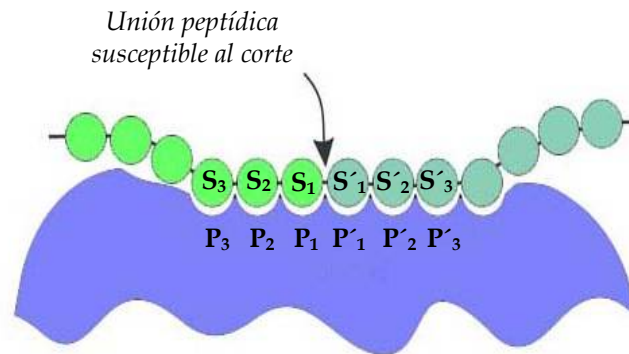
y Biología Molecular (NC-IUBMB) en el año 1984 ha recomendado el uso de este término en un sentido general para todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Según esta nomenclatura, las peptidasas pertenecen a la clase de las hidrolasas (EC 3) y, dentro de esta clase, a la subclase EC 3.4, que contiene las enzimas que catalizan la hidrólisis de la unión peptídica.

Según la ubicación de los enlaces hidrolizados, las peptidasas a su vez se dividen en dos grandes grupos: las *endopeptidasas* –que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína– y las *exopeptidasas* – que remueven uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino–.

Las endopeptidasas difieren de casi todas las demás enzimas en que su especificidad de sustrato resulta extremadamente difícil de definir, hecho que llevó a Hartley (1960) a proponer una clasificación de las mismas basada en las características de sus respectivos mecanismos catalíticos, constituyendo en la actualidad siete-subgrupos en la clasificación internacional: endopeptidasas serínicas, endopeptidasas cisteínicas, endopeptidasas aspárticas, metalo-endopeptidasas, endopeptidasas treonínicas, endopeptidasas glutámicas y endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido. Cada una de las sub-subclases de endopeptidasas mencionadas posee un mecanismo catalítico distintivo, pero aún así pueden agruparse en dos grandes categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (serínicas, cisteínicas y treonínicas) y las que no forman complejos enzima-sustrato covalentes (aspárticas, glutámicas y metalopeptidasas).

Schechter & Berger (1967) han propuesto un modelo conceptual para referirse a la especificidad de una peptidasa. En este modelo se consideran los residuos de aminoácido del sustrato (P) que se unen a subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser clivado hacia el N-terminal como P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P<sub>1</sub>', P<sub>2</sub>', P<sub>3</sub>', etc. Los subsitios de la proteasa que “acomodan” los residuos del sustrato se numeran como S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> y S<sub>1</sub>', S<sub>2</sub>'.

S<sub>3</sub>', respectivamente, (Figura 1). El esquema presentado está obtenido de Turk & Guncar, 2003.



**Figura 1.** Interacción enzima-sustrato. Esquema representativo del sistema de nomenclatura de Schechter y Berger para los subsitios del sitio activo de una peptidasa.

A la información sobre el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) se puede acceder en el sitio <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>.

A medida que un área de investigación crece se hace necesario un sistema de nomenclatura y clasificación para facilitar el manejo de toda la información y que además permita la comunicación entre las personas y el almacenamiento y búsqueda de dicha información sin ambigüedades. En este sentido los sistemas EC y MEROPS, con diferentes criterios, ordenan, clasifican y reúnen la información acerca de las peptidasas.

El sistema EC tiene la desventaja de no tener en cuenta la existencia de grupos estructurales que reflejen las relaciones evolutivas de las peptidasas miembro de cada clase; por esta causa en 1993 Rawlings & Barrett comenzaron el diseño de un sistema de clasificación de peptidasas que salva esa deficiencia y agrupa a las peptidasas teniendo en cuenta esta característica fundamental. El sistema se sigue perfeccionando durante algunos años hasta que en 1996 comienza a publicarse en la web como base de datos de proteasas MEROPS (Rawlings *et al.*, 2006, <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>) donde se encuentran más de dos mil peptidasas con número de identificación y cerca de 2500

secuencias. Este sistema de clasificación tiene en cuenta los conceptos de *tipo catalítico, clan, familia y peptidasa* (Tabla 1).

<i>Nivel</i>	<b>Descripción</b>
<i>Clan</i>	Conjunto de familias en las que todas las peptidasas han evolucionado a partir de un único ancestro. Las familias en el mismo clan tienen en común que las peptidasas que las integran exhiben tipos de plegamiento similares
<i>Familia</i>	Una familia incluye peptidasas que presentan homología en la secuencia aminoacídica de la región encargada de la actividad enzimática
<i>Peptidasa</i>	Una peptidasa es un grupo de proteínas que muestran una actividad proteolítica particular y que están muy estrechamente relacionadas en secuencia

**Tabla 1.** Sistema MEROPS de clasificación de peptidasas.

El concepto de tipo catalítico de una peptidasa depende de la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis (Barrett *et al.*, 2004).

En los clanes y familias se agrupan peptidasas homólogas. Un clan contiene una o más familias de peptidasas que muestran tener un origen común, es decir que están relacionadas evolutivamente. La evidencia más clara de homología en el nivel de clan está dada por la similitud en la estructura terciaria. En las familias, las peptidasas están agrupadas en base a la homología de su secuencia aminoacídica, particularmente en la zona de la molécula responsable de la actividad enzimática (Barrett *et al.*, 2004).

La mayoría de los clanes están formados por peptidasas de un solo tipo catalítico, tal el caso del clan CA, formado por varias familias de peptidasas cisteínicas. La primer peptidasa reconocida como de tipo cisteínico fue papaína,

prototipo de la familia C<sub>1</sub> y del clan CA. Casi todas las peptidasas cisteínicas de origen vegetal pertenecen a la familia C<sub>1</sub>.

#### 1.4.1.2. Mecanismos catalíticos de las endopeptidasas

##### 1.4.1.2.1. Peptidasas serínicas y treonínicas

Esta clase de peptidasas comprende dos familias distintas: la familia de la quimotripsina que incluye enzimas de mamíferos (quimotripsina, tripsina, elastasa), plantas y microorganismos y la familia de la subtilisina, que si bien en un principio se creyó constituida solamente por enzimas bacterianas (ejemplo: subtilisina), actualmente se han encontrado representantes en otros microorganismos, en plantas y en animales superiores. Si bien la estructura general tridimensional es diferente en las dos familias, ambas tienen la misma geometría de sitio activo y en consecuencia catalizan las reacciones con el mismo mecanismo. Las proteinasas serínicas exhiben diferentes especificidades de sustrato, relacionadas con las sustituciones de aminoácidos en varios subsitios enzimáticos que interactúan con los residuos de los sustratos. Algunas enzimas tienen un amplio sitio de interacción con el sustrato, mientras que otras tienen una especificidad restringida al residuo P<sub>1</sub> del sustrato.

La actividad de las mismas suele ser máxima a valores de pH alcalinos y no requieren activadores, aunque los iones calcio intervienen en la activación de algunas proenzimas y estabilizarían a algunas enzimas.

Si bien estas enzimas son las más estudiadas en el campo de las proteasas, son relativamente pocas las que se conocen dentro de los vegetales. Entre ellas pueden citarse cucumisina, aislada de *Cucumis melo* L. var. Prince (Kaneda & Tominaga, 1975; Kaneda *et al.*, 1995; Uchikoba *et al.*, 1995); macluralisina obtenida de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Rudenskaya *et al.*, 1995); taraxalisina extraída de *Taraxacum officinale* Webb s.l. (Rudenskaya *et al.*, 1998), cryptolepaína purificada y caracterizada a partir de *Cryptolepis Buchanan* (Pande *et al.*, 2006), carneína de *Ipomoea carnea* (Patel *et al.*, 2007) y wrightiaína, una proteasa estable aislada del látex de *Wrightia tinctoria* (Tomar *et al.*, 2008). También fueron estudiadas las enzimas obtenidas a partir de *Benincasa cerifera* (Kaneda &

Tominaga, 1977), de *Trichosantes cucumeroides* Maxim. (Kaneda *et al.*, 1986), *Trichosantes bracteata* (Lam.) Voigt (Kaneda & Uchikoba, 1994), de *Cucurbita ficifolia* (Curotto *et al.*, 1989), de *Synadenium grantii* Hook, 'f'. (Menon *et al.*, 2002), de *Euphorbia supina* (Arima *et al.*, 2000) y *Euphorbia milii* (Yadav *et al.*, 2006), de *Melothria japonica* (thumb) Maxim (Uchikoba *et al.*, 2001) y de *Cucumis trigonus* Roxburghi (Asif-Ullah, *et al.* 2006), entre otras.

#### 1.4.1.2.2. Peptidasas cisteínicas

Esta clase incluye las proteasas vegetales más extensamente estudiadas, tales como papaína, ficina, actinidina o bromelaína, varias catepsinas de mamíferos, calpaínas citosólicas y algunas proteasas de parásitos como las de *Trypanosoma*. La mayoría de las peptidasas de esta clase están incluidas dentro de la familia de la papaína, que es la enzima cisteínica más ampliamente estudiada, responsable de los principales avances no solamente en el campo de las proteinasas cisteínicas sino en la enzimología en general. Ha sido la primera proteínasa cisteínica a la que se le determinó la estructura tridimensional (Drenth *et al.*, 1968), por lo que es considerada como el arquetipo de esta clase de peptidasas.

Actualmente se sabe que estas peptidasas se sintetizan en los polisomas del citoplasma como un precursor o propéptido N-terminal de corta longitud y otro C-terminal más largo. Esta proenzima inactiva se dirige al lumen del retículo endoplasmático y luego es transportada a las vacuolas o a la pared celular que constituyen su destino final. La mayoría de las proteínas solubles de las plantas poseen una secuencia señal a nivel del C-terminal reconocida por un receptor del aparato de Golgi (Okamoto *et al.*, 2003) y luego transportada por la red trans Golgi. Sin embargo, ciertas peptidasas de la familia de la papaína tienen una secuencia señal de retención al retículo endoplasmático y así, son transportadas en grandes vesículas que emergen del retículo y se fusionan directamente con las vacuolas almacenadoras de proteínas, sin pasar por el Aparato de Golgi, (Okamoto *et al.*, 2003). Finalmente, cuando se remueven las secuencias C y N-terminales del propéptido en estas vacuolas adoptan la conformación nativa

que es la estructura química con capacidad de cumplir su función biológica (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

Al igual que en las proteasas serínicas, la catálisis ocurre a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo cisteína y un residuo histidina. La Cisteína 25 y la Histidina 159 (de acuerdo a la numeración de papaína) juegan el mismo rol de la Serina 195 y de la Histidina 57, respectivamente. El nucleófilo en este caso no es un grupo -OH, sino un ion tiolato que es estabilizado a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la Histidina 159. Siendo el nucleófilo atacante el par iónico tiolato-imidazol en ambas etapas, no se requiere una molécula de agua. La cisteína catalítica está involucrada en un equilibrio tautomérico entre las formas neutras y dipolar (zwitterion). Se cree que el sulfuro aniónico está involucrado directamente en un ataque nucleofílico en el carboxilo del sustrato. La ruptura del mismo implica el ataque del agua catalizado por la enzima.

Dado que estas enzimas son inactivadas por reactivos bloqueantes de los grupos sulfhidrilo por conversión en puentes disulfuro y tienen la capacidad de reactivarse en presencia de agentes reductores, se las denominó "tiolproteinasas" (Hartley, 1960). Considerando que el único aminoácido que posee un grupo sulfhidrilo (tiol) en la cadena lateral es la cisteína, se sugirió sustituir el término "tiolproteinasas" por el de "proteinasas cisteínicas" (NC-IUBMB, 1984) (Figura 2, esquema tomado de <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>).

Como ejemplos de peptidasas cisteínicas vegetales se pueden citar a las aisladas de *Carica papaya* (Azarkan *et al.*, 2003, Azarkan *et al.*, 2006), de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001), de *Araujia angustifolia* (Obregón *et al.*, 2006), de *Melia azedarach* (Uchickoba *et al.*, 1999), de *Calotropis gigantea* (Rajesh *et al.*, 2005), de *Bromelia hieronymi* Mez (Bruno *et al.*, 2003, Bruno *et al.*, 2006, Bruno, 2007), de *Bromelia balansae* Mez (Pardo *et al.*, 2001), de *Bromelia pinguin* (Abreu Payrol *et al.*, 2005, Abreu Payrol *et al.*, 2007), de *Bromelia fastuosa* (Cabral, 2006), de *Funastrum clausum* (Morcelle del Valle *et al.*, 2004a;

Morcelle del Valle, 2004 b), de *Asclepias curassavica* (Liggieri, et al. 2004, Liggieri, 2005), de *Phillibertia gilliesi* (Sequeiros et al., 2005; Sequeiros, 2006), de *Carica candamarcensis* (Pereira, et al., 2001), de *Calotropis procera* (Freitas et al., 2007) y *Vasconcellea spp.* (Kyndt et al., 2007) entre otras.

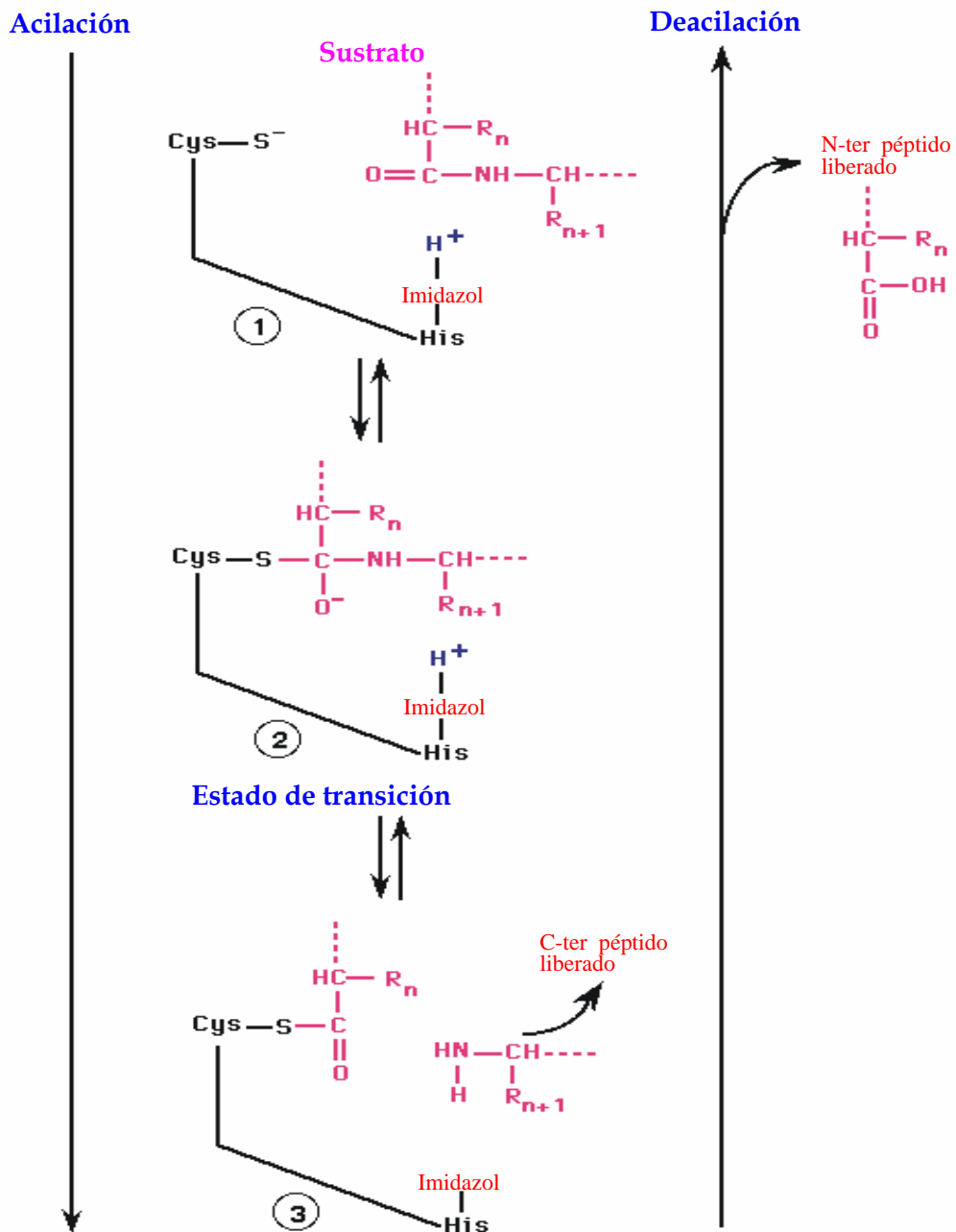


Figura 2. Mecanismo catalítico de las proteinasas cisteínicas.



#### 1.4.1.2.3. Peptidasas aspárticas

La mayoría de las proteinasas aspárticas estudiadas pertenecen a la familia de la pepsina. Esta familia incluye enzimas digestivas tales como pepsina y quimopepsina, catepsina D y algunas proteasas fúngicas. Una segunda familia incluye proteínas virales tales como la proteasa del virus del SIDA, llamada retropepsina.

Estudios cristalográficos permitieron mostrar que estas enzimas son moléculas constituidas por dos lóbulos homólogos, con el sitio activo localizado entre ambos. Cada lóbulo contribuye con un residuo aspártico de la díada activa de aspartatos. Estos dos residuos aspárticos están geoméricamente muy próximos en la molécula activa y uno sólo de ambos aspartatos es ionizado en el rango de pH óptimo (2-3). Por actuar en forma óptima a bajos valores de pH estas proteinasas también fueron denominadas “proteinasas ácidas” por Hartley (1960).

Las proteasas aspárticas vegetales conocidas han sido aisladas y caracterizadas a partir de hojas, flores y semillas de diferentes especies. Entre ellas podemos mencionar phytepsina aislada a partir de especies de *Arabidopsis*, *Brassica*, *Centaurea*, *Cynara*, *Hordeum*, *Lycopersicum*, *Oryza* y *Vigna*, (Kervinen, 1998, A. Kulkarni & M. Rao, 2007) además de cyprosina obtenida a partir de *Centaurea calcitrapa* y de *Cynara cardunculus* (Cordeiro *et al.*, 1998) y cardosina A (Pires, 1998a) y cardosina B (Pires, 1998b) aisladas de *Cynara cardunculus*. Recientemente se aisló otra proteasa aspártica de la especie *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Vairo Cavalli, 2005). Por otra parte, recientemente se ha caracterizado una proteasa aspártica de *Arabidopsis* implicada en procesos de defensa (Simões *et al.*, 2007).

Estas enzimas pueden ser monoméricas o heterodiméricas, conteniendo dos péptidos procesados a partir del mismo precursor proteico. Las proteinasas aspárticas de los vegetales son generalmente secretadas o bien destinadas al compartimento vacuolar. La secuencia primaria de algunas de estas enzimas ha sido determinada y presentan un alto grado de identidad con las de origen animal y microbiano; sin embargo, las proteinasas aspárticas vegetales tienen

una región muy específica que no se encuentra en animales, microorganismos o proteínas virales. Si bien la función de esta región no ha sido aún elucidada se ha propuesto una función en el procesamiento o degradación de proteínas, aunque se requerirían más estudios para confirmar su función *in vivo*. Resultados más recientes sugieren posibles roles en la muerte celular programada de los tejidos y en la resistencia a los patógenos (Mutlu & Gal, 1999).

#### 1.4.1.2.4. Metalopeptidasas

Las metaloproteinasas se encuentran entre las hidrolasas en las cuales el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado por una molécula de agua. Esta es una característica compartida con las proteasas aspárticas, pero en las metaloproteasas un catión metálico divalente, usualmente cinc, aunque algunas veces cobalto, níquel o manganeso, activan la molécula de agua. El ión metálico es generalmente sostenido por tres aminoácidos ligandos.

Estas proteinasas se dividen en dos grandes grupos dependiendo del número de iones metálicos requeridos para la catálisis. En varias metaloproteasas se requiere solamente un ión cinc, pero en algunas son dos los iones metálicos que actúan cocatalíticamente. Todas aquellas en las que son esenciales cobalto o manganeso, se requieren dos iones metálicos, aunque hay familias dependientes de cinc en las que también dos iones son cocatalíticos. En las proteinasas con iones metálicos cocatalíticos, solamente cinco residuos aminoácidos actúan como ligandos, siendo uno de ellos el que liga a ambos iones. Todas las metaloproteinasas con iones metálicos cocatalíticos son exopeptidasas, mientras que las metaloproteinasas con un ion metálico catalítico pueden ser exo- o endopeptidasas. Los ligandos conocidos son Histidina, Glutamina, Aspártico o Lisina.

Estas enzimas difieren ampliamente en sus secuencias y en sus estructuras pero la gran mayoría contiene un átomo de cinc catalíticamente activo. En algunos casos, el cinc puede ser reemplazado por otro metal como cobalto o níquel sin pérdida de la actividad. La termolisina bacteriana ha sido bien

caracterizada y su estructura cristalográfica indica que el zinc está unido por dos histidinas y un ácido glutámico.

Varias enzimas contienen la secuencia HEXXH, la cual provee dos ligandos histidinas para el cinc mientras el tercer ligando es tanto ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanilaminopeptidasas) o una histidina (astacina). Otras familias exhiben un modo diferente de unión al átomo de cinc. Las metalopeptidasas constituyen el grupo de enzimas proteolíticas menos estudiado en los vegetales. Existen solamente unas pocas referencias sobre la presencia de esta clase de enzimas en semillas de *Cucurbita pepo* (Hara & Matsubara, 1980), de soja: *Glicine max* (Bond & Bowles, 1983), de *Canavalia ensiformis* (Dalkin *et al.*, 1983) y de *Fagopyrum esculentum* (Belozersky *et al.* 1990). Recientemente se han aislado de *Arabidopsis thaliana* (Chabregas, 2003).

#### 1.4.1.2.5. Peptidasas glutámicas

Las proteasas glutámicas en un principio fueron denominadas "carboxilpeptidasas insensibles a la pepstatina". Son similares a las aspárticas, de origen fúngico y pertenecen a la denominada familia G1. La importancia de los residuos glutámico 136 ("E") y glutamina 53 ("Q") en el sitio activo de estas proteasas llevó a proponer el término "familia EQolisina" para referirse a las mismas. El mecanismo sugerido es un ataque nucleofílico por una molécula de agua activada por la cadena lateral del glutámico 136 formando el intermediario tetraédrico con el átomo de C del enlace peptídico que se escinde. La asistencia electrofílica y la estabilización del oxianión son provistas por la amida de la Glutamina 153. (Fujinaga *et al.*, 2004).

#### 1.4.1.2.6. Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido

Existe un número de peptidasas para las cuales el mecanismo catalítico no se ha elucidado. Aquellas sobre las cuales se conoce la secuencia de aminoácidos se han denominado con la letra "U" ("unclassified") sin considerar el mecanismo catalítico y se les asigna además un número arbitrario, por ejemplo

Familia U28 que contiene dipeptidasa E de *Escherichia coli*. Las bases de datos muestran 20 familias de peptidasas no clasificadas (Barrett, *et al.*, 2004).

### 1.5. Proteasas de látex

En el curso de su desarrollo todas las células recambian proteínas y por lo tanto contienen enzimas proteolíticas para cumplir dicha función. Generalmente estas proteasas se encuentran en cantidades relativamente bajas y son frecuentemente difíciles de detectar si no se emplean sustratos muy sensibles. Sin embargo, algunas especies de plantas poseen gran concentración de proteasas en ciertos tejidos. Un ejemplo de ello es el látex obtenido a partir de plantas de diversas familias en el que las enzimas proteolíticas superan el 50% de las proteínas totales. En estos casos la actividad proteolítica es por lo menos superior en dos órdenes de magnitud a la encontrada en otros tejidos. La abundancia de estas proteasas por sobre los requerimientos para el crecimiento y el desarrollo celular indican que podrían actuar como "aleloquímicos" (Dalling, 1986; Kono *et al.*, 2004).

Proteasas cisteínicas de látex de frutos tales como papaína y ficina son conocidas por digerir la cutícula de los nematodos y presentar baja toxicidad, por lo que se utilizan desde hace tiempo en el tratamiento gastrointestinal de infecciones por nematodos tanto en animales como en el hombre (Stepenk *et al.*, 2004).

#### 1.5.1. Proteasas de látex de *Asclepiadaceae*

En el año 1811 Robert Brown separó la familia *Asclepiadaceae* de *Apocynaceae* (Jussieu, 1789). Sin embargo, a raíz de recientes trabajos sobre teorías filogenéticas basadas en el análisis de ADN, se han fusionado nuevamente como *Apocynaceae* (Endress & Bruyns, 2000) siendo *Asclepiadaceae* considerada en la actualidad por muchos autores como la subfamilia *Asclepiadoideae*. Si bien esto ha sido aceptado por muchos investigadores, no hay aún unanimidad de criterios en tal sentido, por lo que en el presente trabajo se considerará como familia *Asclepiadaceae*.

Los primeros trabajos en cuanto a la detección de proteasas en el látex de esta familia datan del año 1940 en que Winnick y colaboradores aislaron del látex de *Asclepias speciosa* una proteinasa cisteínica a la que denominaron asclepaína s. En el mismo año Greenberg & Winnick (1940) obtuvieron una enzima de iguales características a partir del látex de *Asclepias mexicana* (asclepaína m), ambas con máxima actividad a pH 7,5 frente a hemoglobina desnaturalizada y ovalbúmina como sustratos.

Poco tiempo después Carpenter & Lovelace (1943) determinaron que el pI de una proteasa aislada de *Asclepias syriaca* es de 3,1. El látex de esta especie fue sometido a posteriores estudios (Brockbank & Lynn, 1979; Lynn *et al.*, 1980), que revelaron la existencia de al menos dos tipos de proteasas, cada una de ellas con múltiples formas que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos, su pH óptimo (7 y 8,5) y su peso molecular (21 y 23 kD), aún cuando su comportamiento frente a la cadena  $\beta$  de insulina muestra una especificidad similar. Barragán *et al.* (1985); y Tablero *et al.* (1991) estudiaron las distintas formas moleculares de proteasas presentes en el látex de *Asclepias glaucescens*, que no difieren significativamente de las encontradas en las anteriores especies: si bien el pI varía entre 3,6 y 9,2, las proteasas más abundantes (de pI superior a 9) tienen un peso molecular de 23 kD y su estructura secundaria es muy similar a la de papaína.

Del látex de *Calotropis gigantea* se aislaron inicialmente dos cisteinilproteasas (Abraham & Joshi, 1979a, 1979b), denominadas calotropina FI y calotropina FII; se trata de glicoproteínas de parecido peso molecular (23-27 kD) que muestran dos valores óptimos de pH sobre hemoglobina (4,3 y 8,1) y similar composición aminoacídica. Un estudio posterior (Pal & Sinha, 1980) reveló la existencia de dos proteinasas adicionales (calotropinas DI y DII) que pudieron cristalizarse y que poseen un único máximo de actividad frente a azoalbúmina (pH 7,5-8,0); su peso molecular está dentro del mismo rango (24 kD) pero su composición aminoacídica difiere de las anteriores. A partir de *Calotropis procera* se ha aislado proceraína (Kumar Dubey & Jagannadham, 2003), una proteasa cisteínica de 28,8 kDa y pI 9,32 que es capaz de hidrolizar N-succinil-Ala-Ala-Ala-p-

nitroanilida pero no N-succinil-L-Ala-Ala-p-nitroanilida, N-succinil-L-Ala-p-nitroanilida ni N-d-Benzoil DL-Arg-p-nitroanilida; la enzima no está glicosilada, tiene el N-terminal bloqueado y contiene 8 residuos de triptofano, 20 de tirosina y 7 de cisteína. En estudios más recientemente se analizó el perfil enzimático del látex de *Calotropis procera* (Freitas *et al.*, 2007) detectándose que la mayor actividad proteolítica es debida a la presencia de al menos cuatro proteinasas cisteínicas a las que le asignan el rol de defensa que posee el látex en las plantas.

Posteriormente se purificaron y caracterizaron varias peptidasas a partir del látex de otras especies de *Asclepiadaceae*. A partir del látex de *Araujia hortorum* Fourn. mediante cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa CL 6B) se han purificado tres endopeptidasas cisteínicas: araujaína h I, h II y h III, cuyos pesos moleculares son 24,0 kD, 23,7 kD y 23,5 kD, respectivamente; las tres mostraron preferencia por el derivado de Gln para sustratos del tipo N $\alpha$ -CBZ-aa-p-nitrofeniléster y un perfil de pH sobre caseína con máximo de actividad entre pH 8,0 y 9,0. Araujaína h I y h III tienen pI > 9,3, mientras que araujaína h II tiene un pI algo más bajo (8,9). La secuencia N-terminal de araujaína h II reveló un 68% de identidad con quimopapaína y un 59% con araujaína h III, en tanto que araujaína h I tiene el N-terminal bloqueado (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001). Funastraína c II fue aislada a partir del látex de *Funastrum clausum* (Jacq.) Schlechter por cromatografía de intercambio iónico, utilizando SP-Sepharosa FF, su peso molecular es de 23,6 kD y su pI > 9,3. Se determinó el pH óptimo sobre caseína (pH 9,0-10,0) y empleando PFLNA (Filippova *et al.*, 1984) (pH 6,8); con este sustrato el valor de Km fue 0,1011 mM y kcat 0,9 s<sup>-1</sup>. La secuencia N-terminal tiene 75% de identidad con asclepaína a y 71% con asclepaína b (ambas enzimas de *Asclepias syriaca*) y 70% con araujaína h III (Morcelle *et al.*, 2004b). Del látex de *Asclepias curassavica* L. también se ha aislado por cromatografía de intercambio iónico utilizando SP-Sepharosa FF una endopeptidasa cisteínica denominada asclepaína c I, que posee un pI > 9,3, un peso molecular de 23,2 kD, manifiesta preferencia por el derivado de Gln para sustratos del tipo N $\alpha$ -CBZ-aa-p-nitrofeniléster y un valor de Km 0,818 mM frente a PFLNA (Liggieri *et al.*, 2004).

También se han estudiado dos especies pertenecientes al género *Morrenia*: *M. brachystephana* Griseb. (Vairo Cavalli *et al.*, 2003) y *M. odorata* (Hook *et Arn.*) Lindley; del látex de *M. brachystephana* se aislaron morrenaína b I y b II, que difieren en cuanto a su preferencia sobre sustratos del tipo N $\alpha$ -CBZ-aa-*p*-nitrofenil éster (morrenaína b I mostró mayor afinidad para el derivado de Asp, mientras que morrenaína b II hizo lo propio con el derivado de Gly); la secuencia N-terminal de morrenaína b I muestra un 73% de identidad con araujaína h II y sólo un 47% de identidad con morrenaína b II. Morrenaína o II fue obtenida a partir del látex de *M. odorata*; su N-terminal tiene un 95% de identidad con el de morrenaína b II, ambas tienen un pI > 9,3 pero difieren en los valores de Km y kcat frente a los derivados N $\alpha$ -CBZ-aa-*p*-nitrofeniléster de Ala, Asp y Gly (Vairo Cavalli *et al.*, 2001). Recientemente se ha demostrado la presencia de varias proteasas en el látex de *Philibertia gilliessi* Hook. *et Arn.* (Sequeiros *et al.* 2005) y se ha purificado una de ellas denominada philibertaína g I, que es una endopeptidasa cisteínica básica (pI > 10,25), con un peso molecular de 23,5 kD que hidroliza al PFLNA (Km 0,15 mM) y cuya secuencia N-terminal tiene un 73% de identidad con la de caricaína (proteasa de *Carica papaya*).

A partir del látex de *Ervatamia coronaria* se han purificado y caracterizado tres proteasas cisteínicas, llamadas ervatamaína A, B y C. Ervatamaína B y C fueron cristalizadas en el año 1999 y se les determinó la estructura cristalográfica preliminar con una resolución de 2,5 y 2,6 Å, respectivamente (Chakrabarti *et al.* 1999).

Ervatamaína A (Nallamsetty *et al.*, 2003) exhibe alta actividad proteolítica frente a sustratos naturales y amidolítica frente a sustratos sintéticos, posee una masa molecular de 27,6 kD y su pI es 8,37. En su molécula hay 11 residuos de tirosina, 8 de triptofano y 7 de cisteína. La secuencia N-terminal muestra los aminoácidos típicamente conservados en las proteasas cisteínicas.

Ervatamaína B ha sido purificada por cromatografía de intercambio iónico y cristalización (Kundu *et al.*, 2000), su pI es 9,35 y la masa molecular fue estimada en 26 kD por SDS-PAGE y gel filtración. Posee 7 residuos de

triptofano y 10 de tirosina por molécula y sólo 2 puentes disulfuro, en lugar de los tres típicos de las proteasas cisteínicas. La enzima hidroliza sustratos naturales desnaturalizados como caseína, azoalbúmina y azocaseína con alta actividad específica, además de mostrar actividad amidolítica frente a N-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilida con un valor de  $K_m$  6,6 mM. Se estudiaron los cambios conformacionales inducidos en dicha enzima por el agregado de diferentes alcoholes e incrementos de temperatura (Kundu *et al.*, 2002). En un trabajo posterior (Biswas *et al.*, 2003) se determinó la estructura cristalográfica de ervatamaína B con una resolución de 1,63 Å, se pudo inferir su estructura primaria y se detectaron varias sustituciones con respecto a papaína que justifican la alta estabilidad de esta enzima, así como su especificidad de sustrato.

Ervatamaína C (Thakurta *et al.*, 2004) es una enzima muy estable que ha sido cristalizada y de la cual se ha determinado su secuencia. Si bien la estructura tridimensional en general es similar a la de los otros miembros de la familia de la papaína, presenta la sustitución de algunos residuos de aminoácidos que normalmente están conservados tanto en los dominios L y R como en la región de la hendidura del interdominio. Estas sustituciones provocarían un incremento en el número de interacciones (puente de H) intra e interdominios, fortaleciendo la estructura de ervatamaína C. Por otra parte se ha identificado en el dominio R una única unión disulfuro, en contraposición a las tres conservadas en la familia de la papaína. Todos estos factores contribuyen a un aumento en la estabilidad de ervatamaína C. En esta enzima, la naturaleza del subsitio S2, que es el primer determinante de especificidad de estas proteasas, es similar a papaína, pero en el subsitio S3 Ala reemplaza a un residuo aromático y tiene el efecto de eliminar las interacciones hidrofóbicas requeridas para la estabilización de S3-P3. Esto explicaría la menor actividad de ervatamaína C para sustratos o inhibidores pequeños. Esta sustitución, sin embargo, no afecta significativamente la unión de sustratos proteicos naturales desnaturalizados a la enzima, porque existen varias interacciones adicionales enzima-sustrato fuera de la hendidura del sitio activo.



A partir del látex de *Ervatamia heyneana* ha sido purificada una nueva peptidasa cisteínica muy estable y con alto contenido de cisteínas (Patel & Jagannadham, 2003); la enzima tiene una masa molecular de 23 kD, su pI es 10,8 y posee 11 residuos de cisteína.

Más recientemente, en el látex de *Vasconcellea spp.* se detectó elevada actividad proteolítica debida a la presencia de una alta concentración de proteasas cisteínicas que al ser secuenciadas a partir de sus cADN mostraron elevada homología con otras proteasas cisteínicas provenientes de diferentes especies de *Caricaceae* (Kindt *et al.*, 2007).

## 2. INTRODUCCIÓN AL MUNDO DE LAS “ÓMICAS”

El avance de la genética molecular y celular y el poder de las tecnologías de la información ha permitido que la genómica, junto con la bioinformática, estén generando catálogos completos de todos los genes, además de su localización y función. Este avance de la ciencia ha sido exponencial en los últimos 30 años.

Las aproximaciones tradicionales para aislar genes de plantas implicaban la utilización de técnicas moleculares y genéticas, incluyendo la prospección de genotecas, clonación basada en la homología y el mapeo, así como la selección de mutantes fisiológicos y de desarrollo. La mayoría de estas estrategias experimentales van encaminadas a la caracterización de un solo gen y su aislamiento es un prerrequisito para llevar a cabo cualquier estudio posterior. Sin embargo, actualmente es cada vez más frecuente arrancar un proyecto de investigación con una secuencia de ADN encontrada en una base de datos y se pueden identificar nuevos genes por búsqueda directa en las bases de datos en virtud de su similitud con genes conocidos, una aproximación bioinformática análoga a la prospección de una genoteca usando hibridación con sondas de ácidos nucleicos. Las iniciativas genómicas y los recursos de la internet que contienen información de secuencias han cambiado en forma drástica la biología experimental en plantas, proporcionando a los investigadores nuevos caminos para el descubrimiento de genes. El gran tamaño de muchos de los

genomas de plantas hace que esta aproximación se haya limitado, sin embargo, a unas pocas especies.

Con el aumento de secuencias de genes en las bases de datos se ha producido una explosión en la aplicación de herramientas a gran escala para analizar perfiles de expresión en los sistemas biológicos. La capacidad de analizar cualitativa y cuantitativamente poblaciones de ARNm (transcriptómica) y proteínas (proteómica) suscita la tentadora posibilidad de descifrar las rutas reguladoras y funcionales que representan el puente entre el genotipo y el fenotipo.

El término proteómica se está convirtiendo en algo ambiguo que engloba casi cualquier aspecto de la expresión de proteínas, el estudio de su estructura o su función. Sin embargo, en términos generales, deberíamos definirlo como el estudio del perfil del conjunto de proteínas complementarias del genoma que sería análogo al perfil de transcritos en una situación dada. A diferencia de los estudios de transcriptómica en los que el ARN se extrae y manipula con facilidad, los estudios con proteínas presentan múltiples desafíos: su heterogeneidad fisicoquímica y complejidad estructural, lo que complica su extracción, solubilización, manejo, separación e identificación. Además, no existe ningún tipo de tecnología similar a la PCR que permita amplificar aquellas proteínas que son poco abundantes. Algunos de estos problemas son particularmente críticos cuando se trabaja con tejidos vegetales. Existen bases de datos disponibles que contienen datos sobre perfiles de proteínas. La segunda categoría en el análisis de proteómica es la llamada proteómica comparativa, donde el objetivo no es ya identificar todas las proteínas presentes en una situación concreta, sino caracterizar las diferencias entre distintas poblaciones de proteínas en dos situaciones biológicas diferentes.

Aunque gran parte del esfuerzo en proteómica se ha realizado en la puesta a punto de métodos de alta resolución para separar e identificar proteínas, uno de los pasos críticos es la extracción y preparación de muestras. Los tejidos vegetales son usualmente más complicados a la hora de preparar extractos de proteínas que otras fuentes biológicas. Tienen menor contenido de proteínas,

usualmente contienen más proteasas y otros compuestos que interfieren en la estabilidad de las proteínas –polisacáridos, lípidos y compuestos fenólicos–, además de toda una colección de metabolitos secundarios que pueden interferir no sólo en el proceso de extracción, sino también en el fraccionamiento y posterior análisis.

Finalmente, la metabolómica aparece como una nueva herramienta funcional de la genómica que contribuye a la comprensión de las complejas interacciones moleculares en los sistemas vivos. Al ser una de las últimas ómicas aparecidas, presenta todavía muchos campos metodológicos que se pueden y se deben mejorar antes de que aparezcan bases de datos que nos permitan integrar las concentraciones de metabolitos con el resto de recursos de la genómica. El puente necesario que debe existir entre la metabolómica y las otras aproximaciones de la genética funcional: transcriptómica y proteómica, permitirá el desarrollo de bases de datos que almacenen, integren, relacionen y permitan establecer relaciones causales entre genes, transcritos, proteínas y metabolitos.

Los metabolitos de las plantas están implicados en muchas de las respuestas de resistencia al ataque de patógenos, en condiciones de estrés y contribuyen al color, sabor y olor de flores y frutos. El fenotipo bioquímico de una planta es el resultado de la interacción entre el genotipo y el entorno. Por tanto, se necesita identificar y cuantificar los metabolitos para estudiar la dinámica del metaboloma y analizar los flujos metabólicos. El reto de la metabolómica reside en encontrar cambios en las cantidades de metabolitos que se puedan correlacionar con el estado fisiológico y de desarrollo de una célula, de un tejido o de un organismo.

Para obtener un conocimiento global de cómo funciona un sistema biológico es esencial saber cómo responde utilizando los tres niveles de expresión, lo que permitirá deducir asociaciones relevantes entre macromoléculas, identificar correlaciones funcionales con fenotipos y construir modelos que describan de forma cuantitativa la dinámica de un sistema biológico. Estos análisis fenotípicos a gran escala permitirán en un futuro predecir como será el

comportamiento de una planta dada en un determinado contexto medioambiental (<http://www.encuentros.uma.es/encuentros100/omicas.htm>).

## 2.1. Biología molecular

La biología molecular es una disciplina de la bioquímica que estudia, entre otras, las moléculas de ácidos nucleicos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). El origen de la biología molecular se puede rastrear hasta fines del siglo XIX; sin embargo, el descubrimiento de la estructura del ADN se considera como el inicio de esta disciplina (Watson & Crick, 1953). Los avances producidos por la biología molecular en la década del '60 nos permiten contar hoy con herramientas para el estudio de microorganismos a nivel molecular. En particular, el aislamiento de la ADN polimerasa y las propiedades de hibridación del ADN son algunos de los conocimientos que son aplicados hoy día en la reacción en cadena de la polimerasa, así como muchas otras reacciones que se han transformado en herramientas útiles para el estudio de material biológico a nivel molecular.

### 2.1.1. Hitos en el desarrollo de la biología molecular

El aislamiento de la molécula de ADN se realizó por primera vez en 1869, a partir de núcleos aislados de linfocitos humanos y se denominó "nucleína". Posteriormente se demostró que la nucleína estaba compuesta por 4 bases orgánicas, adenina, guanina, timina y citosina. El desarrollo de un marcador químico a principios del siglo XX demostró por microscopía óptica que el ADN se encuentra en el núcleo de todas las células de distintas especies. En 1944 Avery *et al.* demostraron que en el ADN estaba la información responsable de la herencia. Sin embargo, este descubrimiento no tuvo mayor impacto en su época ya que en ese momento se creía que el contenido de las cuatro bases era similar en todas las moléculas de ADN y por lo tanto no explicaba la diversidad genética (Freifelder, 1978). En 1950 Chargaff demostró que la composición química del ADN variaba enormemente entre un organismo y otro, y que a pesar de ello, siempre existía una concentración molar equivalente entre

adenina-timina y citosina-guanina.

En 1953, basándose en este descubrimiento y utilizando datos de difracción de rayos X, Watson y Crick propusieron el modelo de doble hebra para la estructura del ADN (Watson & Crick, 1953; Fierro, 2001).

En este modelo las bases nitrogenadas de cada hebra forman una cadena unida por grupos fosfatos externos e internamente las bases interactúan con las respectivas bases complementarias (adenina-timina y citosina-guanina) de la otra hebra a través de enlaces de hidrógeno. El descubrimiento de Watson y Crick permitió conocer la estructura del ADN y comprender el mecanismo de la herencia, en el que cada hebra sirve de molde para su propia replicación (replicación semiconservativa) y es considerado como el inicio de la biología molecular (Fierro, 2001).

En 1960, Kronberg aisló y purificó la enzima responsable de la replicación del ADN, la ADN polimerasa (Alberts *et al.*, 1994). El descubrimiento de esta enzima permitió definir elementos críticos para la síntesis de la molécula de ADN, en particular el sitio de inicio de la síntesis formado por ADN de doble hebra. Este descubrimiento es la base para todos los métodos de síntesis de ADN *in vitro* como la reacción en cadena de la polimerasa .

Ese mismo año, Doty *et al.* descubrieron las propiedades de hibridación del ADN. Contrariamente a lo pensado en esa época, que la separación por calor del ADN doble hebra (denaturación) era un fenómeno irreversible, estos investigadores observaron que si el ADN desnaturalizado era llevado a 65 °C, se volvía a formar ADN doble hebra. Estos autores denominaron a este fenómeno "renaturación" o "hibridación" del ADN (Doty *et al.*, 1960) e incluso demostraron que podía ocurrir entre moléculas de ADN y ARN con una sensibilidad de 1:100.000. El descubrimiento de Doty *et al.* sentó las bases para todos los métodos de hibridación utilizados actualmente con la única diferencia de que en los métodos actuales se introduce un fragmento de hebra simple, denominado "sonda", el que al estar en una concentración mayor al ADN doble hebra y producirse la renaturalización, forma un híbrido "sonda: ADN" (Alberts *et al.*, 1994).

En 1962, Arber aisló y purificó enzimas que cortaban el ADN en secuencias específicas (Watson & Tooze, 1981). Estas enzimas tenían la particularidad de reconocer secuencias palindrómicas en el genoma y cortar ambas hebras. La función de estas enzimas es proteger a las bacterias de infecciones virales degradando el ADN viral (Nathans & Smith, 1975).

La utilización de estas enzimas en el análisis de ADN permitió cortar esta gran molécula en fragmentos más pequeños y específicos y así estudiarla en regiones discretas. Posteriormente, el descubrimiento de enzimas con capacidad de unir fragmentos de ADN (ADN ligasa) dio origen a moléculas de ADN recombinante. Al combinar el corte con enzimas de restricción en dos moléculas diferentes y reunir los fragmentos generados utilizando la ADN ligasa, se crearon las primeras moléculas de ADN recombinante, dando origen a la ingeniería genética (Gilbert & Villa-Komaroff, 1980).

En 1975, Southern desarrolló un método para fijar ADN digerido por enzimas de restricción a un soporte sólido y realizar en él la hibridación con sondas específicas. Esta técnica se basa en la separación del ADN por migración electroforética a través de un polímero, usualmente agarosa, y posteriormente transferirlo y fijarlo a una membrana de nitrocelulosa. La técnica desarrollada se llamó Southern-blot y la extensión de esta metodología a ARN se denominó Northern-blot y a proteínas, Western-blot (Alberts *et al.*, 1994).

Otras variaciones de este método, que no utilizan la separación electroforética, se denominan dot-blot o slot-blot (Alberts *et al.*, 1994).

Entre 1975 y 1977 dos grupos, Sanger *et al.* y Maxam y Gilbert (Alberts *et al.*, 1994) desarrollaron métodos de secuenciación del ADN. Ambos métodos difieren en que uno permite leer el código genético rompiendo la molécula de ADN en nucleótidos específicos y el otro incorporando nucleótidos que bloquean la extensión de la síntesis de ADN. Este último método es el más utilizado actualmente, en particular, en los métodos de secuenciación automática.

En 1985, Mullis reunió algunas de las metodologías mencionadas para realizar síntesis de ADN *in vitro* en forma exponencial, denominando este

método reacción en cadena de la polimerasa, más comúnmente conocida por sus siglas en inglés: "PCR, Polymerase Chain Reaction" (Mullis, 1990). Esta metodología es considerada como una revolución dentro la biología molecular, ya que con la amplificación exponencial es posible el análisis de moléculas de ADN o ARN partiendo de mínimas cantidades de muestras.

A partir de esta metodología, se han desarrollado las técnicas mas modernas utilizadas hoy en día en el campo de la genómica y genómica funcional.

### 2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa

El método de PCR se basa en ciclos de amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN. Este fragmento está determinado por secuencias introducidas en la reacción, denominadas cebadores ("primers"), a partir de los cuales la enzima ADN polimerasa realiza la síntesis exponencial.

Cada ciclo de amplificación consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. La desnaturalización se realiza a 95 °C y la separación conseguida permite que cada hebra sirva como molde o templado para la síntesis de una nueva molécula de ADN. El tiempo de desnaturalización depende del largo del templado, y generalmente dura entre 30 segundos y 1 minuto. Debido a que al comienzo de la amplificación es necesario separar todo el ADN de la muestra analizada, inicialmente se realiza una incubación de 5 minutos a 95 °C por única vez.

Después de la desnaturalización sigue la etapa de alineamiento entre el ADN templado y los cebadores; esta etapa se basa en el principio de la renaturalización de Doty *et al.* y ocurre al llevar la reacción a 45 °C - 60 °C.

Sin embargo, dado que los cebadores están en mayor concentración que el templado, se favorecerá el alineamiento entre templado-cebador por sobre templado-templado. El ADN doble hebra formado (templado-cebador) definirá el sitio de acción de la ADN polimerasa o extensión, etapa en la cual esta enzima unirá nucleótidos libres en forma complementaria a la secuencia del templado. La extensión ocurre a 72 °C, que es la temperatura de máxima eficiencia de la enzima y el tiempo de la extensión dependerá de la distancia de

los cebadores entre sí.

En general se ha calculado que la ADN polimerasa es capaz de incorporar 60 nucleótidos por segundo a 70 °C (Innis *et al.*, 1988), por lo que un minuto es tiempo suficiente para incorporar alrededor de 1.000 pares de bases. Dado que se utilizan dos cebadores en la reacción, uno para cada hebra, y que éstos quedan a una distancia de entrecruzamiento durante la síntesis de ADN, el segmento definido será amplificado en forma exponencial. Así por ejemplo, si al momento de iniciarse la amplificación sólo hay una molécula de ADN doble hebra (2 templados), después de 30 ciclos de amplificación se habrán generado 1.097.736.000 copias del segmento flanqueado por los cebadores.

El elemento más crítico de la amplificación por PCR es el alineamiento. Dado que este fenómeno se basa en la complementariedad entre las bases nitrogenadas del templado y del cebador, ésta es una unión alterada por varios factores, entre otros la temperatura.

La importancia de la amplificación por PCR se basa en que con esta magnitud de amplificación es posible el análisis de moléculas de ADN o ARN a partir de mínimas cantidades de muestra. Así por ejemplo, si consideramos 1 fg ( $10^{-9}$  g) de ADN, la amplificación por PCR permitirá generar alrededor de 0,1 µg ( $10^{-6}$  g) de una región específica de ADN. En la práctica, este método permite identificar secuencias presentes entre 10 y 50 copias en una muestra.

La visualización del producto amplificado requiere de otras metodologías posteriores a la amplificación. El método más utilizado es la electroforesis de agarosa; sin embargo, este es un método indirecto, porque sólo indica el tamaño del amplificado. La visualización directa requiere de métodos que "lean" la secuencia del amplificado. Entre estos métodos figuran cortes con enzimas de restricción, hibridación con sondas específicas (Southern-blot) o secuenciación del producto de PCR.

### **2.1.3. Clonación de proteasas cisteínicas vegetales**

A la fecha son varias las proteasas cisteínicas de origen vegetal que han sido clonadas. Los últimos trabajos reportados dan cuenta de: una proteasa clonada



y expresada de *Oriza sativa* en *E. coli* (Su *et al.*, 2006), de la clonación del cDNA de una proteasa cisteínica termoestable de *Ervatamia* (Ghosh *et al.*, 2007), de una proteasa presente en hojas senescentes de *Ipomoea batatas* (Chen *et al.* 2002, 2006), de proteasas de *Trifolium repens* (Asp *et al.* 2004) y de *Zea mays* L. (Pechan *et al.* 2004). También se clonaron 2 proteasas de porotos de soja (Ling 2003) y otra de *Hordeum vulgare*, tipo catepsina B, (Martínez *et al.* 2003). A partir de frutos de *Bromelia fastuosa* se logró clonar fastuosaina (Cabral *et al.*, 2006) y en alfalfa se aisló y caracterizó el cDNA que codifica una proteasa cisteínica del tipo de la papaína (Yan *et al.*, 2007). En tanto que la única proteasa cisteínica de látex clonada, expresada y caracterizada es Asclepaina f, aislada en nuestro laboratorio a partir de *Asclepias fruticosa* (Trejo 2005).

## 2.2. Proteómica

El anuncio de la finalización de la secuenciación del genoma humano ha sido un hecho histórico que ha trascendido las fronteras del entorno científico. Se ha abierto una etapa que, aunque bautizada como “era postgenómica”, debe considerarse más como una continuación que como el final de la revolución genómica.

Gracias a la información aportada por los proyectos de secuenciación es hoy posible abordar de forma efectiva el estudio de la funcionalidad del genoma, y en especial el análisis de los productos codificados por los genes: las proteínas. La proteómica, ciencia que estudia las proteínas y sus interacciones en los distintos modelos vivos, es un área de investigación y desarrollo que ha evolucionado vertiginosamente en los últimos años. El interés suscitado por estos nuevos conocimientos reside en el potencial de la proteómica como generadora de una nueva revolución biotecnológica en sectores como el desarrollo de fármacos, o en la caracterización de marcadores de enfermedades, de uso en el diagnóstico médico. Además de estas importantes aplicaciones existen otras que quizás son menos conocidas, pero que tiene más impacto directo en nuestra vida cotidiana: en agricultura y control de alimentos, en

clasificación de pescados para el consumo o en el diagnóstico de las enfermedades reumáticas ([www.proteored.org](http://www.proteored.org)).

El término “proteoma” fue usado por vez primera en 1995 para describir el conjunto de PROTEÍNAS de un genOMA, una célula o un tejido. De forma imperceptible, la palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina, la “proteómica”.

Esencialmente la proteómica es el estudio a gran escala de los productos génicos de un genoma mediante métodos bioquímicos, con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares. El término proteómica se ha asociado tradicionalmente con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante 2D-PAGE. Según esto, la proteómica comenzó en los años setenta cuando se empezaron a construir bases de datos de proteínas utilizando la electroforesis bidimensional. Sin embargo, la identificación de las proteínas era difícil debido a la falta de métodos analíticos rápidos y sensibles para la caracterización de las mismas. En los años noventa, la espectrometría de masas surge como un método analítico muy poderoso, ya que elimina la mayoría de las limitaciones del análisis de proteínas. Este desarrollo, junto con la disponibilidad de los genomas secuenciados marca el comienzo de una nueva era. Actualmente muchas áreas de estudio han sido agrupadas dentro de la proteómica. Se pueden incluir, entre otros, los estudios de interacciones de proteínas, de modificaciones pos-traduccionales, el análisis funcional de proteínas y estudios de localización. Se puede hablar de dos tipos de proteómica: proteómica de expresión y proteómica del mapa celular.

### **2.2.1. Metodología proteómica**

La proteómica es, junto a la genómica, una de las nuevas tecnologías que más interés están despertando últimamente. Básicamente la proteómica utiliza estrategias para identificar proteínas basadas en la digestión enzimática o química de las proteínas y en el análisis de los péptidos mediante espectrometría de masas.

El auge actual de la proteómica se debe a dos razones fundamentales: por

un lado, a los grandes proyectos de secuenciación de genomas que han generado una enorme cantidad de información y por otra parte, el avance en las técnicas de análisis químico de proteínas ocurridas en los últimos años.

El reciente desarrollo de las denominadas técnicas de "ionización suave" (MALDI y electrospray) abrió el camino al estudio de macromoléculas mediante espectrometría de masas. Estos métodos de ionización, en combinación con diversas técnicas de análisis, permiten hoy en día la identificación y secuenciación de proteínas con unos niveles de rapidez, sensibilidad y versatilidad sin precedentes. La aparición de herramientas que por primera vez en la historia de las biociencias permiten el análisis sistemático de los agentes fundamentales de la vida, las proteínas, hecho que ha dado lugar al desarrollo de la moderna proteómica.

La espectrometría de masas esencialmente es una alternativa muy importante de la técnica clásica de secuenciación de la porción N-terminal de la proteína, por medio del método de la degradación de Edman, sustituyéndola incluso en la química tradicional de proteínas, ya que es mucho más sensible, puede ocuparse de mezclas de proteínas y tiene un rendimiento de procesamiento muy alto.

El método de análisis de péptidos conocido como "mapeo de la masa del péptido" ("huella peptídica") fue desarrollado inicialmente por Henzel y sus colaboradores en 1993 (Perkins *et al.*, 1999). Dicho método permite obtener el espectro total de la mezcla de péptidos provenientes de la digestión específica de la secuencia de la proteína; lo que da lugar a una huella digital de las masas de los péptidos de la proteína que está siendo estudiada. Este espectro total es obtenido por un método de espectrometría de masas relativamente simple, utilizando una fuente de ionización y la desorción de muestras asistida por un láser (MALDI-TOF), lo que resulta en una medición del "tiempo de vuelo" de los péptidos que constituyen la mezcla.

Recientes avances en la automatización del procedimiento de identificación de proteínas mediante MALDI han permitido que cientos de proteínas puedan ser obtenidas desde los geles de electroforesis, digeridas enzimáticamente y su

espectro de masas analizado automáticamente e identificado en las bases de datos de proteínas (Jensen *et al.*, 1997; Berndt *et al.* 1999). En un procedimiento de dos etapas para la identificación rápida e inequívoca de una proteína, la huella digital de la proteína obtenida mediante MALDI sería un primer paso (Shevchenko *et al.*, 1996; Shevchenko *et al.*, 2000). El segundo paso será la secuencia de péptidos individuales. En este método, los péptidos son ionizados directamente por ionización en electroaspersión a partir de la fase líquida. Los iones de los péptidos ingresan con un rocío en un espectrómetro de masas en serie que tenga la capacidad de separar los péptidos de una mezcla, además de aislar una especie al mismo tiempo y de dissociarla en los fragmentos amino o carboxilo-terminal. Los datos de la secuencia no sólo se pueden utilizar para identificar proteínas en bases de datos de secuencias de aminoácidos sino también en bases de datos de secuencias de nucleótidos y bases de datos de genomas.

En definitiva, la proteómica proporciona un conjunto de herramientas muy poderosas para el estudio a gran escala de la función de los genes a nivel de proteína. Los estudios mediante espectrometría de masas de las proteínas separadas en geles está conduciendo al renacimiento de las aproximaciones bioquímicas para el estudio de la función de las proteínas. Actualmente existen dos estrategias bien definidas para el estudio del proteoma: una de ellas se basa en la utilización de la electroforesis bidimensional y la otra utiliza otros métodos de separación de proteínas, principalmente métodos cromatográficos. En ambos casos la identificación y caracterización de proteínas se realiza mediante espectrometría de masas.

### **3. INTRODUCCIÓN A LA BIOCATÁLISIS EN MEDIOS NO CONVENCIONALES**

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances, que fueron rápidamente transmitidos a aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, esencialmente en las industrias alimentaria y

farmacéutica.

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos:

- a) poseen una gran actividad catalítica
- b) muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad)
- c) son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

En general, la mayoría de los procesos de catálisis enzimática son llevados a cabo en soluciones acuosas. No obstante, muchos de los productos de reacción no pueden obtenerse en medio acuoso por razones tales como:

- a) insolubilidad de sustratos
- b) equilibrio termodinámico desfavorable
- c) inhibición de la actividad enzimática debida a reactivos y/o productos
- d) dificultad para obtener los productos.

La biocatálisis en fase orgánica no sólo permite la expresión de la funcionalidad de las enzimas, sino que exhibe ventajas relevantes respecto de la biocatálisis en fase acuosa (Cesti, *et al.*, 1986), tales como:

- a) cambios en el equilibrio de la reacción, como consecuencia de la alteración del coeficiente de partición de sustratos y productos entre las fases de interés, pudiendo favorecer la reacción de síntesis y evitar la hidrólisis de péptidos, ésteres, amidas, etc.
- b) facilidad de recuperación de los productos y del biocatalizador

- c) aumento de la termoestabilidad del biocatalizador
- d) aumento de la estereoespecificidad en la resolución de mezclas racémicas

El interés por desarrollar procesos enzimáticos en fase orgánica ha crecido notablemente en las últimas décadas por cuanto representan una interesante alternativa a procesos de síntesis química convencionales (Klibanov, 1986). Además existe la posibilidad de influenciar las propiedades enzimáticas por medio de la naturaleza del solvente usado en la mezcla de reacción (Wescott & Klibanov 1994).

Básicamente existen dos tipos de sistemas de biocatálisis en solventes orgánicos: homogéneos y heterogéneos. Los sistemas homogéneos son mezclas de agua con solventes orgánicos miscibles. Los sistemas heterogéneos pueden dividirse en sistemas macroheterogéneos, entre los que se pueden distinguir sistemas de dos líquidos inmiscibles, y sistemas sólido-líquido, en donde la enzima está inmovilizada en una matriz sólida o bien en forma de proteína insoluble suspendida en el solvente orgánico, y sistemas microheterogéneos representados por micelas reversas. Estos sistemas difieren drásticamente de aquellos que han sido usados tradicionalmente, y también son diferentes entre sí (Illanes & Barberis, 1994).

Una de las estrategias para evaluar y seleccionar el sistema de reacción contempla la posibilidad de utilizar al catalizador en fase sólida, lo que permitiría mayor estabilidad del mismo en los distintos medios a ensayar (acuosos y no acuosos) y su posible reutilización, siendo esta última una de las aplicaciones más interesantes y prometedoras.

### **3.1. Inmovilización enzimática en distintos soportes.**

La catálisis enzimática en fase heterogénea (enzimas inmovilizadas) permite un uso más eficaz del catalizador al estabilizar la estructura proteica de la enzima y asimismo permite el desarrollo de procesos continuos con todas las ventajas operacionales asociadas (Travascio *et al.*, 2002).

La inmovilización es el proceso de capturar la enzima en un espacio determinado en contacto con la solución que contiene sustratos y productos. La

inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte (Gerhartz 1990).

La inmovilización de la enzima permite utilizarla en reiteradas ocasiones, disminuyendo así el costo de operación y evitando una etapa de separación del producto de la enzima, lo que encarece el proceso. En la Tabla 2 se presentan las principales ventajas y desventajas del empleo de enzimas inmovilizadas y además se compara con las ventajas y desventajas del uso de enzimas libres. (Giorno & Drioli, 2000; Ferreira *et al.*, 2002)

**Tabla 2.- Ventajas y desventajas de la Inmovilización.**

Enzima Soluble		Enzima Inmovilizada	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor costo</li> <li>• Utilizable en caso de sustrato con alto peso molecular</li> <li>• No existen pérdidas de actividad (mayor actividad específica)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gran cantidad de enzima remanente en producto luego de participar en la reacción</li> <li>• No es posible el rehuso de la enzima</li> <li>• La reacción esta limitada por Inhibición por producto</li> <li>• Dificultad de un preciso control</li> <li>• Si es necesario, detener la reacción con calor, lo que puede afectar el alimento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La enzima es reutilizable</li> <li>• La reacción puede terminarse por la separación del sustrato de la enzima</li> <li>• El control es más preciso</li> <li>• Hay una menor inhibición por producto</li> <li>• Mayor estabilidad a condiciones de T° y pH</li> <li>• Puede usarse en forma batch o continua</li> <li>• Existe una gran flexibilidad en el diseño de reactores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja actividad específica (Pérdida de actividad en inmovilización)</li> <li>• Restricciones difusionales o estéricas</li> <li>• Inactivación con una operación continua</li> <li>• Mayor costo, debido al soporte y el proceso de inmovilización</li> <li>• Necesita sanitización o regeneración del reactor.</li> </ul>

Los ensayos de biocatálisis en medio orgánico requieren de enzimas que deben encontrarse ya sea en estado sólido (liofilizadas o bien como polvos o precipitados acetónicos) o en forma inmovilizada. Los métodos que pueden ser empleados son el entrampamiento en geles de poliacrilamida, la inmovilización por adsorción de proteasas sobre soportes sólidos (poliamida, celite) y la inmovilización por unión covalente sobre agarosa activada, entre otros.

La inmovilización por adsorción de proteasas sobre soportes sólidos (poliamida, celite) es un método sencillo y económico y se ha aplicado para la síntesis enzimática de péptidos saborizantes (Morcelle *et al.*, 2006) y tensioactivos con propiedades antimicrobianas (Clapés & Infante, 2002).

La inmovilización de enzimas a soportes que contienen grupos aldehídos alifáticos, como por ejemplo glioxil-agarosa, presenta una serie de interesantes características desde el punto de vista práctico. Se puede aumentar la rigidez de la molécula enzimática y por lo tanto hacerlas más resistentes a cambios conformacionales inducidos por calor, solventes orgánicos y otros, comparada a las moléculas solubles. Además, el grueso de la estructura proteica no se verá afectada aún cuando se hayan establecido un gran número de enlaces (Guisán, 2006). La agarosa corresponde a un tipo de soporte utilizado para inmovilizar enzimas debido a sus buenas propiedades físico-químicas: a mayor grado de entrecruzamiento, se tiene mayor superficie, dado que las fibras que componen la agarosa son más gruesas y el tamaño del poro se hace más pequeño, por lo tanto se puede cargar este soporte con más grupos reactivos. Este tipo de soporte, debido a sus características físico-químicas, ha sido utilizado para inmovilizar mediante la técnica de unión multipuntual covalente algunas enzimas como penicilina G acilasa de *Escherichia coli* (Guisán *et al.* 1990), tripsina (Guisán *et al.* 1997) y  $\alpha$ -quimotripsina de páncreas de bovino (Guisán *et al.* 1991). El método de inmovilización multipuntual covalente, es aquel en el que los residuos aminoacídicos de la molécula enzimática reaccionan con los residuos de un soporte activado, quedando ubicada la enzima en su superficie mediante el establecimiento de varios puntos de unión.



El entrapamiento consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El entrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El entrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el entrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (Arroyo, 1998; Guisán, 2006).

### **3.2. Aplicación de proteasas a la biosíntesis en medios no convencionales.**

La catálisis enzimática en fase orgánica es una alternativa interesante para llevar a cabo procesos biocatalíticos que no puedan realizarse o lo hagan con dificultad en agua (Morcelle *et al.*, 2006; Quiroga *et al.*, 2006, Quiroga *et al.* 2007, Guzmán *et al.*, 2007). Dichos métodos enzimáticos presentan ventajas tales como condiciones suaves de reacción, proceder sin racemización y con elevada estereoespecificidad (Björup *et al.* 1998), lo cual hace que dichos biocatalizadores sean especialmente atractivos para el área farmacéutica y de la agroquímica. Además, se ha demostrado que las enzimas pueden ser más estables, aunque menos activas, en solventes orgánicos, en donde es más favorable la formación de los enlaces peptídicos que la hidrólisis de péptidos (Liu *et al.* 2002).

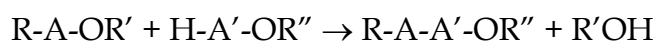
Desde un punto de vista industrial las proteasas son enzimas con características muy importantes utilizadas en la industria del cuero, de los detergentes, en la producción de hidrolizados proteicos y en la industria de los alimentos (Ghorbel *et al.* 2003). Actualmente, la aplicación de proteasas en la producción de pequeños oligopéptidos ha recibido mucha atención ya que constituye una alternativa viable a la síntesis química (Fan *et al.* 2001). La síntesis de dipéptidos y tripéptidos es importante para la industria farmacéutica y de los alimentos (Clapés *et al.* 1995; Calvet *et al.* 1996; Björup *et al.* 1999; Trusek-Holownia 2003).

En la bibliografía se ha informado el uso de fitoproteasas cisteínicas tales como papaína (Mitin *et al.* 1984), ficina (Monter *et al.* 1991) y, más recientemente, *Morrenia brachystephana* (Barberis *et al.* 2002), *Funastrum clausum* (Morcelle *et al.*, 2006) y *Araujia hortorum* (Quiroga *et al.* 2007) para la síntesis de péptidos en medios no convencionales.

La síntesis de péptidos mediante endopeptidasas es una de las aplicaciones de mayor potencial de la catálisis enzimática en fase orgánica, lográndose desplazar el equilibrio de la reacción desde la hidrólisis hacia la síntesis.

Uno de los ejemplos más conocidos de la síntesis enzimática de péptidos es la síntesis del dipéptido aspartamo catalizada por termolisina inmovilizada, que en la actualidad se transformó en el líder de los edulcorantes no calóricos a nivel mundial (Oyama, 1987)

La formación de uniones peptídicas obedece a la siguiente reacción:



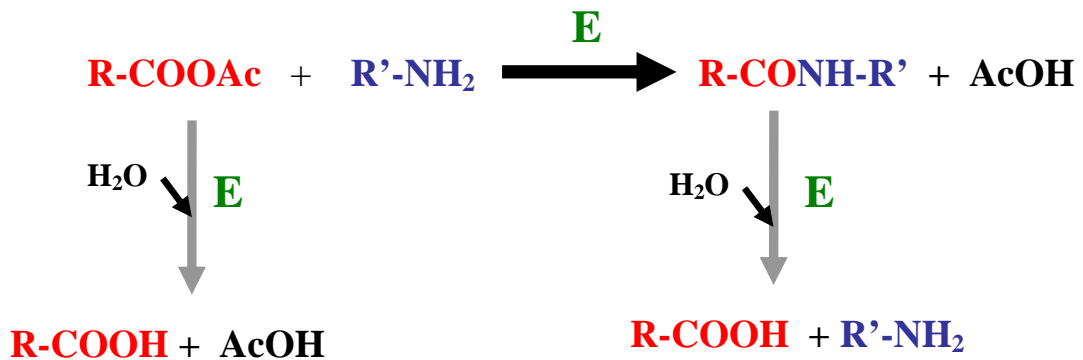
donde R, R' y R'' son los grupos protectores N-terminal y C-terminal de los sustratos, en tanto que A y A' son residuos de aminoácidos.

Los métodos de formación de uniones peptídicas catalizadas por proteasas pueden ser clasificados dentro de dos estrategias básicas, en función del tipo de componente carboxílico (donante de acilo) utilizado. Una es la inversa de la hidrólisis de péptidos (aproximación termodinámica o síntesis controlada en el equilibrio) en donde el grupo R' es un H, es decir, el componente carboxílico es un grupo carboxilo terminal libre. La otra, corresponde a la aminólisis de

aminoácidos N-protectados o derivados peptídicos (aproximación cinética o síntesis bajo control cinético) en donde el grupo R' es un éster o una amida, es decir un donante de acilo activado (Jakubke *et al.* 1985; Murakami *et al.* 2000).

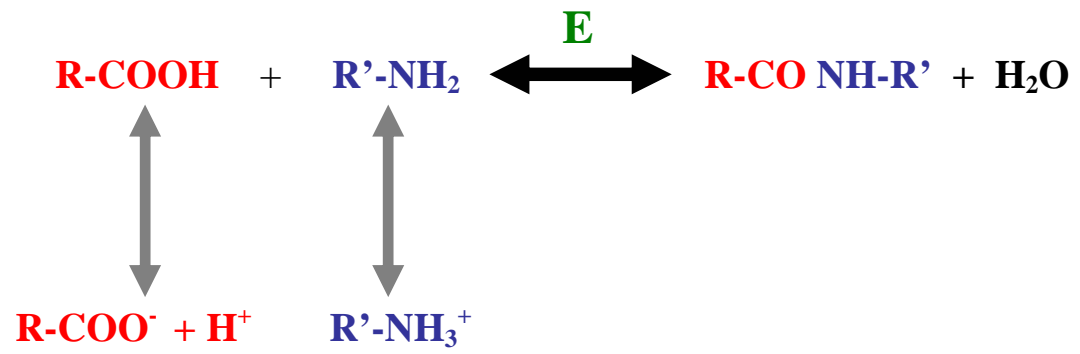
En la síntesis bajo control cinético, el intermediario acil-enzima se forma rápidamente y particiona competitivamente al reaccionar con el componente nucleofílico (aminólisis) por un lado, y el agua (hidrólisis) por otro. Sólo la aminólisis rinde el péptido deseado, mientras que la hidrólisis da origen al donante de acilo con el grupo carboxilo libre. Debido a que las proteasas no son aciltransferasas perfectas, pueden ocurrir reacciones laterales no deseadas tales como la hidrólisis del intermediario acil-enzima o la hidrólisis secundaria del dipéptido formado. Estos inconvenientes pueden ser superados por medio de ingeniería de medios (medios orgánicos) o de enzimas (Jakubke, 1987).

## Control Cinético



Por su parte, en una reacción de síntesis bajo control termodinámico el equilibrio químico puede ser desplazado hacia la formación de uniones peptídicas por la adición de un medio orgánico, por extracción continua del producto de síntesis o por la formación de productos insolubles (Murakami *et al.* 2000, Bordusa, 2002).

## Control Termodinámico



## REFERENCIAS

- Abraham, K.I. & P.N. Joshi (1979a) Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. I. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate, *Biochim. Biophys. Acta*, **568**: 111-9.
- Abreu Payrol, J., W.D. Obregón, C.L. Natalucci & N.O. Caffini (2005) "Reinvestigation of the proteolytically active components of Bromelia pinguin fruit ". *Fitoterapia*, **76**: 540-548.
- Abreu Payrol, J., W.D. Obregón, S.A. Trejo & N.O. Caffini. (2007) "Purification and Characterization of Four New Cysteine Endopeptidases from fruits of Bromelia pinguin L. grown in Cuba". *The Protein Journal*, PMID: 17932734 .En prensa.
- Abraham, K.I. & P.N. Joshi (1979b) Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. II. Physico-chemical properties of calotropain-FI and F-II, *Biochim. Biophys. Acta*, **568**: 120-6.
- Agusti, C., K. Takeyama, L.O. Cardel, I. Ueki, J. Lausier, Y.P. Lou & J.A. Nadel (1998) Goblet cell degranulation after antigen challenge in sensitized guinea pigs. Role of Neutrophils, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **15**:1253-8.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J.D. Watson (1994) "Recombinant DNA technology" en: *Molecular Biology of the Cell* 3th Edition Garland pp: 291-334.
- Arima, K., Uchikoba, H., Yonezawa, H., M. Shimada, & M. Kaneda (2000). "Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*". *Phytochemistry*, **53**: 639-644.
- Arroyo, M. (1998) "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones" *Ars Pharmaceutica*, **39**: 23-39.
- Asif-Ullah M., Kim K.S. & Y.G.Yu (2006) "Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi". *Phytochemistry*, **67**: 870-5.
- Asp, T., S. Bowra, Borg & P.B. Holm (2004) "Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli* and enzymatic characterisation of a cysteine protease from white clover (*Trifolium repens*)". *Biochim. Biophys. Acta*, **1699** (1-2):111-22.
- Azarkan, M., A. El Moussaoui, D. van Wuytswinkel, G. Dehon & Y. Looze (2003) "Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*". *Journal of Chromatography B*, **790**: 229-238.
- Azarkan, M., R. Dibiani, C. Baulard & D. Baeyens-Volant (2006) "Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity" *International Journal of Biological Macromolecule*, **38**: 216-224.
- Avery O., C. MacLeod & M. McCarty "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types". (1944). *J Exp Med.*, **79**: 137-57.
- Baltimore, D. y C. Heilman (1998) HIV vaccines: prospects and challenges, *Sci. Am.*, **279**: 78-83

- Barberis, S.E. & A. Illanes (1994) *Enzyme Biotechnology*, 1st ed., 35 th Monograph, Biology Series, The Secretariat of the Organization of American States, Washington, D.C., USA. Annex p.p. 250-253.
- Barberis, S.E., E. Quiroga, M.C. Arribére, & N. Priolo (2002) "Peptide synthesis in aqueous-organic biphasic systems catalyzed by a protease isolated from *Morrenia brachystephana* (Asclepiadaceae)". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **17**(1):39-47.
- Barragán, B.E., M.T. Cruz, L.M. del Castillo & M. Castañeda-Agulló (1985). "Proteinases of mexican plants. XI. Asclepain g from the látex of *Asclepias glaucescens*". *Rev. Latinoameri. Quím.*, **16**:117-119.
- Barrett, A.J., N.D. Rawlings & J.F. Woessner. (1998) "Handbook of Proteolytic Enzymes". Academic Press, London.
- Barrett, A., N. Rawlings & J. Woessner (2004) Introduction. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.). London: Academic Press.
- Bartlett, J.G. & R.D. Moore (1998) Improving HIV therapy, *Sci. Am.*, **279**: 64-73.
- Belozersky, A., Y.E Dunaevsky & N. Voskoboynikova (1990). "Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat *Fagopyrum esculentum* seeds". *Biochem. J.*, **272**:677-682.
- Berndt, P., U. Hobohm & H. Langen (1999). "Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints" *Electrophoresis*, **20**: 3521-3526.
- Biswas, S., C. Chakrabarti, S. Kundu, M.V. Jagannadham & J.K. Dattagupta (2003) Proposed amino acid sequence and the 1.63 Å X-ray crystal structure of a plant cysteine protease, ervatamin B: some insights into the structural basis of its stability and substrate specificity, *Proteins*, **51**: 489-97.
- Bond, H.M. & D.J. Bowles (1983). "Characterization of soybean endopeptidase activity using exogenous and endogenous substrates". *Plant Physiol.*, **72**:345-370.
- Björup, P., E. Wehtje & P. Adlercreutz (1996) "Effects of acetonitrile-water mixtures on  $\alpha$ -chymotrypsin catalysed dipeptide synthesis". *Biocatalysis and Biotransformation*, **13** (3):189-200.
- Björup, P., P. Adlercreutz & P. Clapés (1999) "Useful methods in enzymatic synthesis of peptides: a comparative study focusing on kinetically controlled synthesis of Ac-Phe-Leu-NH<sub>2</sub> catalyzed by  $\alpha$ -chymotrypsin". *Biocatalysis and Biotransformation*, **17**(5): 319-345.
- Bordusa, F. (2002) "Proteases in organic synthesis". *Chemical Reviews*, December, **102** (12):4817-4868.
- Brockbank, W.J. & K.R. Lynn (1979) "Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed)". *Biochim. Biophys. Acta.*, **578**:113-122.
- Brogliè, K., I. Chet, M. Holliday, R. Cressman, P. Biddle, S. Knowlton, C. Mauvais & R. Brogliè (1991). "Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*". *Science*, **254**:1194-1197.
- Brömme, D. & J. Kaleta (2002) "Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design". *Curr. Pharm. Des.*, **8**: 1639-58

- Brown, R. (1811) "On the *Asclepiadeae*, a natural order of plants separated from the *Apocynae* of Jussieu. *Mem Wernerian Nat. Hist. Soc.* **1**: 12-78. Reproducido en 1876 en *Miscellaneous Bot. Works of R. Brown* **II**: 193-247, en *Darviniana* **23** (2-3): 368.
- Bruno, M.A., M.A. Pardo, N.O. Caffini & L.M.I. López. (2003). "Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (*Bromeliaceae*)". *Journal of Protein Chemistry*, **22**: 127-134.
- Bruno, M.A., S.A. Trejo, X.F. Avilés, N.O. Caffini & L.M.I. López (2006). "Isolation and characterization of Hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez. *The Protein Journal*, **25**: 224-231.
- Bruno, M. (2007) "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos *Bromelia hieronymi* Mez. (*Bromeliaceae*)" Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
- Cabral H., A.M., E.H. Tajara, L.J. Greene, V.M. Faça, R.P. Mateus, C.R. Ceron, A. de Souza Judice, L. Julianod, G.O. Bonilla-Rodriguez (2006). "Preliminary functional characterization, cloning and primary sequence of Fastuosain, a cysteine peptidase isolated from fruits of *Bromelia fastuosa*". *Protein Pept. Lett.*, **13**:83-9.
- Calvet, S., J.T. Torres & P. Clapés (1996) "Enzymatic peptide synthesis in organic media. Synthesis of CCK-8 dipeptide fragments" *Biocatal. Biotrans.*, **13**: 201-216.
- Camperi, S., R. Hours, R. Audaz, M. Miranda & O. Cascone "Jugos de fruta sin metanol" (1996) *Ciencia Hoy* vol. 6 N°33.
- Carpenter, D.C. & F.E. Lovelace (1943). "The isoelectric point of Asclepain". *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**:2364-2365.
- Cesti, P., F. Francalanci, & M. Foa (1986). *La Chimica e la industria.* **68**: 11-15
- Chabregas, S. (2003). "Caracterização da localização subcelular da proteína TH11 de *Arabidopsis thaliana*". Tesis doctoral. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Brasil.
- Chakrabatti, C., S. Biswas, S. Kundu, M. Sund, M.V. Jagannadham & J. K. Dattagupta (1999). "Crystallitation and preliminary X-Ray analysis of ervatamin B and C, two thiol proteases from *Ervatamia coronaria*". *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **55**:1074-1075.
- Chargaff E. (1950) "Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation". *Experientia*, **6**: 201-9.
- Chen, G.H., L.T. Huang, M.N. Yap, R.H. Lee, Y.J. Huang, M.C. Cheng & S.C. Chen (2002) "Molecular characterization of a senescence-associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato". *Plant Cell Physiol.*, **43**(9):984-91.
- Chen H.J., D.J. Huang, W.C. Hou, J.S. Liu & Y.H. Lin (2006) "Molecular cloning and characterization of a granulin-containing cysteine protease SPCP3 from sweet potato (*Ipomoea batatas*) senescent leaves". *J. Plant Physiol.*, **163**(8):863-76.

- Cimerman, N., P.M. Brguljan, M. Krasovec, S. Suskovic & J. Kos (2001) "Circadian and concentration profile of cathepsin S in sera from healthy subjects and asthmatic patients". *Pflugers Arch.*, **442**: 204-6.
- Clapés, P., J. L. Torres & P. Aldercreutz (1995) "Enzymatic Peptide Synthesis in Low Water Content Systems: preparative Enzymatic Synthesis of [Leu]- and [Met]- Enkephalin Derivatives", *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **3**:245-255.
- Clapés, P. & M.R. Infante (2002) "Amino acid-based surfactants: enzymatic synthesis, properties and potential applications". *Biocatal. Biotrans.*, **20**: 215-233.
- Cordeiro, M., P.E. Brodelius & S.M. Pais (1998). *Cyprosin. Handbook of Proteolytic Enzymes.* (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. eds.), Academic Press, London, pp.: 839-842.
- Coussens, L.M., B. Fingleton & L.M. Matrisian (2002) "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations". *Science*, **295**: 2387-92.
- Curotto, E., G. S. González, O. Reilly & G. Tapia (1989). "Isolation and partial characterization of a protease from *Cucurbita ficifolia*". *FEBS Lett.*, **243**:363-365.
- Dahlgren, A., I. Kvarnstrom, L. Vrang, E. Hamelink, A. Hallberg, A. Rosenquist & B. Samuelsson (2003) "New inhibitors of the malaria aspartyl proteases plasmeprin I and II". *Bioorg. Med. Chem.*, **11**: 3423-37.
- Dalkin, K., S. Marcus & D.J. Bowles (1983). "Endopeptidase activity in jackbeans and its effect on concanavalin A". *Planta*, **157**:531-535.
- Doty P., J. Marmur, J. Eigner & C. Schildkraut (1960). "Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies". *Proc Natl Acad Sci USA.*, **46**: 461-76.
- Dalling, M.J. (1986) *Plant proteolytic enzymes, Vol I.* CRC Press, Inc., Florida.
- Drenth, J., J.N. Jansonius, R. Koekoek, H.M. Swen & B.G Wolthers (1968). "Structure of papain". *Nature*, **218**:929-932.
- Endress, M. E. & P. Bruyns (2000) "A revised classification of Apocynaceae s1". *Bot. Rev.*, **66**: 1-56.
- Fan, K., P. Ouyang, X., Wu & Z. Lu (2001) "A model of interfacial inactivation for papain in aqueous organic biphasic systems". *Enzyme Microb. Tech.*, **28**: 3-7.
- Ferreira, L., M.A. Ramos, M.H. Gil & J.S. Dordick (2002). "Exquisite regioselectivity and increased transesterification activity of an immobilized *Bacillus subtilis* protease" *Biotechnol. Prog.*, **18**: 986-993.
- Fierro A. (2001). "Breve historia del descubrimiento de la estructura del ADN". *Rev Méd Clínica Las Condes.*, **20**: 71-75.
- Filippova I.Y., E.N. Lysogorskaya, E.S. Oksenoit, G.N. Rudenskaya & V.M. Stepanov (1984) "L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide - A chromogenic substrate for thiol proteinase assay". *Anal. Biochem.*, **143**: 293-297.
- Freifelder D M. "The DNA molecule Structure and Properties". (1978) WH Freeman, pp: 1-7.



- Freitas, C.D.T., J.S. Oliveira, M.R.A. Miranda, N.M.R. Macedo, M.P. Sales, L.A. Villas-Boas, & M.V. Ramos (2007) "Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*" *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 781-789.
- Fujinaga, M., M.M. Cherney, H. Oyama, K. Oda. & M.N. James (2004) "The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 3364-3369.
- Gerhartz, W. (1990) "Enzymes in industry. Production and applications" Ed. Síntesis, Madrid.
- Ghorbel, B., A. Sellami-Kamoun & M. Nasri (2003) "Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1". *Enzyme and Microbial Technology*, **32**(5): 513-518.
- Ghosh R, Dattagupta JK, & S.Biswas (2007) "A thermostable cysteine protease precursor from a tropical plant contains an unusual C-terminal propeptide: cDNA cloning, sequence comparison and molecular modeling studies". *Biochem Biophys Res Commun.*, **362**:965-970.
- Gilbert W. & L. Villa-Komaroff (1980). "Useful proteins from recombinant bacteria". *Sci Am.*, **242**: 74-94.
- Giorno, L. & E. Drioli, (2000). "Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives". *Trends Biotech.*, **18**: 339-349.
- Gowen, M., J.G. Mery & S. Kumar (2000) *Emerg Drugs*, **5**:1-43.
- Greenberg, D.M. & T. Winnick (1940). "Plant proteases II. pH-activity curves". *J. Biol. Chem.*, **135**:775-780.
- Grudkowska, M. & B. Zagdańska (2004). "Multifunctional role of plant cysteine proteinases". *Acta Bichimica Polonica*, **51** (3): 609-624.
- Guisán, J., A. Bastidas, C. Cuesta, R. Fernandez & M. Rosel (1990) "Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *E. coli*" *Appl. Biochem Biotechnol.*, **26**: 181-195.
- Guisán J., A. Bastidas, C. Cuesta, R. Fernández-Lafuente & C.M. Rosell, (1991) "Immobilization-stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels" *Biotechnol. & Bioeng.*, **38**:1144-1152.
- Guisán J., G. Penzol, P. Armasen, A. Bastidas, R. Blanco, Fernandez-Lafuente, & García-Junceda. (1997) "Immobilization of Enzymes on glyoxyl agarose Immobilization of Enzymes and Cells". Bickerstaff, G.F., ed., Humana Press Inc. Totowa, pp 277-287.
- Guisán, J.M. (2006) "Immobilization of enzymes and cells" Humana Press Inc. Totowa, pp 185-204.
- Guzmán F., S. Barberis & A. Illanes (2007) "Peptide synthesis: chemical or enzymatic" *Electronic Journal of Biotechnology*, **10**: 279-314.
- Hara, I. & H. Matsubara (1980). "Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin. V. Proteolytic activities involved in globulin degradation in ungerminated seeds". *Plant Cell Physiol.*, **21**:219-232.
- Hartley, B.S. (1960). "Proteolytic enzymes". *Ann. Rev. Biochem.*, **29**:45-72.
- Henzel, W. J., T. M., Billeci, J. T. Stultsand & S. C. Wong (1993). "Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases". *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**: 5011-5015.

- Hou, W.S., W. Li, G. Keyszer., E. Weber., R. Levy, M.J. Klein, E.M. Gravallesse, S.R. Goldring & D. Bromme (2002) "Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium". *Arthritis Rheum.*, **46**: 663-74.
- Illanes, A. & S. Barberis (1994) "Catálisis enzimática en fase orgánica" en *Biología de Enzimas .Monografía 35. Serie Biología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, DC,USA. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, p. 225-254.*
- Innis M.A, K.B Myambo, D.H. Gelfand & M.A. Brow. (1988) "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA". *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**: 9436-40.
- Jakubke, H. D., P. Kuhl, & A. Konnecke (1985). Basic principles of protease-catalyzed peptide bond formation. *Angewandte Chemie- International Edition in English*, **24**(2): 85-93.
- Jakubke, H.D. (1987) "Enzymatic Peptide Synthesis". In: UDENFRIEND, S. & MEIENHOFER, J. eds. *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Academic Press Inc., New York, , vol. 9, p. 103-165.*
- Jensen, O.N., P., Mortensen, O. Vorm & M. Mann (1997). "Automation of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using fuzzy logic feedback control". *Anal. Chem.*, **69**:1706-1714.
- Jussieu, A.L. (1789) *Gen. Plant.*: 143-151. En *Darwiniana* **23**: 368.
- Kaneda, M. & N. Tominaga (1975). "Isolation and characterization of a proteinase from sarcocarp of melon fruit", *J. Biochem. (Tokyo)* **78**: 1287-1296.
- Kaneda, M., H. Yonesawa & T. Uchikoba (1995). "Improved isolation, stability and substrate specificity of cucumisin, a plant serine endopeptidase". *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **22**: 215-222.
- Kaneda, M., A. Sobue, S. Eida & N. Tominaga (1986). "Isolation and characterization of proteinases from the sarcocarp of snake-gourd fruit". *J. Biochem.*, **99**:569-577.
- Kaneda, M. & N. Tominaga, (1977). "Isolation and characterization of a proteinase from white gourd". *Phytochemistry*, **16**:345-346.
- Kaneda, M., Uchikoba, T. (1994). "Protease from the sarcocarp of *Trichosantes bracteata*". *Phytochemistry*, **35**:583-586.
- Kashyap, D R, P.K. Vohra, S. Chopra & R. Tewari (2001) "Applications of pectinases in the commercial sector: a review" *Bioresour Technol.*, **77** (3): 215-27.
- Katz, B.A., J.M. Clark, J.S. Finer-Moore, T.E. Jenkins, C.R. Johnson, M.J. Ross, C. Luong, W.R. Moore & R.M. Stroud (1998) "Design of potent selective zinc-mediated serine protease inhibitors". *Nature*, **391**: 608-12.
- Kervinen, J. (1998). Aspartic Peptidases. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J. ed.), Academic Press, London. pp.: 836-839.
- Kindt, T., E.J.M. Van Damme, J. Van Beeumen & G. Gheysen (2007) "Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea spp.*" *The FEBS Journal*, **274**: 451-462.

- Klibanov, A.M. (1986) "Enzymes that work in organic solvents" *Chem. Tech.*, **6**: 354-359.
- Konno, K., C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori & K. Kdino (2004). "Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex." *The Plant Journal*, **37**: 370-378.
- Kulkarni, A. & M. Rao (2007) "Biochemical characterization of an aspartic protease from *Vigna radiata*: Kinetic interactions with the classical inhibitor pepstatin implicating a tight binding mechanism" *BBA - Proteins and Proteomics*, **4** (5): 619-27.
- Kumar Dubey, V. & M.V. Jagannadham (2003) "Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*". *Phytochemistry*, **62**: 1057-71.
- Kundu, S., M. Sund & M.V. Jagannadham (2000). "Purification y Characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*". *J. Agric. Food Chem.*, **48**:171-179.
- Kundu, S., M. Sund & M.V. Jagannadham (2002) "Alcohol and temperature induced conformational transitions in ervatamin B: sequential unfolding of domains". *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**: 155-64.
- Lecaille, F., J. Kaleta, & D. Brömme (2002) "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design". *Chem. Rev.*, **102**: 4459-88.
- Levicar, N., T. Strojnik, J. Kos, R.A. Dewey, G.J. Pilkington & T.T. Lah (2002) "Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion". *J. Neurooncol.*, **58**: 21-32.
- Liggieri, C, M.C. Arribére, S.A.; Trejo, F. Canals, F. Avilés & N. Priolo (2004). "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex *Asclepias curassavica* L". *The Journal Protein*, **23**:403-411.
- Liggieri, C. (2005) "Proteasas extraídas del látex de *Asclepias curassavica* L. Su caracterización y aplicación en la síntesis de péptidos" Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
- Ling J.Q., T. Kojima, M. Shiraiwa & H. Takahara (2003) "Cloning of two cysteine proteinase genes, CysP<sub>1</sub> and CysP<sub>2</sub>, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis". *Biochim Biophys Acta*, **1627**(2-3):129-39.
- Liu, P., G. Tian, K. Lee, M., Wong & Y. Ye (2002) "Full enzymatic synthesis of a precursor of bioactive pentapeptide OGP (10-14) in organic solvents" *Tetrahedron Letters*, **43**(13): 2423-2425.
- López, L.M.I. (1995). "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae)". Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Lynn, K.R., W.J. Brockbank & N.A. Clevette, (1980). "Multiple forms of the asclepains, cysteinyl proteases from milkweed". *Biochim. Biophys. Acta*, **612**:119-125.

- Maccioni, R.B., C. Ott, I.I. Concha & J.P. Muñoz (2001) "The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology". *Eur. J. Biochem.*, **268**: 1518-27.
- Mantell, S.H., J.A. Matthews & R.A. McKee (1986) "*Principles of plant biotechnology*". Blackwell Sci. Pub., Oxford, pp. 207-212.
- Martínez M., I. Rubio-Somoza, P. Carbonero & I. Díaz (2003) "A cathepsin B-like cysteine protease gene from *Hordeum vulgare* (gene CatB) induced by GA in aleurone cells is under circadian control in leaves". *J Exp Bot.*, **54**(384):951-9.
- McKerrow, J.H (1999) "Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action". *Int. J. Parasitol.*, **29**: 833-7
- Meins, F. & P. Ahl. (1989). "Induction of chitinase and b-1, 3-glucanase in tobacco plants infected with *Pseudomonas tabaci* and *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*". *Plant Sci.*, **61**:155-161.
- Mitin, Y.V., N.P. Zapevalova, & E.Y. Gorbunova (1984) "Peptide synthesis catalyzed by papain at alkaline pH values". *International Journal of Peptide and Protein Research*, **23** (5): 528-534.
- Monter, B., B. Herzog, P. Stehle & P. Fürst (1991) "Kinetically controlled synthesis of dipeptides using ficin as biocatalyst". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **14**,(2):183-191.
- Morcelle del Valle, S. R. (2004a). "Proteasas del látex de *Funastrum clausum* (Jacq.) Schlechter (*Asclepiadaceae*): "Caracterización, purificación y aplicación en la síntesis de péptidos en medios orgánicos". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Bs. As. Argentina.
- Morcelle del Valle, S., N. Caffini & N. Priolo, (2004b). "Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex". *Fitoterapia*, **75**: 480-490.
- Morcelle, S., S. Barberis, N. Priolo, N. Caffini & P. Clapés (2006) "Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **41**: 117-12.
- Mrinalini M., P.J. Vithayathil, S.M. Raju & C.S. Ramadoss (2002) "Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, f". *Plant Science*, **163**:131-139.
- Mulligan, M.S., A.B. Lentsch, M. Huber-Lang, R.-F. Guo, V. Sarma, C.D. Wright, T.R. Ulich & P.A. Ward (2000) "Anti-inflammatory effects of mutant forms of secretory leukocyte protease inhibitor". *Am. J. Pathol.*, **15**:1033-9.
- Mullis K B. (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Sci Am.*, **262**: 56-61, 64-5.
- Murakami, Y., T. Yoshida, S. Hayashi & A. Hirata (2000) "Continuous enzymatic production of peptide precursor in aqueous/organic biphasic medium" *Biotechnology and Bioengineering*, July, **69**(1):57-65.
- Mutlu, A. & S. Gal, (1999). "Plant aspartic proteinases: Enzymes on the way to a function". *Physiol. Plant.*, **105**:569-576.

- Nallamsetty, S., S. Kundu & M.V. Jagannadham (2003) "Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*". *J. Protein Chem.*, **22**: 1-13.
- Nathans D. & H.J.O. Smith. (1975). "Restriction endo-nucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules". *Ann Rev Biochem.*, **44**: 449-67.
- NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) (1984) Enzyme Nomenclature 1984, Academic Press, NY.
- Obregón, W.D., M.C., Arribére, S. Morcelle del Valle, C., Liggieri, N.O. Caffini, & N.S. Priolo (2001). "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.*, **20**:17-25.
- Obregón, W.D., R. Curciarello, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2006) "Hidrolitic Profile and isolation of the Proteolytic Components of Latex from *Araujia angustifolia* Fruits" *Acta Farm. Bonaerense*, **25**: 206-12.
- Okamoto, T., T. Shimada, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura, & T. Minamikawa (2003). "C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase". *Plant Physiol.*, **132**:1892-900.
- Oyama, K., S. Irino & N. Hagi (1987) "Production of aspartame by immobilized thermoase" *Methods in Enzymology*, **136**:503-516.
- Pal, G. & N.K. Sinha, (1980). "Isolation, crystallization and properties of Calotropis DI and DII of *Calotropis gigantea*. *Arch Biochem. Biophys.*, **202**:321-329.
- Pande M., V.K. Dubey, S.C Yadav & M.V. Jagannadham (2006) "A novel serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchmanii*: purification and biochemical characterization" *J Agric Food Chem.*, **54**(26):10141-50.
- Pardo, M.F., L.M.I. López, N.O. Caffini & C.L. Natalucci, (2001). "Properties of a milk clotting protease isolated from Fruits of *Bromelia balansae* Mez". *Biological Chemistry Hoppe-Seyler.*, **382**: 871-874.
- Patel B.K. & M.V. Jagannadham (2003) "A high cysteine containing thiol proteinase from the latex of *Ervatamia heyneana*: purification and comparison with ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*". *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 6326-34.
- Patel A.K., V.K. Singh & M.V. Jagannadham (2007) "Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Ipomoea carnea* (morning glory)" *J Agric Food Chem.*, **55**:5809-18.
- Pechan T., P.W. Ma & D.S. Luthe. (2004) "Heterologous expression of maize (*Zea mays* L.) Mir1 cysteine proteinase in eukaryotic and prokaryotic expression systems". *Protein Expr Purif.*, **34**(1):134-41.
- Pereira, M.T., Lopes, M.T. P., Meira, W.I O. & C. E. Salas (2001) "Purification of a Cysteine Proteinase from *Carica candamarcensis* L. and Cloning of a Genomic Putative Fragment Coding for This Enzyme" *Protein Expression and Purification*, **22**: 249-257.

- Perkins, D. N., D. J Pappin, D. M. Creasy & J. S. Cottrell (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data". *Electrophoresis*, **20**:3551-3567.
- Pires, E. (1998a). "Cardosin A". En: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J. ed.), Academic Press, London. p.: 843-844.
- Pires, E. (1998b). "Cardosin B". En: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J. ed.), Academic Press, London, pp.: 844-846.
- Priolo, N., S. Morcelle del Valle, M.C. Arribére, L.M.I. López, & N. Caffini, (2000). "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.*, **19**:39-49.
- Quiroga, E., N. Priolo, J. Marchese & S. Barberis (2006) "Behaviour of *araujiain*, a new cysteine phytoprotease, in organic media with low water content". *Electronic Journal of Biotechnology*, **9** (1): 18-25.
- Quiroga, E., D. Obregón, N. Priolo, J. Marchese & S. Barberis (2007) "Peptide synthesis in aqueous-organic media catalyzed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (Asclepiadaceae) fruits". *Biochemical Engineering Journal*. Article in Press (doi:10.1016/j.bej.2007.08.020)
- Rajesh, R., C.D. Raghavendra Gowda, A. Natarajo, B.L. Dhananjaya, K. Kemparaju, & B.S. Vishwanath, (2005). "Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity". *Toxicon*, **46**: 84-92.
- Rao, M., A. Tanksale, M.Ghatge, & V. Deshpande, (1998). "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**( 3):597-635.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barrett (1993) "Evolutionary families of peptidases". *Biochem. J.*, **290**: 205-18.
- Rawlings, N. & A. Barrett (1995). "Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism". *Methods in Enzymology*, **248**:105-120
- Rawlings, N. & A. Barrett (2004a) "Introduction the clans and families of cysteine endopeptidases". En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2<sup>da</sup> edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp.: 1051-1071.
- Rawlings, N. & A. Barrett (2004b) "Introduction: serine peptidases and their clans and families". En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2<sup>da</sup> edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press. pp.: 1417-1438.
- Rawlings, N.D., F.R. Morton & A.J. Barrett, (2006) *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, **34**, D270-D272.
- Rice, K.D., R.D. Tanaka, B.A. Katz, R.P. Numerof & W.R. Moore (1998) "Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases". *Curr Pharm. Design*, **4**: 381-96.
- Riese, R.J., R.N. Mitchell, J.A. Villadangos, G.P. Shi, J.T. Palmer, E.R. Karp, G.T. De Sanctis, H.L. Ploegh & H.A. Chapman (1998) "Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity" *J. Clin. Invest.*, **101**: 2351-63.
- Roberts, S.B. (2002) "Gamma-secretase inhibitors and Alzheimer's disease". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**: 1579-88.

- Rosenthal, P.J. (1998) "Proteases of Malaria Parasites: New Targets for Chemotherapy". *Emerg. Infect. Diseases*, **4**: 49-56.
- Rudenskaya, G., E. Bogdanova, L. Revina, B. Golovkin, V., Stepanov & V.M. (1995). "Macluralisin-a serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid". *Planta*, **196**:174-79.
- Rudenskaya, G.N., A.M. Bogacheva, A. Preusser, A.V. Kuznetsova, Y.E. Dunaevsky, B.N. Golovkin & V.M. Stepanov (1998). "Taraxalisin- a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb. s.l". *FEBS Let.*, **437**:237-240.
- Sajid, M. & J.H. McKerrow (2002) "Cysteine proteases of parasitic organisms". *Mol. Biochem. Parasitol.*, **120**: 1-21.
- Sanger F., S. Nicklen & A.R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**: 5463-7.
- Southern E M. (1975) "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J Mol Biol.*, **98**: 503-17.
- Schecter, I. & A. Berger, (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain", *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **27**:157-62.
- Shevchenko, A., O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, A. Shevchenko, H. Boucherie & M. Mann (1996). "Linking genome and proteome by mass spectrometry: large scale identification of yeast proteins from two dimensional gels". *Proc. Natl Acad. Sci. USA* , **93**:14440-14445.
- Shevchenko, A., A. Loboda, A. Shevchenko, W. Ens & K. G. Standing (2000). "MALDI quadruple time-of-flight mass spectrometry: powerful tool for proteomic research". *Anal. Chem.*, **72**:2132-2141.
- Schlumbaum, A., F. Mauch, U. Vogeli & T. Boller. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, **324**:365-367.
- Sequeiros, C., M.J. Torres, S.A. Trejo, C. L. Natalucci & L. M. I. López (2005). "Philibertain g I the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*)". *The Protein Journal*, **24**:445-53.
- Sequeiros, C., (2006) "Búsqueda de proteasas en plantas de la Patagonia. Purificación y caracterización de endopeptidasas cisteínicas del látex de *Philibertia gilliesii* Hook et Arn. (*Apocynaceae*)" Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
- Simões, I., R. Faro , D. Bur , & C. Faro (2007) "Characterization of recombinant CDR1, an Arabidopsis aspartic proteinase involved in disease resistance" *J Biol Chem.*, **282**: 31358-31365.
- Steppek, G., J.M. Behnke, D.J. Buttle & I.R. Duce (2004) "Natural plant cysteine proteinases asanthelmintics" *Trends Parasit.*, **20** (7): 322-327.
- Su W, Lin C, Wu J, Li K, He G, Qian X, Wei C, & J. Yang. (2006) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding Lon protease from rice (*Oryza sativa*) *Biotechnol Lett.*, **28**:923-927.
- Tablero, M., R. Arreguín, B. Arreguín, M. Soriano, R.I. Sánchez, A. Rodríguez Romero & A. Hernández-Arana (1991). "Purification and characterization of

- multiple forms of asclepain g from *Asclepias glaucescens*". *H.B.K Plant Sci.*, **74**:7-15.
- Thakurta, P.G., S. Biswas, C. Chakrabarti, M. Sundd, M.V. Jagannadham & J.K. Dattagupta (2004) "Structural basis of the unusual stability and substrate specificity of ervatamin C, a plant cysteine protease from *Ervatamia coronaria*". *Biochemistry*, **43**:1532-40.
- Travascio, P., Zito, E. Portaccio, M., Diano, N., Grano, V., Di Martino, S., Bertolini, T., Rossi, S. & D.G. Mita, (2002). "Enzyme reaction engineering: effect of metanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized Penicillin G acylase under isothermal and non-isothermal conditions". *Biotechnol. Prog.*, **18**: 975-985.
- Trejo, S.A. (2005) "Purificación, caracterización bioquímica y estructural y expresión de una endopeptidasa cisteínica de látex de *Asclepios fruticosa* L. (*Apocynaceae*)", Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Trusek-Holownia, A. (2003) "Synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin" *Journal of Biotechnology*, **102** (2):153-163.
- Turk, D. & G. Guncar (2003) "Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets". *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.*, **59**, 203-13.
- Uchikoba, T., H. Yonezawa & M. Kaneda (1995). "Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine protease". *J. Biochem.*, **117**: 1126-1130.
- Uchikoba, T., H. Yonezawa, M. Shimada & M. Kaneda (1999) "Melain G, a cysteine protease from green fruits of the bead tree, *Melia azedarach*: a protease affected by specific amino acids at P<sub>3</sub> position". *BBA.*, **1430**: 84-94.
- Uchikoba, T., S. Hosoyamada, M. Onjyo, K. Arma, H. Yonezawa & M. Kaneda, (2001). "A serine endopeptidase from the fruits of *Melothria japonica* (thumb) Maxim". *Phytochemistry*, **57**:1-5.
- Uhlig, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. Nueva York: Willey & Sons, pp.: 1-11, 146-179.
- Vairo Cavalli, S., M.C. Arribére, A. Cortadi, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2003). "Morrenain b I, a papain-like endo-peptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)". *J. Protein. Chem.*, **22**:15-22.
- Vairo Cavalli, S.E. (2005). "Aspartilendopeptidasas de *Silybum marianum* (L.). Gaertn. con potencial aplicación en la industria láctea. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
- Vairo Cavalli, S.E., A. Cortadi, M.C. Arribére, P. Conforti, N.O. Caffini & N.S. Priolo, (2001). "Comparison of two cysteine endopeptidasas from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)". *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **382**:879-883.
- Watson J.D. & F.H.C. Crick (1953) "A structure for Deoxyribose Nucleic Acid". *Nature*, **171**:737-8.
- Watson J.D. & J. Tooze (1981). "The DNA story: A documentary history of gene cloning". New York: WH Freeman.
- Wescott, C.R. & A.M. Klivanov (1994) "The solvent dependence of enzyme specificity" *Biochim. Biophys. Acta*, **1206**: 1-9.



- Winnick, T., A.R. Davis & D.M. Greenberg (1940). "Physicochemical properties of the proteolytic enzyme from the latex of the milkweed, *Asclepias speciosa* Torr. Some comparisons with other proteases". *J. Gen. Physiol.*, **23**:275-288.
- Yadav, S.C., M. Pande & M.V. Jagannadam (2006) "Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*" *Phytochemistry*, **67(14)**:1414-26.
- Yamashita, D.S. & R.A. Dodds (2000) "Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K". *Curr Pharm Des.*, **6**: 1-24.
- Yan, L., J.Han, Q.Yang, Y.Sun, J.Kang, Z. Liu & M. Wu (2007) "Isolation and characterization of a cDNA encoding a papain-like cysteine protease from alfalfa. DNA Seq. Sep 25;:1 [Epub ahead of print].