

Índice general

Hipótesis de trabajo y objetivos	1
Introducción	
1. Introducción al mundo de las proteasas	3
1.2. Características de la acción enzimática	3
1.3. Clasificación de las enzimas	4
1.4. Hidrolasas vegetales	7
1.4.1. Enzimas proteolíticas	9
1.4.1.1. Clasificación y nomenclatura de las enzimas proteolíticas	11
1.4.1.2. Mecanismos catalíticos de las endopeptidasas	15
1.4.1.2.1. Peptidasas serínicas y treonínicas	15
1.4.1.2.2. Peptidasas cisteínicas	16
1.4.1.2.3. Peptidasas aspárticas	19
1.4.1.2.4. Metalopeptidasas	20
1.4.1.2.6. Peptidasas glutámicas	21
1.4.1.2.7. Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido	21
1.5. Proteasas de látex	22
1.5.1. Proteasas de látex de <i>Asclepiadaceae</i>	22
2. Introducción al mundo de las “ómicas”	27
2.1. Biología molecular	30
2.1.1. Hitos en el desarrollo de la biología molecular	30
2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa	33
2.1.3. Clonación de proteasas cisteínicas vegetales	34
2.2. Proteómica	35
2.2.1. Metodología proteómica	36
3. Introducción a la biocatálisis en medios no convencionales	38
3.1. Inmovilización enzimática en distintos soportes	40
3.2. Aplicación de proteasas a la biosíntesis en medios no convencionales	43
Referencias	47

Materiales & Métodos

Purificación y caracterización de proteasas

1. Material vegetal	60
1.1. <i>Araujia angustifolia</i> (Hook. et Arn.) Decaisne	60
1.2. <i>Araujia hortorum</i> Fourn.	61
2. Aislamiento y caracterización de los extractos crudos	62
2.1. Obtención de las preparaciones enzimáticas	62
2.2. Determinación del contenido de proteínas	62
2.2.1. Método de Bradford	62
2.2.1.1. Ensayo estándar	63
2.2.1.2. Microensayo	63
2.2.2. Medida de la absorbancia directa a 280 nm	63
2.2.3. Método de biuret	63
2.3. Ensayos de actividad hidrolítica	64
2.3.1. Actividad esterolítica	64
2.3.2. Actividad amidásica	65
2.3.3. Actividad pectinmetilesterasa	65
2.3.4. Actividad carboximetilcelulasa, poligalacturonidas y xilanasas	66
2.3.5. Actividad ramnogalacturonidasa	66
2.3.6. Actividad peptidásica	66
2.3.7. Actividad carboxipeptidásica	68
2.3.7.1. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A	68
2.4. Caracterización proteolítica de los extractos crudos	69
2.4.1. Perfil de pH de la actividad proteolítica	69
2.4.2. Efecto de inhibidores	69
2.4.3. Efecto térmico o calor de inactivación	70
2.4.4. Estabilidad térmica	70
2.5. Análisis electroforético	71
2.5.1. Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	71
2.5.1.1. Tipos de SDS-PAGE utilizados	71
2.5.1.1.1. Electroforesis con Tris-glicina	71

2.5.1.1.2. Electroforesis de alta resolución con Tris-tricina	74
2.5.1.1.3. Electroforesis en gradiente de poliacrilamida	76
2.5.1.2. Fijación y tinción	77
2.5.1.2.1. Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250	77
2.5.1.2.2. Tinción con Coomassie coloidal	78
2.5.1.2.3. Tinción con plata	79
2.5.1.3. Análisis de los geles por densitografía	81
2.5.2 . Isoelectroenfoque	81
2.5.2.1. Detección de actividad caseinolítica en geles: zimograma	85
3. Purificación de los extractos crudos	86
3.1. Cromatografía de intercambio iónico	86
3.2. Caracterización de las fracciones purificadas	87
3.2.1. Determinación del contenido de proteínas	87
3.2.2. Actividad peptidásica	87
3.2.2.1. Perfil de ph de la actividad proteolítica	88
3.2.2.2. Efecto de inhibidores	88
3.2.3. Actividad esterolítica	88
3.2.4. Actividad amidásica	88
3.2.5. Electroforesis de alta resolución con Tris-tricina y electroforesis en gradiente de poliacrilamida	88
3.2.8. Determinación de parámetros cinéticos	88
Metodología de las Ómicas	
1. Análisis por espectrometría de masas de las proteasas aisladas	90
2. Secuencia aminoacídica N-terminal y de péptidos internos	92
3. Mapa peptídico por espectrometría de masas (MALDI-TOF)	93
3.1. Digestión trípica en geles de poliacrilamida	93
4. Clonado de proteasas	95
4.1. Diseño de cebadores (primers) específicos	95
4.2. Aislamiento del cDNA	96
4.2.1. Extracción del RNA total	96
4.2.2. RACE-PCR	97
4.2.2.1. Reacción de retrotranscripción (RT)	97

4.2.2.2. Reacción de PCR	98
4.3. Electroforesis en geles de agarosa	99
4.4. NESTED PCR	100
4.5. Purificación de fragmentos de DNA	101
4.6. Clonado del cDNA	101
4.6.1. Medios de cultivo utilizados	101
4.6.1.1. Medios de cultivo líquidos	101
4.6.1.2. Medios de cultivo sólidos	102
4.6.1.3. reactivos adicionales	102
4.6.3.2. Obtención de células <i>e. Coli</i> competentes	103
4.7. Clonación	104
4.7.1. Ligación	105
4.7.2. Transformación y selección de los clones	105
4.7.3. Glicerinado de los clones	106
4.8. Secuenciación del cDNA clonado	107
4.8.1. Aislamiento de DNA plasmídico	107
4.8.2. Digestión con enzimas de restricción	107
4.8.3. Secuenciación del DNA	108
4.8.4. Análisis de las secuencias de los cDNAs	108
5. Modelado por homología. Bioinformática	108
Capacidad de los EC para la síntesis peptídica	
1. Inmovilización del extracto crudo	109
1.1. Entrampamiento en geles de poliacrilamida	110
1.1.1. Actividad caseinolítica de las proteasas entrampadas	110
1.2. Adsorción sobre poliamida	111
1.2.1. Evaluación de la actividad de las enzimas inmovilizadas sobre diferentes sustratos. Actividad enzimática remanente	111
1.3. Inmovilización sobre gel de agarosa	112
2. Reacción de síntesis con extractos crudos libres e inmovilizados como catalizadores	113
2.1. Selección de los medios de reacción para las síntesis	113
2.2. Selección de los sustratos para las síntesis	113

2.3. Selección del pH y temperatura para las síntesis	114
2.4. Reacciones de síntesis	114
2.5. Control analítico de los componentes de las reacciones de síntesis	114
2.6. Proceso de inmovilización	115
2.6.1. Determinación de la actividad enzimática	115
2.6.1. Determinación de proteínas	115
2.6.1. Carga enzimática y rendimiento de inmovilización	115
2.6.1. Rendimiento de proteína	116
2.6.1. Inmovilización de ec de <i>Araujia hortorum</i> en gel de azarosa	116
2.7. Síntesis en medios orgánicos utilizando	
EC de <i>Araujia hortorum</i> libre como catalizador	116
Referencias	119

Resultados & Discusión

Extractos Crudos	122
Purificación del extracto crudo obtenido a partir del látex de <i>Araujia angustifolia</i>	129
Purificación del extracto crudo obtenido a partir del látex de <i>Araujia hortorum</i>	141
Clonado y secuenciamiento de araujaína aII	153
Inmovilización Enzimática & Síntesis Peptídico	168
Referencias	177
Conclusiones	179