LIPROVE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

“Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas
de *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)”

Mariela Anahí Bruno
Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas

Dr. Néstor Oscar Caffini
Director

Año 2007

Indice General

Capítulo 1

1.1. Introducción	1
1.1.1. Una introducción a las enzimas.	1
1.1.2. Primeras utilizaciones de las enzimas.	2
1.1.2.1. Cerveza.	3
1.1.2.2. Vino.	3
1.1.2.3. Pan.	3
1.1.2.4. Queso.	4
1.1.2.5. Chucrut.	4
1.1.3. Enzimas proteolíticas.	4
1.1.4. Clasificación E.C.	6
1.1.5. El sistema MEROPS de clasificación de peptidasas.	8
1.1.6. Familias y clanes de peptidasas cisteínicas.	10
1.1.7. Rol fisiológico de enzimas proteolíticas en los vegetales.	13
1.1.7.1. Germinación.	16
1.1.7.2. Senescencia.	16
1.1.7.3. Respuesta de las proteasas cisteínicas al estrés biótico y abiótico.	16
1.1.7.4. Adquisición de nutrientes.	17
1.1.7.5. Apoptosis o muerte celular programada.	17
1.1.8. Familia Bromeliaceae.	17
1.1.9. Bromelia hieronymi Mez.	19
1.1.10. Importancia del “chaguar” para la comunidad Wichí.	20
1.1.11. Usos industriales de las enzimas proteolíticas en la actualidad.	22
1.1.11.1. Componente de detergentes.	25
1.1.11.2. Manufactura de quesos.	25
1.1.11.3. Tiernización de carnes.	26
1.1.11.4. Producción de cueros.	26
1.1.11.5. Síntesis de aspartamo.	27
1.1.11.6. Cervecería y panificación.	27
1.1.11.7. Degradación enzimática de proteínas de desecho.	28
1.1.11.8. Obtención de proteínas modificadas para la industria alimentaria.	28
1.1.11.9. Industria farmacéutica.	30
1.1.11.10. Industria textil.	31
1.2. Materiales y Métodos	32
1.2.1. Material vegetal.	32
1.2.2. Obtención del extracto crudo.	32
1.2.3. Precipitación acetónica y etanólica fraccionada: obtención de extractos parcialmente purificados.	33
1.2.4. Determinación del contenido de proteínas.	34
1.2.5. Determinación del contenido de carbohidratos.	34
1.2.6. Determinación de la actividad proteolítica.	35
1.2.6.1. Sustrato proteico: caseína.	35

1.2.6.2. Sustratos sintéticos: N- α -CBZ-p-Nitrofenil ésteres de aminoácidos.	36
1.2.7. Efecto del tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas.	36
1.2.8. Identificación del tipo de proteasas presentes por medio del efecto de inhibidores.	37
1.2.9. Activación con cisteína.	37
1.2.10. Determinación del perfil de pH óptimo.	37
1.2.11. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica.	38
1.2.12. Estabilidad térmica.	38
1.2.13. Actividad caseinolítica en función de la temperatura.	38
1.2.14. Electroforesis desnaturalizante en gel de polacrilamida (SDS-PAGE).	39
1.2.14.1. Tratamiento de las muestras.	39
1.2.14.2. Preparación de los geles.	40
1.2.14.3. Aplicación de las muestras.	41
1.2.14.4. Condiciones de corrida.	41
1.2.14.5. Fijación, coloración y decoloración.	41
1.2.14.6. Estimación de los pesos moleculares.	42
1.2.14.7. Secado y almacenamiento de geles.	42
1.2.15. Isoelectroenfoque.	42
1.2.15.1. Preparación de las muestras.	42
1.2.15.2. Preparación de los geles.	43
1.2.15.3. Desarrollo del isoelectroenfoque	43
1.2.15.4. Fijación y coloración.	44
1.2.15.5. Estimación de los puntos isoelectrónicos.	44
1.2.16. Zimograma.	45
1.2.16.1. Preparación de las placas agarosa embebidas en caseína.	45
1.2.16.2. Incubación.	46
1.2.16.3. Fijación y coloración.	46
1.2.17. Obtención de imágenes de geles y tratamiento analítico de datos por densitografía.	46
1.3. Resultados y Discusión.	48
1.3.1. Obtención de extractos crudos.	48
1.3.2. Condiciones de linealidad en las medidas de actividad caseinolítica.	49
1.3.3. Efecto del tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas.	50
1.3.4. Purificación parcial del extracto crudo.	51
1.3.5. SDS-PAGE.	54
1.3.6. IEF y zimograma.	54
1.3.7. Caracterización del extracto parcialmente purificado.	57
1.3.7.1. Sustratos sintéticos: N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos.	57
1.3.7.2. Inhibidores.	57
1.3.7.3. Cisteína.	58
1.3.7.4. Perfil de pH óptimo.	58
1.3.7.5. Fuerza iónica.	59
1.3.7.6. Estabilidad térmica.	60
1.3.7.7. Actividad caseinolítica en función de la temperatura.	61
1.4. Conclusiones.	63
Referencias bibliográficas	65

Capítulo 2

2.1. Introducción.	70
2.1.1. Endopeptidasas: mecanismo catalítico e inhibición.	70
2.1.1.1. Peptidasas cisteínicas.	70
2.1.1.2. Peptidasas serínicas y treonínicas.	74
2.1.1.3. Peptidasas aspárticas.	78
2.1.1.4. Metalopeptidasas.	80
2.1.2. Síntesis y transferencia intracelular de las fitopeptidasas cisteínicas.	82
2.1.3. Fitopeptidasas cisteínicas. Endopeptidasas de Bromeliaceae.	83
2.1.4. Descripción de peptidasas purificadas de <i>Ananas comosus</i> .	84
2.1.4.1. Bromelaína de tallo.	85
2.1.4.2. Bromelaína de fruto.	85
2.1.4.3. Ananaina.	86
2.1.4.4. Comosaína.	87
2.1.5. Isoenzimas.	88
2.1.6. Cinética enzimática.	90
2.1.6.1. Utilización de la velocidad inicial.	90
2.1.6.2. Cinética michaeliana.	92
2.1.6.3. Cálculo de la K_M y de la V_{max} de una enzima.	95
2.1.6.4. Significado de los parámetros cinéticos.	97
2.2. Materiales y Métodos.	99
2.2.1. Purificación cromatográfica (FPLC).	99
2.2.1.1. Preparación de las muestras.	99
2.2.1.2. Estrategia de purificación.	99
2.2.1.3. Purificación de hieronymaina I.	100
2.2.1.4. Purificación de hieronymaina II.	101
2.2.1.5. Purificación de hieronymaina III.	101
2.2.2. Actividad caseinolítica.	101
2.2.3. Caracterización de las fracciones activas.	102
2.2.4. Titulación del sitio catalítico.	102
2.2.5. Sustratos sintéticos: actividad y cinética.	102
2.2.5.1. N- α -CBZ- <i>p</i> -Nitrofenil ésteres de aminoácidos.	103
2.2.5.2. P-Glu-Phe-Leu- <i>p</i> -nitro-anilida (PFLNA).	103
2.2.5.3. Phe-Arg- <i>p</i> -nitro-anilida y Arg-Arg- <i>p</i> -nitro-anilida.	103
2.2.6. Espectrometría de masas.	104
2.2.7. Secuenciamiento del extremo N-terminal.	104
2.2.8. Clonado de una peptidasa de <i>Bromelia hieronymi</i> Mez.	105
2.2.8.1. Diseño de cebadores ("primers") específicos.	105
2.2.8.2. Extracción del RNA total de fruto.	106
2.2.8.3. RACE-PCR.	106
2.2.8.3.1. Reacción de retrotranscripción (RT).	107
2.2.8.3.2. PCR.	107
2.2.8.4. Electroforesis en gel de agarosa.	108
2.2.8.4.1. Preparación de las muestras.	109
2.2.8.4.2. Preparación de los geles.	109
2.2.8.4.3. Condiciones de corrida.	109
2.2.8.4.4. Revelado y estimación de pesos moleculares.	109
2.2.8.5. Purificación de Fragmentos de DNA.	110

2.2.8.6. Clonado del cDNA.	111
2.2.8.6.1. Ligación.	112
2.2.8.6.2. Transformación.	113
2.2.8.6.3. Selección de los clones.	115
2.2.8.7. Secuenciación del cDNA clonado.	116
2.2.8.7.1. Aislamiento de DNA plasmídico.	116
2.2.8.7.2. Digestión con enzimas de restricción.	116
2.2.8.7.3. Secuenciación del DNA.	116
2.2.8.7.4. Análisis de las secuencias de los cDNAs.	116
2.3. Resultados y Discusión.	118
2.3.1. Obtención de fracciones purificadas.	118
2.3.1.1. Separación de los tres grupos de proteasas.	118
2.3.1.1.1. Cromatografía de intercambio catiónico.	118
2.3.1.1.2. Cromatografía de intercambio aniónico.	120
2.3.1.2. Hieronymaína I.	122
2.3.1.3. Hieronymaína II	124
2.3.1.4. Hieronymaína III.	127
2.3.2. Caracterización de las fracciones purificadas.	129
2.3.2.1. Tablas de purificación.	130
2.3.2.2. Perfil de pH.	131
2.3.2.3. SDS-PAGE.	131
2.3.2.4. Acción de cisteína e inhibidores.	132
2.3.2.5. Titulación del sitio activo con E-64.	132
2.3.2.6. Comparación de la secuencia N-terminal.	134
2.3.2.7. Sustratos sintéticos.	137
2.3.2.7.1. PFLNA.	138
2.3.2.7.2. CBZ- <i>p</i> -Nitrofenil ésteres de aminoácidos.	138
2.3.2.7.3. Z-Phe-Arg- <i>p</i> -nitro-anilida.	140
2.3.2.7.4. Z-Arg-Arg- <i>p</i> -nitro-anilida.	140
2.3.3. Clonado y secuenciamiento del cDNA de una peptidasa de <i>Bromelia hieronymi</i> .	140
2.3.3.1. Obtención del cDNA.	140
2.3.3.2. Clonado del cDNA.	142
2.3.3.3. Obtención de la secuencia de una peptidasa.	143
2.4. Conclusiones.	147
Referencias bibliográficas.	149

Capítulo 3

3.1. Introducción.	156
3.1.1. Producción láctea en Argentina.	156
3.1.1.1. Ubicación de las cuencas lecheras.	156
3.1.1.2. Producción Mundial.	157
3.1.1.3. Mercado Local.	158
3.1.1.4. Principales productos lácteos.	159
3.1.2 Composición de la leche.	161
3.1.2.1. Proteínas de la leche.	162
3.1.2.2. Lípidos de la leche.	163
3.1.2.3. Lactosa.	163
3.1.2.4. Sales minerales.	163

3.1.2.5. Enzimas.	164
3.1.3. Caseínas.	164
3.1.4. Estructura de la micela de caseína.	165
3.1.5. Composición del cuajo.	167
3.1.6. Enzimas coagulantes de la leche de origen vegetal.	169
3.1.7. Mecanismo de la coagulación de la leche.	170
3.1.8. Proceso de elaboración de un queso.	171
3.1.9 Obtención de hidrolizados de caseínas.	173
3.2. Materiales y Métodos.	175
3.2.1. Preparación enzimática.	175
3.2.2. Actividad coagulante de proteínas de leche.	175
3.2.3. Efecto de la concentración del PER y de la temperatura de reacción.	175
3.2.4. Fuerza coagulante.	176
3.2.5. Hidrólisis de caseínas.	176
3.2.6. Electroforesis en geles de tricina (SDS-Tricina-PAGE).	177
3.2.6.1. Preparación de los geles.	177
3.2.6.2. Aplicación de muestras y condiciones de corrida.	178
3.2.7. Obtención de miniquesos.	179
3.2.7.1. Manufactura de los quesos.	179
3.2.7.2. Control de calidad de la leche.	179
3.2.7.2.1. Acidez.	179
3.2.7.2.2. Prueba del alcohol.	179
3.2.7.2.3. Prueba de la reductasa.	180
3.2.7.3. Acondicionamiento de la leche para la obtención de miniquesos.	180
3.2.7.4. Agregado de cloruro de calcio.	180
3.2.7.5. Coagulación.	181
3.2.7.6. Corte de la cuajada.	181
3.2.7.7. Cocción.	181
3.2.7.8. Extracción de la cuajada y moldeado de los miniquesos.	182
3.2.7.9. Prensado y salazón.	182
3.2.7.10. Maduración.	182
3.2.8. Análisis sensorial.	182
3.3. Resultados y Discusión.	184
3.3.1. Actividad coagulante de la leche.	184
3.3.2. Fuerza coagulante.	185
3.3.3. Hidrolizados de caseínas.	185
3.3.4. Control de calidad de la leche y capacidad de coagulación.	186
3.3.5. Manufactura de los miniquesos.	188
3.3.5.1. Características macroscópicas.	188
3.3.5.2. Análisis sensorial.	189
3.4. Conclusiones.	191
Referencias bibliográficas.	193

Abreviaturas

AD: agua destilada
Ampso: Acido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)amino]-2-hidroxipropanosulfónico.
c.s.p.: cantidad suficiente para
Caps: Acido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico.
DFP: diisopropilfluorofosfato
DNA: ácido desoxirribonucleico
E.C.: Enzyme Commission del NC-IUBMB (Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular)
Dpi: puntos por pulgada
E-64: L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidin)butano
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
IEF: isoelectroenfoque
IUBMB: Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
 k_{cat} : constante de catalizador
KDa: kilo Dalton
 K_M : constante de Michaelis
M: molar
mA: miliamperes
Mes: ácido 2-(N-morfolino) propanosulfónicoetanosulfónico
 μmol : micromol
mM: milimolar
Mops: ácido 3-(N-morfolino)
N-CBZ: N-carbobenzoxi
 $^{\circ}\text{C}$: grado centígrado
PAR: precipitado acetónico redissuelto
PER: precipitado etanólico redissuelto
pI: punto isoeléctrico
PSA: Persulfato de Amonio
RNA: ácido ribonucleico
SDS: lauril sulfato de sodio
Taps: ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico
TCA: ácido tricloroacético
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris: tris (hidroximetil)-aminometano
UC: unidad coagulante
Uca: unidad caseinolítica
Ucbz: unidades carbobenzoxi
UV: ultravioleta
V: voltio
 V_{max} : velocidad máxima

Objetivos

- ✓ Aislar, purificar y caracterizar las peptidasas presentes en frutos de *Bromelia hieronymi* Mez, planta que crece espontáneamente en nuestro país.
- ✓ Contar con nuevas fuentes de enzimas proteolíticas que eventualmente reemplacen a las preparaciones comerciales importadas que actualmente se usan en diversos procesos biotecnológicos.
- ✓ Ensayar esta preparación enzimática en la elaboración de quesos.
- ✓ Obtener cDNA de peptidasas a partir del RNA total de fruto.
- ✓ Clonar y secuenciar los cDNA correspondientes a peptidasas cisteínicas.

Capítulo 1

Capítulo 1

Obtención y caracterización de extractos proteolíticamente activos a partir de *Bromelia hieronymi* Mez

1.1. Introducción

1.1.1. Una introducción a las enzimas

La mayor parte de la historia de la bioquímica coincide con la historia de la investigación de las enzimas. La catálisis biológica fue conocida y descrita a fines de 1700, en estudios de la acción ejercida por las secreciones gástricas sobre la carne. A comienzos de 1800 se realizaron exámenes de la conversión de almidón en azúcar empleando saliva y varios extractos de origen vegetal. En 1857 Louis Pasteur llegó a la conclusión que la transformación del azúcar en etanol empleando levaduras era catalizada por "fermentos". Frederick Kühne llamó a estas moléculas **enzimas**.

Los seres vivos utilizan la materia y la energía del ambiente mediante reacciones químicas celulares denominadas en conjunto metabolismo. Éstas reacciones ocurren en condiciones fisiológicas y en un período de tiempo útil para la vida. Los catalizadores o "aceleradores" de éstas reacciones son las enzimas. A excepción de un pequeño grupo de moléculas catalíticas de ARN, todas las enzimas son proteínas. Su actividad catalítica depende del mantenimiento de la conformación nativa. Una enzima proporciona un microambiente específico dentro del cual una reacción dada puede ocurrir más rápidamente, encontrándose situado dentro de los límites de un hueco en la molécula de la enzima denominado sitio activo (Lehninger *et al.*, 2004).

Las enzimas poseen un poder catalítico extraordinario, a menudo mucho mayor que el de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Tienen un grado alto de especificidad para su sustrato, aceleran eficientemente las reacciones químicas que catalizan sin afectar las constantes de equilibrio y actúan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Pocos catalizadores no biológicos tienen estas propiedades (Lodish *et al.*, 2004). Operando en secuencias organizadas, catalizan cientos de reacciones paso a paso que degradan moléculas nutritivas, conservan y transforman la energía química y sintetizan macromoléculas biológicas a partir de precursores simples. Por la acción de enzimas reguladoras, las vías metabólicas son finamente coordinadas para crear una interacción armoniosa entre muchas actividades necesarias para sostener la vida (Berg *et al.*, 2002).

1.1.2. Primeras utilidades de las enzimas (Uhlig, 1998)

La biotecnología no es una disciplina nueva sino que sus orígenes se remontan a los albores de la historia de la humanidad. Nuestros ancestros

Figura 1.1.1. Confección de pan en el antiguo Egipto

iniciaron, hace miles de años durante la Edad de Piedra, la práctica de utilizar organismos vivos y sus productos para procesar materias primas y obtener algún alimento diferente. La Figura 1.1.1 muestra un mural egipcio representando la confección de pastas de panadería.

Así, sin saberlo, el hombre había comenzado a obtener beneficios de ciertas enzimas, las cuales fueron empleadas durante muchísimo tiempo antes de ser investigadas y conocer su naturaleza bioquímica. Primero se utilizaron microorganismos vivos para la producción de pan y de bebidas alcohólicas como cerveza y vino. Luego se desarrollaron procesos para conservar alimentos, como la preservación de vegetales por fermentación con

Lactobacillus (chucrut) o para prolongar la vida útil de la leche, transformándola en queso.

1.1.2.1. Cerveza

La cerveza es uno de los productos más antiguos de la civilización. Los historiadores creen que ya 10000 a.C. en Mesopotamia y Sumeria los hombres elaboraban una bebida a base de raíces, cereales y frutos silvestres que previamente masticaban para desencadenar la fermentación alcohólica. En 1.981 se encontró una tablilla de piedra que describe un tipo de cerveza elaborada en Babilonia alrededor del año 6000 a.C. En la antigüedad, los chinos también elaboraban cerveza, del mismo modo que las civilizaciones precolombinas de América, que utilizaban maíz en lugar de cebada. De manera similar, en la antigua Britania se elaboraba cerveza con trigo malteado antes de que los romanos introdujeran la cebada.

1.1.2.2. Vino

El vino es mencionado en el Antiguo Testamento (Génesis, 9:20) como un producto especial de la fermentación, ya en tiempos de Noé. El cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L., la uva vinícola por excelencia), se remonta al Neolítico, hacia el año 6000 a.C. en el Asia Menor, entre los mares Caspio y Negro. Diversos grabados y pinturas egipcios hallados en Tebas, con más de 4500 años de antigüedad, muestran el cultivo de la vid y la obtención y almacenado del vino (Lozano Teruel, 1996). La primera palabra descifrada por Champollion al estudiar la piedra Roseta fue “Erep”, que significa vino. En el antiguo Egipto se conocieron al menos seis tipos de vino.

1.1.2.3. Pan

Los utensilios más antiguos utilizados en panificación fueron hallados en Jericó (Canaan) y datan de más de 5000 años. La forma más simple de fabricar pan era colocando una pieza de masa elaborada con harina y agua sobre una superficie candente. Alrededor del 3500 a.C. ya existían hornos cilíndricos y distintas variedades de pan, aunque eran confeccionados sin levadura (panes ácidos). Los egipcios fueron quienes descubrieron la fermentación y con ella el verdadero pan, proceso que ya se realizaba durante el reinado de Ramsés

III. También en la Babilonia de Nabucodonosor la preparación del pan fermentado era conocida (Capel, 1991; Varela, 1991; Tejera Osuna, 1993).

1.1.2.4. Queso

El queso es uno de los derivados lácteos más sabroso y variado, con una gran tradición en todas las culturas. Se tienen noticias de que este alimento se produjo por primera vez en el año 3000 a.C. en algún lugar de Oriente Medio. También existe una leyenda (Alcázar Lázaro, 1998) que dice que el queso fue obtenido circunstancialmente por un mercader árabe mientras realizaba un largo viaje por el desierto, quien almacenó leche en un odre elaborado con el estómago de un cordero; cuando quiso consumirla, vio que estaba coagulada y fermentada (debido al cuajo del estómago del cordero y a la alta temperatura del desierto).

1.1.2.5. Chucrut

Es el resultado de fermentar la col blanca o repollo en presencia de sal. Aunque ahora está asociado a la cocina austríaco-alemana, es un alimento antiquísimo y de hecho ya era consumido en China en el 3000 a.C. por los obreros que construían la Gran Muralla China. Durante el imperio romano era bien conocido y algunos autores como Plinio ya hablan de su elaboración (Arnau, <http://www.enbuenasmanos.com>).

1.1.3. Enzimas proteolíticas

Las enzimas, gracias a la configuración tridimensional de su sitio activo, unen ligandos específicos denominados **sustratos** y catalizan su conversión en **productos** en condiciones fisiológicas. Así cada enzima actúa sobre una reacción determinada. Por ejemplo la enzima **ureasa** produce la hidrólisis de la urea y la **ADN-polimerasa** cataliza la polimerización de desoxirribonucleótidos para formar el ADN (Lehninger *et al.*, 2004). Tradicionalmente se conocen con el nombre de **proteasas** aquellas enzimas que actúan en la degradación de las proteínas. También son denominadas **enzimas proteolíticas** o **péptido-hidrolasas**. El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, 1984) recomendó el uso del

término **peptidasa** como el más general para designar a las enzimas hidrolíticas que degradan enlaces peptídicos. Las peptidasas comprenden dos grandes grupos de enzimas: las **endopeptidasas** y las **exopeptidasas**, que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína o que remueven secuencialmente uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino, respectivamente. El término **oligopeptidasa** es a menudo empleado para referirse a endopeptidasas que actúan preferentemente sobre oligopéptidos. En la actualidad se conocen más de mil peptidasas provenientes de vegetales, animales y microorganismos (Barrett *et al.*, 2004a).

Las enzimas proteolíticas desempeñan un rol crítico en los sistemas biológicos. El clivaje proteolítico de la unión peptídica es una de las más frecuentes e importantes modificaciones enzimáticas de proteínas en los sistemas vivos. El procesamiento proteolítico es la etapa final en la expresión de actividad de una gran variedad de proteínas y ocurre mediada por muchas vías y con la participación de muchas peptidasas diferentes. Sin embargo la proteólisis es limitada y dirigida hacia la ruptura de uniones peptídicas específicas en proteínas determinadas. Esta especificidad de corte depende de la accesibilidad de la unión peptídica a escindir, de los aminoácidos involucrados en este enlace peptídico y del entorno aportado por otros aminoácidos cercanos a la unión (Neurath, 1989).

Existe un modelo ideado por Schechter y Berger (1967) que describe la especificidad de corte de las peptidasas considerando que los residuos de aminoácido del sustrato (P) se unen a subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser clivado hacia el extremo N-terminal como P1, P2, P3, etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P1', P2', P3', etc. Los subsitios de la proteasa actúan acomodando los residuos del sustrato y se numeran como S1, S2, S3 y S1', S2', S3', respectivamente (Figura 1.1.2).

Figura 1.1.2. Nomenclatura de Schechter y Berger para la especificidad de una peptidasa

Las enzimas proteolíticas pueden ser agrupadas en función de la naturaleza química de su sitio catalítico (Hartley, 1960). Durante largo tiempo se reconocieron cuatro tipos catalíticos diferentes: serínicos, cisteínicos, aspárticos y del tipo ion metálico. Más recientemente se ha descubierto e incorporado el grupo catalítico treonínico (Barret *et al.* 2004b).

Las enzimas que presentan estos cinco tipos catalíticos se pueden agrupar en dos categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (peptidasas serínicas, cisteínicas y treonínicas), donde el nucleófilo del sitio catalítico es parte de un aminoácido (serina, cisteína o treonina, respectivamente) y las que no forman complejos enzima-sustrato covalentes (peptidasas aspárticas y metalopeptidasas), siendo el responsable del ataque nucleofílico una molécula de agua activada. Estas categorías contribuyen a los dos sistemas actuales de nomenclatura y clasificación de peptidasas, el sistema EC y el sistema MEROPS.

1.1.4. Clasificación E.C.

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 por la Comisión de Enzimas ("Enzyme Commission", E.C.) de la International Union of Biochemistry (IUB) en el año 1961, debido a que el nombre dado por los investigadores a las enzimas que estudiaban, sumado al número creciente de enzimas reportadas, provocaban una situación caótica que requería de un

inmediato ordenamiento. En la actualidad, 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: Oxidorreductasas (1), Transferasas (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5) y Ligasas (6) de acuerdo a la reacción que catalizan. Las peptidasas integran la subclase 3.4, que a su vez contiene catorce diferentes sub-subclases como muestra la Tabla 1.1.1.

Tabla 1.1.1. Sistema EC de clasificación de peptidasas. El número entre paréntesis indica el número de entradas registradas hasta la fecha (Barrett, 2001)

Tipo de peptidasa	
EC 3.4.11	Aminopeptidasas (21)
EC 3.4.13	Dipeptidasas (11)
EC 3.4.14	Di- y Tripeptidil-peptidasas (8)
EC 3.4.15	Peptidil-dipeptidasas (3)
EC 3.4.16	Carboxipeptidasas serínicas (4)
EC 3.4.17	Metalocarboxipeptidasas (19)
EC 3.4.18	Carboxipeptidasas cisteínicas (1)
EC 3.4.19	Omega peptidasas (9)
EC 3.4.21	Endopeptidasas serínicas (82)
EC 3.4.22	Endopeptidasas cisteínicas (39)
EC 3.4.23	Endopeptidasas aspárticas (36)
EC 3.4.24	Metaloendopeptidasas (80)
EC 3.4.25	Endopeptidasas treonínicas (1)
EC 3.4.99	Endopeptidasas de tipo desconocido (0)

Las exopeptidasas que actúan únicamente sobre el extremo N-terminal del sustrato pueden liberar un único residuo aminoacídico (aminopeptidasas, EC 3.4.11) o un di- o tripéptido (di- y tripeptidil-peptidasas, EC 3.4.14) y las que atacan el extremo C-terminal pueden liberar un solo aminoácido (carboxipeptidasas, EC 3.4.16-18) o un dipéptido (peptidil-dipeptidasas, EC 3.4.15). Las carboxipeptidasas se agrupan en sub-subclases diferentes sobre la base de sus mecanismos catalíticos en serínicas (EC 3.4.16), cisteínicas (EC 3.4.18) y metalocarboxipeptidasas (EC 3.4.17). Otras exopeptidasas son específicas para dipéptidos (dipeptidasas, EC 3.4.13) o remueven residuos

terminales que están sustituidos, ciclados o unidos por uniones isopeptídicas (omegapeptidasas, EC 3.4.19).

Las endopeptidasas se dividen en sub-subclases en función de su mecanismo catalítico, tal como lo propusiera originalmente Hartley (1960). Las endopeptidasas serínicas (EC 3.4.21) poseen un residuo serina en el sitio activo, las cisteínicas (EC 3.4.22) exhiben un residuo cisteína y las aspárticas (EC 3.4.23) uno o dos residuos aspártico; por otra parte las metalopeptidasas (EC 3.4.24) requieren la presencia de un ion metálico, frecuentemente Zn^{+2} . Recientemente (Rawlings y Barrett, 2004) se han encontrado peptidasas en cuyo sitio activo hay un residuo treonina en lugar de serina, lo que genera una nueva sub-subclase: la de las endopeptidasas treonínicas (EC 3.4.35). Se denominan oligopeptidasas a aquellas endopeptidasas que sólo hidrolizan pequeños péptidos (Barrett, 2001).

La clasificación inicial de una nueva endopeptidasa purificada dentro de un tipo catalítico determinado depende de los resultados de los test de inhibidores específicos de grupo. También si se conoce su secuencia polipeptídica podrá incluírsela con facilidad en una familia determinada y por tanto le corresponderá el tipo catalítico propio de la familia, sin necesidad de las pruebas de inhibición. El conocimiento de pequeñas secuencias internas o de su fragmento N-terminal puede ser suficiente como para asignarle un sitio tentativo dentro de alguna de las familias. Cuando la descripción del aislamiento y la especificidad de la nueva peptidasa ha sido descrita en una publicación periódica con referato y la secuencia ha sido dilucidada, es tiempo para proponer una entrada EC, la cual puede realizarse en el sitio Web de ExPASy (URL: <http://www.expasy.ch/>).

1.1.5. El sistema MEROPS de clasificación de peptidasas

Como puede deducirse a partir de la Tabla 1.1.1, la mayoría de las enzimas proteolíticas son endopeptidasas (238 sobre un total de 314) y están distribuidas en sólo 5 de las 14 sub-subclases existentes. En 1993, N. D. Rawlings y A.J. Barret comenzaron a desarrollar una nueva forma de

clasificación de las peptidasas, con el propósito de agruparlas en una forma que representase sus características estructurales básicas y sus relaciones evolutivas, aprovechando el conocimiento de las secuencias aminoacídicas disponibles en ese entonces. El sistema se fue enriqueciendo a través de sucesivas comunicaciones (Rawlings & Barrett, 1994 a, b y 1995 a, b), lo que finalmente dio lugar a la base de datos MEROPS (URL: <http://www.merops.co.uk>), un sistema de clasificación de peptidasas en el que las mismas son agrupadas en familias y clanes, como puede verse en la Tabla 1.1.2.

Tabla 1.1.2. Los tres niveles de la clasificación MEROPS		
Nivel	Descripción	Identificadores
Clan	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	A, C, M, P, S
Familia	Una familia incluye peptidasas que presentan homología en su secuencia aminoacídica	A, C, M, S, T, U
Peptidasa	Una peptidasa se distingue de las demás por diferencias en la actividad, estructura u origen genético	A, C, M, S, T, U

Una **familia** está constituida por un grupo de peptidasas en el que la secuencia aminoacídica de cada miembro muestra una relación estadísticamente significativa con al menos la de otro miembro de la familia en la zona de la molécula responsable de la actividad peptidásica (Rawlings & Barrett, 1993).

El término **clan** describe un grupo de familias cuyos miembros han evolucionado a partir de una proteína ancestral común, pero que han divergido tanto que su relación no puede ser establecida simplemente por la comparación de sus estructuras primarias (Rawlings & Barrett, 1993; Barrett & Rawlings, 1995). Un clan puede incluir familias de más de un tipo catalítico, como ocurre en el Clan PA, que contiene a la fecha diez familias de peptidasas serínicas y cinco de peptidasas cisteínicas.

Los identificadores utilizados para los clanes, familias y peptidasas en la clasificación MEROPS comienzan con una letra que indica el tipo catalítico de la peptidasa en el grupo: A (aspártica), C (cisteínica), M (metalo), S (serínica), T (treonínica), o U (sin clasificar). La letra P es también utilizada para identificar dos clanes que contienen peptidasas de más de un tipo. El identificador de un clan se completa con una segunda letra mayúscula, asignada secuencialmente (por ejemplo, clan CA), y el identificador para una familia es completado con un número (por ejemplo, C14, la familia de las caspasas). El identificador MEROPS para cada peptidasa individual comienza con el identificador de familia y se completa con un número decimal (por ejemplo, C14.001 para la caspasa 1). Todos los identificadores son estables, siendo cambiados sólo bajo circunstancias especiales, y jamás son reutilizados (Barrett, 2001). Referencias cruzadas al sistema MEROPS pueden hallarse en la base de datos SWISS-PROT (en el sitio ExPASy, <http://www.expasy.ch/>) y en la lista EC (URL: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>).

1.1.6. Familias y clanes de proteasas cisteínicas

Las peptidasas cisteínicas son aquellas en las que el nucleófilo es un grupo sulfhidrilo de un residuo cisteína (Cys). El mecanismo catalítico de la reacción es similar al de las peptidasas serínicas y treonínicas, en las que se requiere un nucleófilo y un dador de protón; el donador de protones en todas las cisteínicas estudiadas es un residuo de histidina (His). En algunas familias sólo esos dos residuos son necesarios para la catálisis, pero en otros casos se necesita un tercer residuo que oriente adecuadamente el anillo imidazol de la histidina. Las peptidasas cisteínicas se clasifican actualmente en seis clanes (CA, CD, CE, CF, CH y CX) y dos subclanes (PA y PC). En la Tabla 1.1.3 se consignan las familias que los constituyen y los residuos catalíticos involucrados (Barrett *et al.*, 2004).

Tabla 1.1.3. Clanes y familias de peptidasas cisteínicas (Barrett *et al.*, 2004).

Clan	Familia o Subfamilia	Enzima representativa
CA Residuos catalíticos: Gln, Cys, His, Asn (o Asp)	C1A	Papaína (<i>Carica papaya</i>)
	C1B	Bleomicina hidrolasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	C2	Calpaína 2 (<i>Homo sapiens</i>)
	C6	Proteinasa de potivirus (virus Y de papa)
	C7	Endopeptidasa p29 del virus del tizón del castaño (<i>Cryphonectria hypovirus</i>)
	C8	Endopeptidasa p48 del virus del tizón del castaño (<i>Cryphonectria hypovirus</i>)
	C9	Endopeptidasa nsP2 del virus Sindbis (<i>Sindbis virus</i>)
	C10	Streptopapaína (<i>Streptococcus pyogenes</i>)
	C12	Ubiquitina C-terminal hidrolasa Uch-L1 (<i>Homo sapiens</i>)
	C16A	Endopeptidasa 1 del coronavirus de la hepatitis de ratón
	C16B	Endopeptidasa 2 del coronavirus de la hepatitis de ratón
	C19	Proteasa 14 específica para ubiquitina (<i>Homo sapiens</i>)
	C21	Endopeptidasa de timovirus (virus del mosaico amarillo del nabo)
	C23	Endopeptidasa del carlavirus (virus que ataca el tallo de manzana)
	C27	Endopeptidasa del virus de la rubéola
	C28	L proteinasa del virus de la aftosa
	C31	α-Endopeptidasa del arterivirus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
	C32	Proteinasa cisteínica del virus de la arteritis equina
	C33	Proteinasa cisteínica del arterivirus equino Nsp2
	C34	Endopeptidasa del clostrovirus (virus de la mancha de la hoja clorótica de manzana)
	C35	Endopeptidasa de capillovirus (virus que produce canales en el tallo de manzana)
	C36	Endopeptidasa del furovirus de la necrosis amarilla de las nervaduras de remolacha
	C39	Peptidasa procesadora de bacteriocina (<i>Pediococcus acidilactisi</i>)
	C42	Endopeptidasa del virus de la remolacha amarilla
	C47	Stafoapaína (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	C51	D-Alanil-Glicil endopeptidasa (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	C54	Peptidasa Aut2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	C58	Peptidasa Yop T (<i>Yersinia pestis</i>)
Subclan PA (C) Residuos catalíticos: His, Cys	C3A	Picornaina 3C del virus de la poliomielitis tipo 1
	C3B	Picornaina 2A del virus de la poliomielitis tipo 1
	C3C	Picornaina 3C del virus de la aftosa
	C3D	Picornaina 3C del comovirus del mosaico de garbanzo

	C3E	Picornaina 3C del virus de la hepatitis A
	C3F	Picornaina 3C del paraecovirus 1 humano
	C3G	Endopeptidasa del virus del tungro del arroz
	C4	Endopeptidasa de inclusión nuclear (virus de la lesión de ciruela)
	C24	Endopeptidasa 3C del virus virus de la enfermedad hemorrágica del conejo
	C30	Endopeptidasa tipo picornaina 3C del coronavirus de la hepatitis de ratón
	C37	Peptidasa procesadora del virus Southampton
	C38	Peptidasa procesadora del virus de la mancha amarilla de la pastinaca
CD	C11	Clostripaina (<i>Clostridium histolyticum</i>)
Residuos catalíticos:	C13	Legumaina (<i>Canavalia ensiformis</i>)
His, Cys	C14	Caspasa 1 (<i>Rattus norvegicus</i>)
	C25	Gingipaina R (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	C50	Separasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
CE	C5	Adenaina (adenovirus humano tipo 2)
Residuos catalíticos:	C48	Endopeptidasa Ulp1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
His, Asp (o Asn), Gln, Cys	C55	Proteasa YopJ (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)
	C57	Peptidasa procesadora del virus 17 de vaccinia
CF	C15	Piroglutamil-peptidasa I (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)
Residuos catalíticos:		
Glu, His, Cys		
CH	C46	Proteína de Hedgehog (<i>Drosophila melanogaster</i>)
Residuos catalíticos:		
Cys, Thr, His		
Subclan PC (C)	C26	γ -Glutamil hidrolasa (<i>Rattus norvegicus</i>)
Residuos catalíticos:	C56	PfpI endopeptidasa (<i>Pyrococcus furiosus</i>)
Cys, His		
CX	C40	Dipeptidil-peptidasa VI (<i>Bacillus sphaericus</i>)
Residuos catalíticos:	C41	Cistein proteinasa del virus de la hepatitis E
no aplicable	C53	Endopeptidasa Npro de pestivirus (virus de la fiebre clásica de cerdo)

La primera peptidasa cisteínica claramente reconocida como tal fue la papaína y a partir de ella se construyó el clan CA. Se han determinado las estructuras cristalinas de la papaína y de varias peptidasas de la familia C1, en las cuales los residuos catalíticos fueron identificados como Cys, His y

Asn, encontrándose en este orden en la secuencia. Un cuarto residuo, una glutamina (Gln) precediendo a la Cys catalítica, es también esencial para la actividad catalítica, que ayuda a la formación del “agujero oxianiónico”, un centro electrofílico que estabiliza un intermediario tetraédrico.

El clan CA contiene 28 familias (Tabla 1.1.3), algunas de las cuales han sido incluidas en el mismo en base a la similitud de sus estructuras cristalográficas (familias C2, C10, C12, C19, C28 y C47). Las otras familias son asignadas al clan CA en base a los motivos presentes alrededor de los residuos catalíticos. Como ya se ha mencionado, además de la Cys158 y de la His292 de la diada catalítica (numeración de la pre-propapaína), son importantes otros dos residuos para la catálisis en la papaína y otras enzimas de su familia, la glutamina (Gln) en posición 152 que ayuda a la formación del “agujero oxianiónico”, un centro electrofílico que estabiliza al intermediario tetrahédrico y la asparagina (Asn) en posición 308, la cual orientaría el anillo imidazólico de la His catalítica. En algunas familias (C12, C19, C28 y C39) la Asn es reemplazada por ácido aspártico (Asp). El orden de estos residuos en la secuencia es Gln, Cys, His, Asn / Asp; en la papaína madura la numeración correspondiente es Gln19, Cys25, His159 y Asn175. La cisteína catalítica normalmente es seguida por un aminoácido hidrofóbico aromático, aunque en algunas peptidasas de la familia C2 y en todas las de la familia C12 es la glicina la que ocupa esta posición.

1.1.7. Rol fisiológico de enzimas proteolíticas en los vegetales

Las enzimas proteolíticas están intrincadamente implicadas en muchos aspectos fisiológicos de las plantas, cumpliendo un rol multifuncional. Por una parte, ellas son necesarias para el recambio de proteínas, lo cual constituye un componente fundamental en el desarrollo de la planta. Así, la degradación de proteínas dañadas, mal plegadas y las que son potencialmente dañinas constituye una fuente de aminoácidos libres que son requeridos para la síntesis de nuevas proteínas. Además, la proteólisis selectiva de proteínas reguladoras controla aspectos claves del crecimiento, desarrollo y defensa.

Los proteasas son, por otra parte, también responsables de modificaciones postraduccionales de proteínas por proteólisis limitada aplicada en sitios muy específicos de la proteína blanco; de esta manera se produce la activación de proenzimas, el ensamblaje apropiado de proteínas y su direccionamiento hacia distintos compartimientos celulares, así como el control de la actividad de enzimas, proteínas reguladoras y péptidos. De este modo, las proteasas están implicadas en todos los aspectos del ciclo de vida vegetal, desde la germinación de la semilla hasta la senescencia.

En células eucarióticas la proteólisis es llevada a cabo principalmente en estructuras citoplasmáticas denominadas proteasomas. Las proteínas que deben degradarse son previamente reconocidas y marcadas con ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos que al unirse a ellas las dirige y facilita su ingreso al proteasoma, donde luego son hidrolizadas (Goldberg *et al.*, 2001). Esta vía degradativa actúa en procesos como la embriogénesis, la fotomorfogénesis, los ritmos circadianos, el desarrollo de las flores y de los tricomas, así como la señalización hormonal, como ocurre en las respuestas a auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y jasmonatos. El sistema ubiquitina-proteasoma, sin embargo, no es el único camino proteolítico potencialmente implicado en la regulación de crecimiento y desarrollo de plantas. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, además de los 1300 genes implicados en el camino ubiquitina-proteasoma se han encontrado más de 600 genes de proteasas que pueden contribuir al recambio de proteínas y al control de su vida media y función (Schaller, 2004).

El análisis de los datos completos en alrededor de cien genomas ha demostrado que aproximadamente un 2% de todos los productos génicos son peptidasas, evidenciándose así que se trata de uno de los grupos funcionales de proteínas más grandes e importantes (Barrett *et al.*, 2004).

Estas enzimas normalmente se encuentran en cantidades relativamente bajas y a menudo son difíciles de detectar, aunque la presencia de cantidades extremadamente altas de enzimas proteolíticas en algunos tejidos es una característica de ciertas familias (Caricaceae, Bromeliaceae, Moraceae). Ellas

podrían actuar como alomonas, en defensa contra agentes patógenos, parásitos y herbívoros (Dussourd, 1993).

Aparentemente, diferentes recursos genéticos han sido utilizados en un proceso de convergencia evolutiva para la sobreproducción y acumulación de proteasas en diferentes familias vegetales. A esta clase de enzimas que se producen en cantidades que exceden el potencial necesario para el recambio proteico se las denomina “proteasas no dispensables” o “proteasas secundarias”, en obvia analogía con los metabolitos secundarios de las plantas, y estarían destinadas a interactuar con otras especies vegetales o animales con funciones de protección o de defensa. Entre las proteasas altamente abundantes en látex, en tejidos vegetativos y en frutos se encuentran fundamentalmente las proteasas cisteínicas y las serínicas. Las proteasas presentes en el látex de algunas especies representan más del 50% del total de las proteínas. Ciertos frutos de diferentes familias son también extraordinariamente ricos en proteasas. En todos estos casos las actividades proteolíticas detectadas son al menos dos órdenes de magnitud mayores que las actividades encontradas en tejidos comparables de la mayoría de otras plantas (Glazer & Smith, 1971). Tanto en partes vegetativas como en frutos de varias especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae se encuentran grandes cantidades de enzimas proteolíticas. A estas proteasas también se las llamó “proteínas prescindibles” (Adams & Rinne, 1981). Según Boller (1986), la sorprendente similitud bioquímica de las proteasas cisteínicas muy abundantes no indicaría un ancestro común, sino más bien una convergencia evolutiva como resultado de una función defensiva común. En efecto, es de esperar que aquellas proteasas que se acumulan para propósitos defensivos presenten una elevada estabilidad, una amplia especificidad de sustrato y la falta de una tendencia autolítica. Estas propiedades, características indispensables para la acción de estas enzimas, las distingue de otras proteinasas, como por ejemplo las que actúan en el proceso de germinación.

A continuación se mencionan algunos de los procesos más importantes en los que participan las proteasas.

1.1.7.1. Germinación

Las proteínas almacenadas en las semillas son expresadas en tejidos específicos (endosperma o mesófilo del cotiledón), siendo generalmente sintetizadas como precursores que serán procesados antes de su depósito en los cuerpos proteicos. Para ello pareciera que es importante la co-localización en la misma organela de varias peptidasas (Mutlu & Gal, 1999). Recientemente se ha descubierto que las proteasas cisteínicas son las responsables de la degradación y movilización de las proteínas almacenadas (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

1.1.7.2. Senescencia

Es un proceso programado en la vida de las plantas que involucra una serie de cambios enzimáticos y metabólicos que tienen lugar de forma simultánea o secuencial en los diferentes tejidos que envejecen; las proteínas se degradan y sus aminoácidos se transportan y se almacenan en aquellos lugares donde se sintetizarán nuevas proteínas (Dangl *et al.*, 2000).

1.1.7.3. Respuesta de las proteasas cisteínicas al estrés biótico y abiótico

Las proteínas celulares deben ser reestructuradas en respuesta a factores bióticos y abióticos del medio ambiente. Las proteínas dañadas o con plegamiento anómalo son eliminadas a través de la degradación proteica y reemplazadas por proteínas nuevas, tales como las que aparecen por shock térmico (frío o calor), las inducidas por deshidratación y las relacionadas con procesos patológicos.

La degradación de proteínas dañadas o desnaturalizadas por estrés es un proceso que está acoplado con la síntesis de nuevas proteínas, en el que los aminoácidos liberados son reutilizados para la síntesis de proteínas y/o para ajustar la presión osmótica de la célula (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

En hojas de trigo el déficit de agua induce la expresión de proteasas cisteínicas. Lo mismo ocurre como respuesta al estrés biótico en algunos genotipos de maíz, donde se ha detectado la inducción de una proteasa

cisteínica como mecanismo de defensa contra el ataque de insectos, (Pechan *et al.*, 2000).

Las enzimas proteolíticas presentes en vacuolas o en la pared celular de algunas plantas actúan como agentes protectores contra patógenos, parásitos y herbívoros debido a que constituyen la primera línea de defensa contra potenciales patógenos (Bell, 1981; Alvan der Hogrn & Jones, 2004).

1.1.7.4. Adquisición de nutrientes

En las plantas insectívoras se evidencia la participación de proteasas que son capaces de digerir las proteínas de las presas capturadas y de este modo aportan nutrientes a la planta (Boller, 1986).

1.1.7.5. Apoptosis o muerte celular programada

Este proceso funciona como un mecanismo de defensa para la planta, ya que constituye una forma eficaz de destruir células o tejidos no deseados o dañados y prepara los restos para su eliminación rápida, por lo cual contribuye a la construcción y el mantenimiento de los tejidos y por ende del organismo en su totalidad. Se ha encontrado que las proteasas cisteínicas participan activamente de este proceso (Alvan der Hogrn & Jones, 2004; Campbell *et al.*, 2003).

1.1.8 Familia Bromeliaceae

Bromeliaceae es una familia de monocotiledóneas con unos 56 géneros y más de 2700 especies, originarias de América tropical y las Antillas, excepto una especie de *Pitcairnia* oriunda de África Occidental. Es considerada por la mayoría de los taxonomistas como un grupo aparte, en el orden Bromeliales, por ser anatómica y morfológicamente distintiva (Williams, 1978; Bromeliad Society International, 2005).

Los autores modernos dividen Bromeliaceae en tres subfamilias: **Pitcairnioideae**, **Tillandsioideae** y **Bromelioideae**, en base esencialmente en la estructura del aparato reproductor. Las Pitcairnioideae son las menos especializadas y más primitivas de la familia. Casi todas las Pitcairnioideae y varios Bromelioideae son terrestres. Tillandsioideae, aunque poseen

caracteres florales y frutales relativamente primitivos, se caracteriza por presentar tricomas epidérmicos y poseen la morfología y anatomía más avanzada dentro de las Bromeliaceae. La mayoría de sus especies son epifitas, un estilo de vida evolucionado que derivó de la forma de vida terrestre de la mayoría de las plantas con flores. Bromelioideae es la más evolucionada de las tres, según la estructura de sus órganos reproductores. Las relaciones evolutivas entre las tres subfamilias son confusas y contrariamente a lo que muchos han creído, ningún tipo extinguido de Pitcairnioideae puede ser considerado como antepasado de tipos pertenecientes a las otras dos subfamilias (Bromeliad Society International 2005).

Bromelioideae es la subfamilia más diversa, porque tiene el mayor número de géneros, pero por otra parte es la que presenta el menor número de especies. La mayoría de las especies son epífitas y se caracterizan por una forma de rosetón, que en muchas constituye un reservorio de agua. Las flores poseen ovario ínfero. La fruta es una baya, con semillas húmedas que no tienen ningún apéndice; son dispersadas por los pájaros y animales que consumen las frutas. El margen de las hojas es a menudo espinoso (Jardin botanique de Montréal, 2000).

El género **Bromelia** comprende unas 50 especies americanas (Natalucci *et al.* 1988). Son hierbas grandes, terrestres, estoloníferas, con hojas estrechas de bordes espinosos y panículas sobre las hojas en roseta, como vainas o láminas dispuestas en espiral, por lo general en capas, frecuentemente coloreadas en dirección a la base, flores actinomorfas, de tres piezas, caracterizadas por unas escamas foliares exclusivas que tiene la propiedad de retener agua, y fruto en baya o cápsula, carnoso e indehiscente. Son xerofíticas o epifíticas (Strasburger *et al.*, 1981, Trease & Evans, 1991).

Probablemente debido a la poca importancia comercial y la inaccesibilidad de sus especies, Bromeliaceae raramente ha sido estudiada en busca de constituyentes químicos, con la excepción de *Ananas comosus* L. (piña, primera especie conocida en Europa, llevada por Cristóbal Colón en 1493) y

Tillandsia usneoides L. (guajaca). Contados estudios han sido llevados a cabo sobre otras especies de Bromeliaceae. Se ha reportado la presencia común de ácidos hidroxicinámicos en las hojas de algunos taxa (Bate-Smith, 1968), muchas especies contienen goma y mucílagos, hay citas de taninos, ácidos fenólicos y derivados, azúcares, hidroxiaácidos, carotenos y enzimas, además de los componentes antes mencionados (Trease & Evans 1991, Correa & Bernal 1990, Takata & Scheuer 1976, Gortner & Kent 1958, Jardin botanique de Montréal 2000).

1.1.9. *Bromelia hieronymi* Mez

La Argentina es uno de los países que cuenta con mayor cantidad de regiones fitogeográficas por su amplia variedad de climas. Se conforman así múltiples ecosistemas que han sido plasmados hasta ahora en 340 áreas protegidas, cubriendo más de 15 millones de hectáreas, con más de 300 especies de aves, más de 100 especies de mamíferos y miles de vegetales (Patrimonio natural Argentina, 2003).

El **Chaco** es el segundo ecosistema en orden de importancia en América Latina en términos de superficie (después de la Amazonia) y es el bosque seco más importante del continente. Con una superficie de algo más de un millón de km², la Argentina tiene casi el 50%, repartiéndose el resto entre Paraguay, Bolivia y Brasil. De acuerdo a la pluviometría, en Argentina se divide en tres grandes regiones: el **Chaco Árido** al sudoeste, el **Chaco Húmedo** al este y finalmente el **Chaco Semiárido**, al norte y al oeste del país, con cerca de 31 millones de hectáreas y con precipitaciones anuales entre los 500 y 750 mm, considerada la zona mas característica del Chaco (Karlin, 1994).

La voz **chaguar** es de origen quechua y con ella se designa un conjunto de seis bromeliáceas comestibles y textiles que crecen en esta región. En la zona de influencia guaranítica, reciben el nombre de caraguatá. El chaguar es una planta común del sotobosque y del tapiz vegetal del chaco, y es importante en la conservación del suelo de este frágil ecosistema en creciente proceso de desertificación. Pastor Arenas (1997) señala que de las seis especies de Bromeliáceas, tres son conocidas por el uso textil dado por los indígenas del

Chaco: *Deinacanthon urbanianum* (Mez) Mez, *Pseudananas sagenarius* (Arruda) Camarg. y *Bromelia hieronymi* Mez.

Bromelia hieronymi Mez (Figura 1.1.3) es una planta estolonífera, que forma matorrales y posee filodios enhiestos, glaucos, de punta prolongada y esclerosada, con los bordes armados de aguijones negros y curvos. Las flores miden de 4 a 6 cm de largo y están ubicadas en las axilas de pequeñas brácteas, formando grandes panojas terminales, glabras y purpúreas. Las bayas son fusiformes y fibrosas, de 5 cm de largo por 2 cm de ancho. La especie se extiende desde Paraguay, por Bolivia, hasta el noreste de Argentina, en los campos de vegetación xerófila del chaco semiárido (Natalucci *et al.*, 1985).

El chaguar es una planta alimenticia y textil que ha sido tradicionalmente utilizada por los Wichí, un pueblo de cazadores-recolectores de Argentina. Los criollos lo consideran una plaga, porque abriga culebras y mantiene a distancia el ganado, por las espinas que tiene. Es una planta invasora. Crece en el monte, en la semisombra y a medida que se va reproduciendo forma colonias de distintas edades y tamaños que se denominan chaguarales.

Figura 1.1.3. *Bromelia hieronymi* Mez

1.1.10. Importancia del “chaguar” para la comunidad Wichí (van Dam, 2000)

El **chaguar** es una planta cuya fibra ha sido utilizada desde tiempos inmemoriales por los Wichí, un pueblo de cazadores-recolectores del norte argentino, para confeccionar numerosos objetos de uso doméstico y para sus actividades de subsistencia. Junto con el **wichíthlamtés**, su idioma, el chaguar está en el corazón de su identidad cultural. La ocupación blanca de sus territorios tradicionales a fines del siglo XIX trajo la ganadería extensiva y el obraje maderero. Ambas actividades degradaron el ecosistema en menos de

50 años y arrinconaron a los Wichí en pequeñas aldeas, convirtiéndolos en ocupantes precarios, sin derechos sobre la tierra y modificando sustancialmente su relación con la naturaleza, introduciéndolos marginalmente a una economía de mercado. Misión Chaqueña es uno de estos poblados, uno de los más grandes y prósperos, ya que la gran mayoría logra vivir de la artesanía. Artesanía en base a maderas duras del Chaco sobre todo, pero también artesanía de chaguar, confeccionada por las mujeres. Hoy los Wichí constituyen la población más pobre de la Argentina.

Para recoger el chaguar, las mujeres deben recorrer muchos kilómetros en el monte. En ello se basa la idea cada vez más generalizada entre los técnicos que el chaguar es cada vez más escaso y que una buena alternativa es cultivarlo cerca de los poblados. El proceso para obtener el hilo comienza machacando la fibra con un pedazo de metal y remojándola varias veces en agua, desprendiendo todo el tejido parénquimático adherido, lo cual evita herir las manos durante el hilado. La fibra luego se seca al sol durante uno o dos días hasta que quede bien blanca. El hilado se realiza uniendo varias hebras, y el producto es teñido usando diversos tintes preparados en base a plantas del monte. Finalmente, se hace el tejido usando una aguja, confeccionando canastos, vestimentas, redes de pesca y objetos ornamentales.

Los Wichí no parecen compartir la percepción de creciente escasez del chaguar ni la solución de domesticarlo. El chaguar es un recurso de acceso abierto, sin ningún tipo de norma que regule su uso y aprovechamiento. La compleja relación que la sociedad Wichí establece con la naturaleza y su particular economía de no-acumulación, ha permitido durante siglos el resguardo de un uso sostenible de los recursos con una equidad extrema. Solo existe para ellos un tabú tradicional que evita que el recurso se malgaste o desperdicie.

Aparentemente el régimen de acceso abierto no produce ningún tipo de conflicto ni contribuye a una mayor escasez. La sostenibilidad del recurso peligra por otras razones: una errada política de tierras y la acelerada degradación del ecosistema. Por el lado de la demanda, el factor más

importante es la vigencia de la tecnología tradicional, que exige un gran esfuerzo y laboriosidad de parte del artesano, lo que limita la capacidad de uso de chaguar y eleva los costos del producto.

Durante los últimos años, la comunidad Wichí de Salta realizó acciones legales con pedido de amparo a la justicia por el inminente alambrado y venta de las tierras donde viven, consideradas reserva natural y cuya transferencia con fines productivos fue aprobada por la legislatura provincial (El Día, 2004).

Por ultimo, el análisis de los factores que condicionan tanto la oferta como la demanda de chaguar, y como resultado la posibilidad de un uso sostenible del mismo, revela que todo es de una gran variabilidad e incertidumbre. En especial, la suerte de los Wichí, un pueblo en transición que, desde la llegada del hombre blanco hace un siglo y medio, tiene grandes dificultades en adaptarse a estos permanentes y violentos cambios. Desde su identidad cultural hoy se resisten y viven marginados, sin saber bien de qué manera pueden aprovechar la sociedad envolvente y la economía de mercado. Estudios sobre la dinámica del chaguar, su relativa escasez o abundancia, su manejo y productividad serán importantes en el futuro, dada la importancia que tiene la planta para el pueblo Wichí y los demás aborígenes chaqueños.

1.1.11. Usos industriales de las enzimas proteolíticas en la actualidad

Como ya fue mencionado, el uso de enzimas en biotecnología comenzó antes de comprenderse lo que sucedía a nivel molecular. Un mayor entendimiento aportado por el avance de las ciencias y la tecnología facilitó la subsecuente utilización de aislados enzimáticos para propósitos industriales específicos. La Tabla 1.1.4 muestra los primeros productos enzimáticos que salieron al mercado en el siglo pasado (Uhlig, 1998).

Tabla 1.1.4. Primeras empresas productoras de enzimas comerciales.

Productor	Año	Proceso o producto comercial
Taakmine	1894	Mezcla de carbohidrasas y proteasas proveniente de una preperación de hongos
Boiding	1895	Proceso de manufactura de alcohol por fermentación a partir de la sacarificación de polisacáridos de cereales (amiloproceso)
Röhm	1907	Utilización de enzimas pancreáticas en la manufactura de cueros y en el degomado de la seda cruda.
Röhm	1913	Empleo de enzimas pancreáticas en detergentes
Jaag	1959	Desarrollo de un detergente con proteasas de <i>Bacillus subtilis</i>
Wallerstein	1911	Uso de papaina para estabilizar cerveza
Röhm y Haas	1917	Empleo de proteasas fúngicas de cultivos semisólidos en manufactura de cueros
Underkofler	1958	Publicación de una lista comercial de algunas enzimas industriales disponibles en el mercado
Novo Nordisk	1960	Uso proteasa alcalina bacteriana como detergente

De esta manera aparecieron en el mercado amilasas, celulasas, enzimas que degradan lignocelulosa, pectinasas, proteasas, lipasas, ciclodextringlucosiltransferasas, penicilinasas y fitasas. Todas son enzimas que despolimerizan grandes moléculas por hidrólisis. Son producidas industrialmente en grandes cantidades en el orden de miles a cientos de miles kilogramos por año y son procesadas sólo en un grado limitado. Un factor importante a considerar es el costo de la producción para que sea redituable al productor. La disponibilidad de tales enzimas ha facilitado también el desarrollo de numerosos procesos biotecnológicos adicionales, los que producen un amplio rango de mercaderías.

A finales de la década del 90 los valores de venta mundial de enzimas industriales se elevaron a 1,5 billones de dólares más del doble del valor registrado a comienzos de la década. Este dato lo podemos apreciar en el gráfico de la Figura 1.1.4, donde se observa el crecimiento del mercado mundial de enzimas industriales, en términos de ventas globales anuales entre los años 1970 y 2000.

Figura 1.1.4. Crecimiento del mercado mundial de enzimas en el periodo 1970-2000

Las proteasas constituyen el 48% del mercado de enzimas, seguidas por diversas enzimas involucradas en el procesamiento de carbohidratos (Figura 1.1.5).

Figura 1.1.5. Porcentajes del valor de cada enzima comercializada calculados en base al monto total de todas las enzimas del mercado mundial (1,5 billones de dólares, año 2000)

Entre las empresas productoras de enzimas industriales más destacadas se encuentra Novo Nordisk, de Dinamarca, con más de 600 productos enzimáticos que pueden emplearse en la preparación de detergentes, en la producción de alimentos para animales, en la producción de etanol, vino, cerveza, pan y jugos de frutas y en el tratamiento del cuero, papel y fibras textiles. Otras empresas importantes son Gist-Brocades de los Países Bajos,

Genencor Inc. de Estados Unidos de Norteamérica, Solvay de Bélgica y Danisco Cultor de Finlandia.

Las proteasas, que representan alrededor del 50% de las enzimas comercializadas, poseen múltiples usos industriales. En los siguientes párrafos se describen algunas de las aplicaciones más importantes de las mismas (Walsh, 2004).

1.1.11.1. Componente de detergentes

Es el destino mayoritario de las proteasas producidas comercialmente. Fueron introducidas en detergentes a fines del siglo XIX, aunque pocos productos resultaron exitosos al principio porque eran inactivadas por otros componentes del detergente o durante el proceso de lavado. La suciedad de la ropa está formada por materia inorgánica del medio y materia orgánica constituida por proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos. Las manchas de proteínas son difíciles de remover de las fibras de tela porque frecuentemente están desnaturalizadas y forman agregados durante el lavado. El uso de proteasas facilita su eliminación.

1.1.11.2. Manufactura de quesos

La quimosina, una proteasa presente en el cuajo bovino, es responsable de la coagulación de la leche en la primera etapa de la manufactura de quesos. Su acción principal es la hidrólisis específica de la kappa caseína, lo cual desestabiliza la micela proteica y promueve su precipitación formando la cuajada. Luego se elimina el suero sobrenadante y la cuajada es procesada. La quimosina tradicionalmente se obtiene del cuarto estómago de los terneros, lo que resulta costoso y éticamente cuestionado por algunos sectores sociales. Actualmente Gist Brocades ha desarrollado una quimosina recombinante (Maxiren) producida por ingeniería genética a partir de una cepa de *Kluyveromyces lactis* y es muy utilizada en la industria. Por otra parte, también se utilizan otras proteasas en reemplazo de la quimosina, de origen vegetal o fúngico, lo que permite la obtención de quesos con características organolépticas diferentes.

1.1.11.3. Tiernización de carnes

La dureza de la carne está dada por la composición del tejido conectivo. Las moléculas de colágeno en animales jóvenes son poco entrecruzadas y se desprenden y gelatinizan fácilmente durante la cocción. Por este motivo la carne de animales jóvenes es tierna. Cuando los animales envejecen, una cantidad adicional de colágeno se deposita en su tejido conectivo y las moléculas comienzan a entrecruzarse más. Durante la cocción la solubilización del colágeno es parcial y la carne es más dura. La terniza de la carne puede mejorar durante el proceso de acondicionamiento o maduración realizado guardando la res fresca en una habitación a 10°C por varios días. En este período actúan diversas enzimas hidrolíticas, entre ellas algunas proteasas que degradan la estructura muscular. La tiernización puede llevarse a cabo artificialmente empleando papaína, que degrada las miofibrillas y las proteínas del tejido conectivo. Esta acción ocurre durante la cocción. La preparación de papaína en polvo se encuentra disponible en el mercado y puede frotarse sobre la carne antes de cocinar, si bien esto trae sólo acción sobre la superficie. Otras enzimas vegetales utilizadas para el mismo fin son la ficina y la bromelina.

1.1.11.4. Producción de cueros

La manufactura de cueros es un proceso que implica varias etapas, en algunas de las cuales pueden emplearse ciertas enzimas industriales. Durante el curtido es necesario remover los lípidos, el agua y algunas proteínas superficiales de la piel, y además producir la disrupción parcial del colágeno y su subsecuente entrecruzamiento. También se deben eliminar pelos para obtener el producto final. Algunas proteasas son empleadas durante la manufactura del cuero (proteasas pancreáticas, vegetales y fúngicas); las proteasas vegetales más utilizadas son la papaína y la bromelina. En el proceso se emplean además lipasas y carbohidrasas. De esta manera las enzimas ayudan a degradar y a remover compuestos no deseados, obteniéndose adicionalmente un efecto beneficioso: la consiguiente reducción

del tratamiento químico requerido, hecho que provoca el beneficio ambiental de generar bajas cantidades de desechos químicos.

1.1.11.5. Síntesis de aspartamo

El aspartamo es un dipéptido formado por un residuo de ácido aspártico y el metil éster de la fenilalanina. Es 200 veces más dulce que el azúcar de mesa y bajo en calorías. La dulzura depende de la configuración L de los 2 aminoácidos y puede ser sintetizado ya sea química o enzimáticamente. La síntesis enzimática conserva automáticamente la estereoespecificidad, lo que es muy favorable. La metaloproteasa neutra termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus* es utilizada inmovilizada en la producción de aspartamo. En condiciones cinéticamente controladas la proteasa sintetiza péptidos en lugar de degradarlos, como lo hace en condiciones fisiológicas.

1.1.11.6. Cervecería y panificación

Otra aplicación importante de las proteasas es el uso que se hace de ellas en la industria de la cerveza, con el objeto de proporcionar a la misma una buena estabilidad coloidal a bajas temperaturas, es decir impedir que como consecuencia del enfriamiento se manifieste turbiedad o que sedimenten componentes que se mantenían solubles a temperatura ambiente. El fenómeno anterior es debido a la presencia de un complejo tanoproteico (tanino-proteína) que resulta soluble en caliente o a temperatura ambiente, pero que tiene tendencia a precipitar en frío. Tanto las proteínas como los compuestos polifenólicos provienen de las materias primas usadas en la preparación de la cerveza (cebada y lúpulo). Un modo de resolver el problema es impedir la formación del complejo o digerirlo parcialmente luego de formado; en este último caso se usan enzimas proteolíticas, en especial papaína, aunque también se han ensayado ficina, bromelina y pepsina. Debe tenerse en cuenta que la hidrólisis requiere ser controlada, ya que la cerveza debe mantener una adecuada proporción de proteína coloidal, necesaria para que la misma tenga "cuerpo" y produzca espuma abundante y duradera.

Por otra parte, las proteasas fúngicas se aplican en la industria panadera. Las de *Aspergillus* sp., son empleadas para modificar los componentes

proteicos básicos y así alterar la textura de la masa. El gluten representa la mayor fracción proteica formada por complejos de gliadinas y glutelinas. Cuando las proteínas se humedecen durante el preparado de la masa el gluten une una porción de agua y se expande para formar una estructura en red, lo que le da una resistencia al alargamiento. La adición de niveles bajos de una proteasa fúngica neutra derivada de *Aspergillus orizae* provoca una limitada degradación de la red de gluten, con lo que se reduce la resistencia al alargamiento. Esto retiene más dióxido de carbono en la masa producida por la fermentación de la levadura, influyendo en la estructura de los poros y ayudando a levar uniformemente la masa durante la panificación.

1.1.11.7. Degradación enzimática de proteínas de desecho

La producción de alimentos y otros procesos industriales generan grandes cantidades de proteínas de desecho. Algunos ejemplos son las proteínas constituyentes de plumas, pelos, lana, sangre, huesos, procesamiento de soja y otras semillas y agua de cola de la industria pesquera. Algunos de estos materiales pueden ser efectivamente reciclados y empleados en la elaboración de alimentos balanceados para animales o incluso para el hombre. Para obtener un producto de buena calidad el material de partida tiene que ser eficientemente esterilizado para prevenir la potencial transmisión de enfermedades. Para esto se requiere equipamiento e instalaciones adecuadas, y tener en cuenta el gasto de energía para el proceso de cocción. Como alternativa pueden emplearse enzimas degradativas, lo cual disminuye los costos, aumentando también la gama de productos obtenidos a partir de los desechos.

1.1.11.8. Obtención de proteínas modificadas para la industria alimentaria

Otro importante uso de estas enzimas es la obtención de **hidrolizados proteicos** que son empleados en la producción de otros alimentos.

La hidrólisis parcial de las proteínas provoca cambios en sus propiedades químicas, físicas, biológicas e inmunológicas. La hidrólisis de proteínas alimentarias es llevada a cabo por variadas razones: mejoramiento de las

características nutricionales, retardo en el deterioro, modificación de diferentes propiedades funcionales (solubilidad, capacidad de formación de espuma, capacidad coagulante y emulsificante), obtención de péptidos y aminoácidos, prevención de interacciones indeseadas, cambios de sabores y aromas y remoción de factores inhibitorios o tóxicos. La hidrólisis enzimática es preferida a la obtenida por métodos químicos porque produce hidrolizados conteniendo mezclas peptídicas bien definidas, evita la destrucción de los L-aminoácidos y la formación de sustancias tóxicas como la lisin-alanina (Lahl & Brown, 1984; Mahmoud, 1994; Pedersen, 1994).

Los hidrolizados proteicos se utilizan como fuente de nitrógeno en pacientes con mala función gastrointestinal (fibrosis quística y pancreatitis). Otros usos terapéuticos son como estimuladores de la absorción intestinal (los caseín-fosfopéptidos) y de la movilidad gastrointestinal (secuencia opioide de la β -caseína). Otra de las características de los hidrolizados es su mayor absorción gastrointestinal en relación a la proteína completa, por lo que pueden utilizarse en dietas para ancianos, deportistas y control del peso corporal (Frøkjær, 1994; Steinke *et al.*, 1992).

Los hidrolizados proteicos poseen alta solubilidad bajo condiciones ácidas y tratamientos térmicos y forman soluciones con una viscosidad muy baja, incluso a altas concentraciones. Estas dos propiedades, sumadas al actual desarrollo tecnológico que ha hecho posible la producción de hidrolizados con una alta palatabilidad, los convierte en fuentes potenciales para el enriquecimiento de bebidas ligeras y jugos

Algunos alimentos formulados en base a hidrolizados proteicos son útiles para el control de alergias alimenticias (Cordle, 1994), que son provocadas por una respuesta inmunológica anormal a componentes alimenticios, en general proteínas. Algunas proteínas específicas, que forman parte de numerosos alimentos, son alergénicas para individuos sensibles, lo cual significa un peligro si se ingieren, incluso en pequeñas cantidades (Schmidl *et al.*, 1994).

1.1.11.9. Industria farmacéutica

Las enzimas proteolíticas han sido utilizadas en tratamientos postquirúrgicos para el desbridamiento de heridas (Mantell, 1985), tarea realizada tradicionalmente con bisturí, tijeras u otros instrumentos de cirugía como al realizado con láser.

Un método más preciso e indoloro lo constituye el tratamiento de las escaras con enzimas proteolíticas. En este caso se utilizan pomadas con colagenasa de origen bacteriano (*Clostridium histolyticum*) asociada a otras proteasas.

En el tratamiento de las quemaduras, donde la eliminación del tejido necrosado es imperioso para favorecer la regeneración de los tejidos, han comenzado a utilizarse también enzimas proteolíticas, esencialmente papaína.

Las proteasas se utilizan en clínica médica gastroenterológica como coadyuvantes en el tratamiento de trastornos digestivos, en este último caso asociadas a otras enzimas hidrolíticas. Pero la aplicación más trascendente de las mismas obedece a sus probadas propiedades antiinflamatorias (Netti *et al.*, 1972), siendo papaína, bromelina (Gregory & Kelly, 1996) y ficina las proteasas más ampliamente utilizadas en tal sentido.

Informaciones relativamente recientes han dado cuenta de una presunta actividad citostática de la bromelina. Su actividad antitumoral y antimetastásica fue comprobada en estudios realizados en un modelo murino (Beuth & Brown, 2005). Actualmente se sabe que puede ser utilizada como terapia complementaria contra ciertos tumores, ya que actúa como un inmunomodulador aumentando la inmunocitotoxicidad de los monocitos contra células tumorales en los pacientes e induciendo la producción de citokinas, como el factor de necrosis de tumoral y diferentes interleukinas (Maurer, 2001).

Mucho más recientemente se ha ensayado en el tratamiento de hernias de discos intervertebrales la aplicación local de quimopapaína inyectable, que actuaría hidrolizando los proteoglicanos presentes en los núcleos pulposos (quimionucleolisis) responsables de la afección (Walreavens *et al.*, 1993).

1.1.11.10. Industria textil

A los efectos de aumentar la resistencia a la tracción y a la abrasión, las fibras textiles son **encoladas** con una preparación de polímeros (colas). Con posterioridad al hilado se debe proceder a **desencolar** los hilos para restituir las propiedades de los mismos. Las fibras artificiales son habitualmente impregnadas con gelatina y para su desencolado (Sicard, 1982) se usa la proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (neutrassa) o la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (alcalasa).

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Material vegetal

Se utilizaron frutos de *Bromelia hieronymi* Mez (“cháguar”) procedentes de Santiago del Estero (Argentina). El material vegetal utilizado fue colectado por el Ingeniero Agrónomo Lucas Roic de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, en las proximidades de dicha ciudad. Las infrutescencias (Figura 1.2.1) contenían frutos, en su mayoría, en estado inmaduro. La recolección fue realizada en el mes de abril de los años 2001, 2002 y 2005. En el laboratorio los frutos (Figura 1.2.2) fueron separados de las infrutescencias, lavados con agua corriente para retirar

Figura 1.2.1. Infrutescencia de *Bromelia hieronymi* Mez.

Figura 1.2.2. Corte longitudinal de un fruto.

suciedad y gomas, enjuagados con agua destilada, secados al aire y envasados herméticamente. Luego fueron almacenados a -20°C .

1.2.2. Obtención del extracto crudo

Se pesaron aproximadamente 50 g de frutos congelados, conteniendo cáscara y semillas (4 ó 5 frutos). Luego fueron cortados en pequeños trozos con cuchillo y triturados en una procesadora durante 1 min, en intervalos de 10 s con igual tiempo de espera, con 250 ml de buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,0 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM. El agregado de EDTA es necesario para evitar la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{+2} en su sitio catalítico (Anderson, 1968) y la cisteína contribuye a mantener el ambiente reductor. El valor de pH elegido queda fuera del rango de pH óptimo de la muestra, lo cual minimiza la autodigestión de la misma. La preparación

obtenida se filtró con gasa doble para eliminar restos vegetales y otros materiales insolubles y se centrifugó durante 30 min a 4°C y 16.000 *g*. El precipitado fue desechado y el sobrenadante, denominado **extracto crudo**, se fraccionó y almacenó a -20°C. Cada una de las etapas mencionadas fue realizada cuidadosamente sobre baño de hielo para reducir la proteólisis y conservar la muestra con la mayor actividad posible (López *et al.*, 2000).

1.2.3. Precipitación acetónica y etanólica fraccionada: obtención de extractos parcialmente purificados

El objetivo de esta técnica fue determinar el mínimo volumen de solvente precipitante necesario para obtener un extracto parcialmente purificado que retuviese el máximo valor de actividad enzimática respecto al extracto crudo, eliminando compuestos fenólicos, glúcidos y proteína no activa. Esto se realizó por precipitación fraccionada utilizando acetona o etanol. Para ello se colocaron alícuotas de 5 ml de extracto crudo en tubos de centrifuga en baño de hielo y se agregaron gota a gota y con agitación 0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 volúmenes de solvente (acetona o etanol) preenfriado a -20°C a efectos de minimizar la desnaturalización proteica. Los tubos fueron colocados en cámara fría a 4°C durante 30 min y luego se centrifugaron a 16.000 *g* durante 30 min a la misma temperatura. Se descartaron los sobrenadantes, los precipitados se colocaron 20 min en desecador al vacío para eliminar restos de solvente y luego se redisolviéron en 5 ml de buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,0 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM, manteniéndose el sistema a 0°C (Scopes, 1984). En cada una de las suspensiones obtenidas se determinó el contenido de proteínas e hidratos de carbono y la actividad proteolítica. En base a los resultados obtenidos se seleccionó la preparación enzimática parcialmente purificada a ser utilizada en los posteriores ensayos de caracterización de la enzima.

1.2.4. Determinación del contenido de proteínas

Se utilizó el método de Bradford (1976), basado en que la unión del colorante Coomassie Blue G-250 a la proteína produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). El método resulta especialmente apto para la valoración de proteínas en extractos vegetales, que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con el clásico método de Lowry (Peterson, 1979).

Para poder cuantificar el ensayo se realizaron curvas de calibración utilizando como patrón seroalbúmina bovina en el rango de 100–1.000 µg/ml para el ensayo estándar (macrométodo) y en el de 10–100 µg/ml para el microensayo (micrométodo). Los volúmenes de reactivos utilizados en el ensayo se observan en la Tabla 1.2.1. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y el ensayo correspondiente al blanco de reactivos, donde la muestra fue reemplazada por buffer, también se efectuó por triplicado.

Tabla 1.2.1. Determinación de proteínas por el método de Bradford.

Tubo de reacción	Macrométodo	Micrométodo
Muestra	50 µl	250µl
Reactivo de Bradford	2,5 ml	2,5 ml
Agitar en vórtex, leer la absorbancia a 595 nm a los 10 min		

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

1.2.5. Determinación del contenido de carbohidratos

El método empleado fue el de Dubois *et al.* (1956) basado en la formación de un compuesto coloreado con máximo de absorbancia a 490 nm que se forma como resultado de la reacción del fenol con los glúcidos, en presencia de ácido sulfúrico concentrado. El color es estable por varias horas. Los componentes y volúmenes de la reacción se encuentran detallados en la Tabla 1.2.2. La curva de calibración se confeccionó utilizando glucosa como patrón

en el rango de 10–100 $\mu\text{g/ml}$. Las determinaciones fueron efectuadas por cuadruplicado, tanto para las muestras como para los blancos.

Tabla 1.2.2. Determinación de carbohidratos por el método de Dubois.

Reactivos	Volumen
Muestra	1 ml
Fenol al 80%	0,5 ml
H ₂ SO ₄ concentrado	2,5 ml
Dejar 10 minutos en reposo. Agitar y llevar a baño de agua a 25–30°C por 10–20 minutos. Leer la absorbancia a 490 nm	

1.2.6. Determinación de la actividad proteolítica

1.2.6.1. Sustrato proteico: caseína

Para la determinación de la actividad caseinolítica se preparó una solución de caseína al 1% en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0, calentando a ebullición durante 20 min. Luego de filtrar en caliente y enfriar la suspensión se agregó cisteína (concentración final 15 mM) y se verificó que el valor de pH se mantuviera en 8,0. Luego se llevó a cabo el ensayo en un baño termostatzado a 37°C. La mezcla de reacción se preparó agregando 1,1 ml de solución de caseína a 0,1 ml de solución de la enzima. Se adicionaron 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% para detener la reacción. Los ensayos en blanco fueron realizados inactivando la enzima con TCA previo al agregado del sustrato. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y se detuvieron a diferentes tiempos según el caso. Luego se llevaron todos los tubos a 4°C durante 20 min para facilitar la precipitación de la proteína remanente y finalmente fueron centrifugados a 4000 *g* durante 20 min, determinándose la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm en una celda de 1 cm de paso utilizando un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453E (López *et al.*, 2000).

Siguiendo el criterio de Sarath *et al.* (1989) para expresar la actividad enzimática cuando se utilizan sustratos proteicos, se definió para este caso una unidad arbitraria (Unidad caseinolítica, Ucas), que corresponde a la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de

absorbancia a 280 nm al cabo de un min. Las medidas de actividad se determinaron dentro del rango de linealidad (actividad vs. tiempo).

1.2.6.2. Sustratos sintéticos: N- α -CBZ-p-Nitrofenil ésteres de aminoácidos

La actividad de las proteasas sobre N- α -CBZ-L-aminoácidos p-nitrofenil ésteres fue ensayada sobre los derivados de Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr y Val para determinar las preferencias de la muestra. El uso de este tipo de sustratos en los cuales están bloqueados tanto el grupo α -NH₂ como el α -COOH del resto aminoacídico (en el último caso con un grupo cromóforo), permite determinar la actividad endoesterásica relativa respecto al aminoácido que aporta el grupo carboxilo (Silverstein, 1974).

La mezcla de reacción para cada ensayo fue preparada como se muestra en la Tabla 1.2.3. El ensayo se llevó a cabo a 37°C y el progreso de la reacción fue seguido midiendo la absorbancia del producto a 405 nm a intervalos de 5 s durante 3 min. En este caso una unidad enzimática (Ucbz) fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por min a 37°C y pH 8,0 y se realizó a tal fin una curva de calibración con p-nitrofenol.

Tabla 1.2.3. Ensayo de actividad sobre N- α -CBZ-L-aminoácidos p-nitrofenil ésteres.

Tubo de reacción	Muestra	Blanco
Sustrato 1 mM (en acetonitrilo)	50 μ l	50 μ l
Buffer TRIS-HCl 0.1 M, pH 8,0, EDTA 2 mM	1,85 ml	1,85 ml
Muestra	0,1 ml	-
Agua	-	0,1 ml

Lectura de la absorbancia a 405 nm cada 5 s durante 3 min

1.2.7. Efecto del tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas

El extracto crudo de *Bromelia hieronymi* se conservó a -20°C fraccionado convenientemente de acuerdo al uso posterior planificado. Para determinar el efecto del tiempo de almacenamiento se fraccionó un extracto crudo en alícuotas de 1 ml antes de congelar. Luego de transcurridos 2, 7, 15, 35, 45, 55, 75, 100 y 120 días fueron descongeladas dos muestras correspondientes a

cada tiempo de conservación, determinándose la actividad caseinolítica residual en cada caso, como se indicó en 1.2.6.1.

1.2.8. Identificación del tipo de proteasas presentes por medio del efecto de inhibidores

Estudios anteriores realizados con extractos de la misma especie indican la presencia de proteasas cisteínicas en ella (Natalucci *et al.*, 1985; Priolo *et al.*, 1991). Con el objeto de confirmar si las proteasas en estudio pertenecen al grupo mencionado se realizaron ensayos de inhibición de la actividad caseinolítica con E-64 y ácido iodoacético, dos inhibidores específicos de las proteasas cisteínicas. Para ello la preparación enzimática se preincubó durante 30 min a 37°C en presencia de E-64 0,1 mM o de ácido iodoacético 0,1 y 1 mM (Salvesen & Nagase, 2001). Finalizada la incubación, se determinó la actividad caseinolítica residual.

1.2.9. Activación con cisteína

Con el objeto de establecer la concentración óptima de cisteína en el medio de reacción para que las proteasas manifiesten su máxima actividad, se realizó un ensayo de actividad caseinolítica como se indicó en 1.2.6.1, pero preparando 6 tubos diferentes del sustrato (solución al 1% de caseína en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0) en los cuales la concentraciones de cisteína fueron 5, 10, 15, 20, 30 y 50 mM. La actividad proteolítica fue determinada según el protocolo ya mencionado, realizándose todas las medidas por triplicado, incluso los blancos de reacción.

1.2.10. Determinación del perfil de pH óptimo

El perfil de pH característico de la preparación enzimática se determinó utilizando caseína como sustrato. El rango de pH ensayado fue desde 6,0 (debido a la escasa solubilidad de la caseína a valores menores) hasta 12,0, utilizando quince valores diferentes de pH a intervalos regulares. En las determinaciones se emplearon soluciones 25 mM de los siguientes buffers: Mes, Mops, Taps, Ampso y Caps (Good & Izawa, 1972) a 37°C.

1.2.11. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica

Si bien la actividad de la mayoría de las enzimas no se ve afectada a valores bajos de fuerza iónica, suele disminuir cuando la concentración de sal se incrementa por encima de 0,2 M (Scopes, 1984). Las determinaciones de actividad proteolítica se llevaron a cabo a 37 °C utilizando como sustrato soluciones al 1% de caseína en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0, cada una conteniendo distintas cantidades de cloruro de sodio disuelto, cuyas concentraciones variaron entre 0 y 2,5 M.

1.2.12. Estabilidad térmica

Con el objeto de determinar el comportamiento de la enzima luego de ser sometida a distintas temperaturas durante tiempos variables, las preparaciones enzimáticas fueron incubadas durante 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90 y 120 min a 37°C, 55°C, 60°C, 65°C y 75°C, a pH 8,0. Finalizado el período de incubación, las muestras fueron mantenidas en un baño de hielo hasta que se midió la actividad caseinolítica residual de manera habitual (1.2.6.1). Posteriormente se confeccionó un gráfico de porcentaje de actividad residual en función del tiempo para cada temperatura.

1.2.13. Actividad caseinolítica en función de la temperatura

En este caso la determinación de actividad caseinolítica se llevó a cabo en baños termostáticos a 37°C, 45°C, 55°C, 65°C y 75°C. A cada una de las temperaturas mencionadas se realizaron grupos de ensayos por triplicado que se detuvieron por el agregado de TCA al 5% luego de 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 16 min respectivamente. Luego de obtener los datos de absorbancia se realizaron curvas de actividad residual en función del tiempo de reacción para cada grupo de ensayos realizados a una temperatura determinada.

1.2.14. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Con la finalidad de determinar el perfil proteico de la muestra y el valor aproximado de las masas moleculares de los polipéptidos presentes en la misma, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Para ello se utilizó un equipo Miniprotean II (Bio-Rad) y se procedió de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970) con modificaciones. Durante el apilamiento (“stacking”) la corriente se mantuvo constante a 40 mA y luego en la etapa de separación (“running”) se llevó a 60 mA durante 40 min. Los geles se prepararon con poliacrilamida al 12,5% y luego de la corrida fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250. Los valores de las masas moleculares se determinaron por comparación con patrones proteicos (LMW markers, Bio-Rad).

1.2.14.1. Tratamiento de las muestras

Las muestras fueron preparadas agregando un volumen de buffer de muestra (Tabla 1.2.4) para electroforesis a un volumen de preparación enzimática. Las de bajo contenido proteico se concentraron por precipitación con cuatro volúmenes de acetona (-20°C) y los precipitados se redisolviaron en buffer de muestra siendo la concentración final de proteína de 1 mg/ml. Fue necesario el agregado de ácido iodoacético (concentración final 1 mM en el buffer de muestra) para evitar la autodegradación.

Las muestras así dispuestas fueron llevadas a ebullición durante 5 min y centrifugadas a 16.000 g.

Tabla 1.2.4. Buffer de Muestra

TRIS	1,57 g
SDS ¹	2 g
Mercaptoetanol	5 ml
Glicerol al 10%	8 ml
Azul de bromofenol	2 mg
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M	
AD ² , c.s.p. ³	100 ml

¹ SDS: Dodecil sulfato de sodio

² AD: Agua Destilada

1.3.14.2. Preparación de los geles

Para moldear los geles se utilizó un soporte provisto por el equipo Mini-Protean II (Bio-Rad). La composición de los sistemas buffer empleados así como la de los geles se indican a continuación en las siguientes tablas:

Tabla 1.2.5. Buffer de los geles de resolución

TRIS	36,3 g g
HCl 1M, c.s.p.	PH final 8,8
AD, c.s.p.	100 ml

Tabla 1.2.6. Buffer de los geles de apilamiento

TRIS	36,3 g g
HCl 1M, c.s.p.	PH final 6,8
AD, c.s.p.	100 ml

Tabla 1.2.7. Gel de resolución (12,5%)

Acril-Bis (30:0,8)	4,15 ml
Buffer de resolución	1,25 ml
SDS al 10%	0,1 ml
AD	4,39 ml
PSA ⁴ al 5%	105 µl
TEMED ⁵	5 µl
Volumen final	10 ml

Tabla 1.2.8. Gel de Apilamiento (5%)

Acril-Bis (30:0,8)	1,16 ml
Buffer de apilamiento	0,87 ml
SDS al 10%	70 µl
AD	4,79 ml
PSA al 5%	105 µl
TEMED	5 µl
Volumen final	7 ml

Se colocaron 5 ml del gel de resolución por placa y sobre esta mezcla se adicionaron 100 µl de n-butanol para nivelar la superficie y facilitar la visualización de la polimerización. Luego que ésta ocurrió se retiró el alcohol por inversión, se lavó la superficie con agua y se eliminó el exceso de agua con papel de filtro. A continuación se colocó con pipeta la solución del gel de apilamiento y de inmediato los peines formadores de calles.

3 **c.s.p.**: cantidad suficiente para

4 **PSA**: Persulfato de Amonio

5 **TEMED**: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

1.2.14.3. Aplicación de las muestras

Las muestras fueron aplicadas con jeringa Hamilton de 25 μ l de capacidad y se calculó el volumen necesario para sembrar de 10 a 20 μ g de proteína por calle (volumen máximo 20 μ l). Se sembraron 5 μ l de una solución conteniendo los siguientes patrones de PM (LMW, Bio-Rad): fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbúmina (66,2 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

1.2.14.4. Condiciones de corrida

La corrida electroforética se desarrolló en una cuba Miniprotean II (Bio-Rad). El buffer de reservorio (Tabla 1.2.9) se colocó en el reservorio catódico hasta cubrir la parte superior del gel y en el anódico hasta una altura suficiente como para permitir que todo el electrodo haga contacto con él. La intensidad de corriente fue de 30 mA durante el apilado y de 60 mA durante la resolución hasta la finalización de la corrida, que se visualizó por la llegada del azul de bromofenol al borde inferior del gel.

Tabla 1.2.9. Buffer de reservorio (10 X)

Tris	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
AD, c.s.p.	100 ml

1.2.14.5. Fijación, coloración y decoloración

Una vez completada la corrida, los geles fueron sumergidos durante 2 h en la solución colorante, que actúa también como fijadora (Tabla 1.2.10), y luego sometidos a sucesivos lavados con solución decolorante (Tabla 1.2.11) hasta la obtención de un fondo incoloro.

Tabla 1.2.10. Solución fijadora y colorante

Acido acético glacial	10 ml
Metanol	40 ml
Coomassie brilliant blue R-250	100 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Tabla 1.2.11. Solución decolorante

Acido acético glacial	10 ml
Metanol	34 ml
AD, c.s.p.	100 ml

1.2.14.6. Estimación de los Pesos Moleculares

La estimación de los pesos moleculares se realizó por comparación con proteínas patrones de bajo peso molecular (LMW, Bio-Rad). La determinación se realizó en base a una curva de calibración obtenida al graficar los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas estándar en función de la movilidad relativa de cada especie proteica.

1.2.14.7. Secado y almacenamiento de geles

Para conservar los geles, se sumergieron en una solución de glicerol al 40% v/v durante 24 h a temperatura ambiente. Luego se colocaron entre 2 filminas, permitiendo un borde a su alrededor no menor a 3 cm. Estos bordes se mantuvieron bajo presión durante otras 24 h, agregando luego mayor presión sobre los geles durante 3 días o hasta que estos estuviesen secos. Luego de esto, se recortaron los bordes y sellaron con cinta de papel.

1.2.15. Isoelectroenfoque

Con la finalidad de obtener el patrón proteico de las muestras en base a los valores de pI^6 se realizaron isoelectroenfques utilizando una Mini IEF Cell, Mod. 111 (Bio-Rad).

1.2.15.1. Preparación de las muestras

Las muestras se concentraron y desionizaron por precipitación con 4 volúmenes de acetona a 0°C durante 30 min. Luego de centrifugar a 16.000 *g* el sobrenadante obtenido se eliminó y el precipitado fue redissuelto con un volumen de agua bidestilada, de modo que la concentración de proteína fuera de 1 mg/ml. En el caso de muestras diluías, se realizaron sucesivos pasos de precipitación en un mismo tubo para lograr la concentración final deseada.

⁶ pI : punto isoelectrico

1.2.15.2. Preparación de los Geles

Los geles fueron confeccionados empleando la bandeja formadora de geles del equipo citado, que tiene capacidad para preparar dos placas en forma simultánea. Para ello se adhiere firmemente la cara hidrofóbica de la película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre el vidrio empleando una gota de agua para hacer el contacto y el conjunto se invierte sobre la bandeja. La mezcla de reactivos para obtener dos geles se preparó de acuerdo al listado detallado en la Tabla 1.2.12.

Tabla 1.2.12. Gel de isoelectroenfoque.

Acrilamida-bisacrilamida (25 %T, 3 %C)	2,0 ml
Glicerol (25% p/v)	2,0 ml
Anfolitos (Pharmalyte 3-10)	0,5 ml
Agua bidestilada	5,5 ml

La solución se desgasificó durante 5 min empleando una bomba de vacío y luego se le adicionaron a la misma 5 μ l de TEMED, 60 μ l de persulfato de sodio al 10% y 200 μ l de solución saturada de riboflavina para iniciar la polimerización. La mezcla fue depositada con pipeta entre la película plástica adherida al vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo durante 2 h con exposición de luz a temperatura ambiente para lograr la polimerización total. Los geles se removieron de la bandeja con ayuda de una espátula delgada.

1.2.15.3. Desarrollo del isoelectroenfoque

Se dejó escurrir el agua remanente de las placas y una vez que su superficie no mostraba gotas visibles se sembraron las muestras (5 a 10 μ l), permitiéndose la difusión de las mismas dentro del gel por un lapso de 5 min. Los electrodos de la celda de isoelectroenfoque fueron humedecidos con agua bidestilada, los geles se apoyaron inmediatamente sobre los mismos y se colocó la tapa que permite que la celda quede herméticamente cerrada. El

isoelectroenfoque fue llevado a cabo en tres etapas sucesivas: 15 min a 100 V, otros 15 min a 200 V y 60 min a 450 V.

1.2.15.4. Fijación y Coloración

Una vez finalizada la corrida, los geles unidos a su soporte pero ya separados de la placa de vidrio, fueron sumergidos durante 30 min en una solución fijadora (Tabla 1.2.13).

Tabla 1.2.13. Solución fijadora	
Acido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 ml
Acido tricloroacético	12,5 g
Agua c.s.p.	100 ml

Una vez fijados, los geles fueron tratados durante 2 h con la solución colorante (Tabla 1.2.14) y luego decolorados por lavados sucesivos con solución decolorante I (Tabla 1.2.15), seguidos de un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro (Tabla 1.2.16).

Tabla 1.2.14. Solución colorante	
Acido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	40 mg
CuSO ₄	500 mg
Agua c.s.p.	100 ml

Tabla 1.2.15. Solución decolorante I	
Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
CuSO ₄	500 mg
Agua c.s.p.	100 ml

Tabla 1.2.16. Solución decolorante II	
Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
Agua c.s.p.	100 ml

1.2.15.5. Estimación de los puntos isoelectrónicos

Para la determinación de los pI por isoelectroenfoque de las distintas especies proteicas se utilizó como patrones una mezcla de proteínas de amplio rango de pI (Broad pI kit, Pharmacia) detallada en la Tabla 1.2.17.

Los valores de los pI se determinaron realizando una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas patrones en función de la distancia recorrida por ellas en el gel, tomando como referencia la posición del cátodo. Los geles se pueden conservar luego de ser secados al aire en bolsas de polietileno selladas.

Tabla 1.2.17. Patrones de pI.	
Proteína	pI
Amiloglucosidasa	3,50
Inhibidor de Tripsina	4,55
β -lactoglobulina A	5,20
Anhidrasa carbónica B (bovina)	5,8
	5
Anhidrasa carbónica B (humana)	6,5
	5
Mioglobina (banda ácida)	6,8
	5
Mioglobina (banda básica)	7,3
	5
Lentil lectina (ácida)	8,1
	5
Lentil lectina (media)	8,4
	5
Lentil lectina (básica)	8,6
	5
Tripsinógeno	9,3
	0

1.2.16. Zimograma

Para detectar las bandas del isoelectroenfoque que poseían actividad proteolítica se realizaron zimogramas. Para ello se utilizaron geles sin colorear que fueron incubados sobre una placa de agarosa embebida en caseína durante 15 min a 55°C. Las zonas de la película de caseína degradadas indican la presencia de proteasas en el gel.

1.2.16.1. Preparación de las placas agarosa embebidas en caseína

Las placas de agarosa se prepararon sobre una película plástica (Agarose GelBond, Pharmacia) de un tamaño aproximadamente igual al del gel de poliacrilamida. Sobre el lado hidrofílico de la película se depositó una solución de agarosa al 1% en Tris-HCl 0,05 M de pH 8,0 (0,15 ml/cm²) a 60°C. Una vez polimerizada la agarosa, la placa fue sumergida en una solución de caseína al 1% en el mismo buffer conteniendo cisteína 15mM durante 20 min; luego fue enjuagada con agua destilada y escurrida durante 10 min (Westergaar *et al.*, 1980).

1.2.16.2. Incubación

El gel de poliacrilamida fue colocado sobre la placa de agarosa-caseína evitando la formación de burbujas entre las superficies en contacto. El conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda y llevado a estufa a 55°C durante 15 min.

1.2.16.3. Fijación y coloración

Luego de ser incubados, los geles fueron separados y la placa de agarosa-caseína sumergida durante 60 min en la solución fijadora cuya composición se indica en la Tabla 1.2.18.

Tabla 1.2.18. Solución fijadora

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

La placa de agarosa-caseína fue deshidratada entre papeles de filtro Whatman 3MM por aplicación de una presión de 7,5 g/cm² durante 20 min. Posteriormente fue secada con aire caliente y sumergida durante 10-30 min en solución colorante (Tabla 1.2.19).

Tabla 1.2.19. Solución colorante

Coomassie Brilliant Blue R-250	250 mg
--------------------------------	--------

Para decolorar la placa se la sumergió en la solución fijadora durante 10 min y luego se secó nuevamente con aire caliente.

1.2.17. Obtención de imágenes de geles y tratamiento analítico de datos por densitografía

Para poder obtener información cuantitativa a partir de los geles de las electroforesis, isoelectroenfoques y zimogramas, se obtuvieron sus imágenes digitales con un escáner UMAX, con una velocidad de escaneo de 20 x 20 cm en 40 s a 300 dpi, una resolución máxima de 2400 x 1200 dpi y un rango de densidad óptica de 0,01 a 3,4 DO.

Los geles fueron escaneados a la mayor resolución posible y las imágenes reducidas luego a un tamaño y resolución adecuados en un programa de procesamiento de imágenes (Adobe Photoshop y Aldus Photostyler). Estos programas fueron utilizados también para ajustes de brillo, contraste e intensidad de color, efectos de perfilado (“sharpening”), suavizado (“smoothing”) y remoción de defectos de fondo (“background”).

Una vez que las imágenes escaneadas fueron procesadas, se utilizó un software especial (Scion Image, 1998; URL: <http://www.scioncorp.com>) que convierte la intensidad de color de las bandas presentes en los geles en datos numéricos, permitiendo realizar densitogramas de las calles sembradas. A partir de los datos obtenidos de los densitogramas correspondientes a los patrones se confeccionaron curvas de calibración que permitieron luego calcular los valores de masas moleculares o pI de las muestras problema.

1.3. Resultados y Discusión

1.3.1. Obtención de extractos crudos

Durante el desarrollo del presente trabajo fueron obtenidos nueve extractos a partir de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez. Los frutos están agrupados en infrutescencias, cada una de las cuales contiene más de 80 frutos. Para preparar 250 ml de extracto crudo se utilizaron 5-6 frutos (50 g) y se procedió de acuerdo a lo indicado en el protocolo detallado en 1.2.2.

En la Tabla 1.1.3 se enumeran los parámetros correspondientes a cada una de las preparaciones obtenidas. Cada gramo de fruto contiene en promedio $2,9 \pm 0,3$ mg de proteínas y $31,6 \pm 3,4$ Ucas de actividad proteolítica. La actividad específica promedio es $10,9 \pm 2,2$ Ucas/mg de proteína. Únicamente fue descartada la preparación [8], obtenida a partir de frutos que habían sufrido un descongelamiento durante su almacenamiento, en la que se observa un bajo contenido de proteínas y una actividad caseinolítica muy disminuida, probablemente como resultado de un proceso de autodigestión.

Tabla 1.3.1. Material procesado durante el estudio de las proteasas de *Bromelia hieronymi*.

Extracto / Fecha	Peso de los frutos	Volumen de extracto	Actividad caseinolítica		Concentración de proteínas		Actividad específica
			Ucas/ml extracto	Ucas/g fruto	µg/ml de extracto	mg/g de fruto)	
[1] 5/04/01	52,5000	240	6,1	27,8	683	3,1	8,97
[2] 7/06/01	50,7299	220	8,5	37,2	559	2,4	15,5
[3] 17/10/01	52,2748	235	6,4	28,8	719	3,2	9,0
[4] 10/07/02	52,0300	287	5,7	31,4	538	2,9	10,83
[5] 16/10/03	51,0087	248	6,6	32,5	483	2,4	13,54
[6] 17/02/04	50,4933	213	6,6	27,8	694	2,9	9,59
[7] 25/06/04	50,5065	242	7,3	34,9	680	3,3	10,58
[8] 11/07/05	99,8965	420	3,1	12,9	333	1,4	9,21
[9] 18/08/05	50,4376	232	7,1	32,6	652	3,0	10,87

1.3.2. Condiciones de linealidad en las medidas de actividad caseinolítica

La determinación de la actividad proteolítica es de rigor en el estudio de las proteasas de cualquier origen y en consecuencia la elección de sustrato es un aspecto relevante, ya que debería ser usado en la mayor parte de las experiencias de caracterización de las propiedades de las proteasas en estudio. La caseína fue el sustrato elegido como molécula hidrolizable, de manera que muchas determinaciones, tales como el perfil de pH óptimo, el efecto de activadores / inhibidores y la estabilidad térmica, entre otras, se realizaron midiendo en cada caso el valor de la actividad proteolítica sobre este sustrato. Fue necesario obtener una dilución del extracto enzimático y un valor de tiempo de corte de la reacción adecuados para ser utilizados en todos los ensayos, de manera que las determinaciones se encuentren en la zona lineal de las curvas de actividad en función del tiempo. Por otra parte las medidas de absorbancia a 280 nm deben encontrarse acotadas, de modo que su relación con la concentración de productos peptídicos también sea lineal (Dixon & Webb, 1979). Utilizando distintas diluciones del extracto crudo (entre 1/2 y 1/25) se observó que las medidas de absorbancia a 280 nm entraban en un rango aceptable (comprendido entre 0,2 y 0,8 unidades) en los casos en que las diluciones eran iguales o mayores a 1/6, para un tiempo de reacción de 5 min.

En la Figura 1.3.1 se graficó la absorbancia a 280 nm en función del tiempo de reacción, para ensayos de actividad caseinolítica en los que se utilizó una dilución 1/6 del extracto crudo, deteniendo la reacción a tiempos diferentes, entre 1 y 4 min. Se realizó la regresión lineal de los datos, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,999, lo que indica una muy buena relación de linealidad de los datos. Por lo expuesto, se optó por elegir el valor de 2 min como tiempo de corte para todas las determinaciones, ya que se encuentra en la mitad de la zona lineal del gráfico.

Figura 1.3.1. Actividad caseinolítica en función del tiempo de reacción.

1.3.3. Efecto del tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas

En el gráfico 1.3.2 se representa la actividad caseinolítica residual de un extracto crudo en función del tiempo de almacenamiento a -20°C . Se observa que luego de cuatro meses de conservación en esas condiciones, el extracto mantiene un 74% de la actividad original. Un dato a tener en cuenta es que la determinación de actividad del extracto recién preparado es levemente inferior (alrededor de un 5%) a la determinación realizada 1 ó 2 días después de congelado. Este hecho se observó siempre que se preparó un nuevo extracto.

Es posible que parte de las proteasas presentes en la preparación recién obtenida se encuentren en forma de proenzima y unas pocas horas de almacenamiento sean suficientes para que se produzca el clivaje del propéptido N-terminal, dando como resultado un incremento en la forma activa de la enzima presente en la muestra (Trejo, 2005).

Figura 1.3.2. Disminución de la actividad de un extracto crudo en función del tiempo de almacenamiento.

1.3.4. Purificación parcial del extracto crudo

Los extractos vegetales contienen una gran cantidad de componentes hidrosolubles, entre los que se encuentran pigmentos, principalmente del tipo de los flavonoides, que son compuestos de naturaleza fenólica, así como alta concentración de glúcidos. Todas estas especies moleculares interfieren en la purificación posterior de las proteínas. Los azúcares incrementan la viscosidad de la solución, hecho que dificulta la purificación por técnicas cromatográficas. Por su parte los fenoles se combinan reversiblemente con las proteínas por medio de puentes de hidrógeno e irreversiblemente por oxidación seguida de condensaciones covalentes, con pérdida de la actividad enzimática (Loomis, 1966).

La eliminación de dichos compuestos permitió obtener una preparación parcialmente purificada. Con esa finalidad se realizó una precipitación fraccionada con solventes orgánicos (etanol y acetona), precipitando el extracto crudo con distintos volúmenes de cada uno de ellos y redisolviendo los precipitados obtenidos con el buffer de extracción. Luego se compararon porcentualmente las concentraciones de glúcidos y proteínas, así como la actividad caseinolítica de los precipitados acetónicos y etanólicos redisueltos con los valores obtenidos para el extracto crudo. En la figura 1.3.3 se observa que por precipitación etanólica se elimina una mayor cantidad de glúcidos que

si se utiliza acetona, aunque en ambos casos la cantidad de glúcidos remanentes es lo suficientemente baja como para no interferir en la purificación (11% con acetona y 5% con etanol, cuando se utilizan 5 volúmenes de solvente).

Figura 1.3.3. Porcentaje de hidratos de carbono residual luego de la precipitación fraccionada respecto del extracto crudo.

Por otra parte se observa que con acetona se recuperó una mayor cantidad de proteínas que con etanol (Figura 1.3.4), advirtiéndose que este incremento no es significativo por encima de los cuatro volúmenes de solvente precipitante.

Figura 1.3.4. Porcentaje de proteínas recuperadas por precipitación fraccionada respecto del extracto crudo.

Finalmente, en la Figura 1.3.5 se observa una mayor recuperación de la actividad caseinolítica en los PAR que en los PER y en ambos casos una ligera disminución de actividad por encima de los cuatro volúmenes de solvente, probablemente debido a una inactivación de la enzima por la cantidad elevada de solvente precipitante.

Figura 1.3.5. Porcentaje de actividad caseinolítica recuperada por precipitación fraccionada respecto del extracto crudo.

De acuerdo a estos resultados, fueron seleccionados los extractos parcialmente purificados obtenidos con cuatro volúmenes de solvente.

El PAR de cuatro volúmenes se utilizó en los pasos posteriores de purificación y también fue empleado en la caracterización bioquímica de la muestra. En ambos casos el criterio de elección se basó en que el PAR de cuatro volúmenes es el extracto parcialmente purificado que recupera la mayor cantidad de proteína activa y que permite eliminar un alto porcentaje de glúcidos. Por otra parte, el PER de cuatro volúmenes constituyó el material de partida para ensayos vinculados con la industria alimenticia, ya que aunque recupera 6% menos de actividad que el PAR, éste podría contener trazas de acetona que resultarían tóxicas.

1.3.5. SDS-PAGE

Para estimar los pesos moleculares de las proteínas presentes se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes de los precipitados acetónicos y etanólicos redisueltos.

En la Figura 1.3.6 se observa la presencia de una banda proteica mayoritaria de peso molecular de alrededor de 25 kDa en todas las muestras testeadas, valor que es del mismo orden que los encontrados para otras fitoendopeptidasas cisteínicas aisladas en nuestro laboratorio (Pardo, 2000; Obregón, 2001; Vairo Cavalli, 2003; Morcelle, 2004; Liggieri, 2004; Sequeiros, 2005) y se encuentra además dentro del rango de 20 a 35 kDa, característico de las proteasas cisteínicas de cualquier origen (Turk, 1997).

Figura 1.3.6. SDS PAGE de los PAR realizados con 1, 2, 3, 4 y 5 volúmenes de acetona (líneas 2, 3, 4, 5 y 6). Patrones de peso molecular (Bio-Rad), línea 1.

1.3.6. IEF y zimograma

Es usual que distintas proteasas presentes en el mismo material tengan pesos moleculares cercanos, por lo que la realización de la técnica de isoelectroenfoque seguida de zimograma suele ser ilustrativa en cuanto a la complejidad enzimática de los extractos crudos o parcialmente purificados.

La Figura 1.3.7 muestra el IEF realizado a los PAR obtenidos con distintos volúmenes de acetona. Todas las muestras presentan el mismo patrón, con seis bandas proteicas mayoritarias cuyos pI son 5,9, 6,4, 7,6, 8,3 y dos de pI mayor que 9,3, que por extrapolación se calcularon en 9,8, y 10,4. En ninguno

de los casos se observa un predominio de alguna banda en particular, lo que orienta a descartar la precipitación fraccionada como posible método para purificar específicamente.

Figura 1.3.7.
(líneas 2, 3, 4

Para determinar
realizaron zimog
1.3.8 (A y B) se
PAR obtenido co
en el tiempo de

de acetona

de activas se

En la figura

ogramas del

mbos radica

En el primer

caso se observa la presencia de 4 bandas activas (6,4, 8,3 y las dos de pI mayor a 9,3), pero si se expone la placa 15 min más, las otras dos bandas también desarrollan actividad.

De esta manera podemos dividir a las proteasas de *Bromelia hieronymi* en tres grupos. El grupo I de proteasas alcalinas (pI mayor que 9,3), el grupo II de pI intermedio (7,6 y 8,3) y el grupo III de proteasas ácidas (pI 5,9 y 6,4).

Figura 1.3.8. IEF-zimograma del PAR incubado 15 min (A) y 30 min (B).

Dentro de la familia Bromeliaceae encontramos muchas especies cuyos frutos poseen peptidasas de variado valor de pI (Tabla 1.3.2).

Tabla 1.3.2. peptidasas purificadas de la familia Bromeliaceae.			
Especie	Endopeptidasa	pI	Referencia
<i>Ananas comosus</i>	bromelaína de fruto	4,6	Ota <i>et al.</i> , 1964
	bromelaína de tallo	9,55	Murachi, 1970
	ananaína	> 10	Rowan <i>et al.</i> , 1988 Harrach <i>et al.</i> , 1995
	comosaína	> 10	Barret <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudananas macrodontes</i>	macrodontaína I	6,1	López <i>et al.</i> , 2000
	macrodontaína II	5,9	López <i>et al.</i> , 2000
<i>Bromelia pinguin</i>	pingüinaína	6,5	Rowan <i>et al.</i> , 1990
<i>Bromelia balansae</i>	balansaína	5,45	Pardo <i>et al.</i> , 2000
<i>Bromelia serra</i>	serraína	> 8,0	Caffini <i>et al.</i> , 1988

Las diferencias encontradas en los valores de pI de las peptidasas del PAR de *Bromelia hieronymi* fueron fundamentales para diseñar la estrategia a seguir durante los pasos posteriores de purificación por cromatografía de intercambio iónico.

1.3.7. Caracterización del extracto parcialmente purificado

1.3.7.1. Sustratos sintéticos: N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos

Los ensayos de actividad esterásica se realizaron para detectar las preferencias del PAR de *Bromelia hieronymi* por los sustratos del tipo N- α -carbобензохи-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos. En la figura 1.3.9 puede observarse que el derivado de Ala es el sustrato con el que la muestra desarrolla la mayor actividad (0,81 Ucbz / ml); luego le siguen en orden de importancia el derivado de Gly (0,48 Ucbz / ml) y el de Gln (0,42 Ucbz / ml), con alrededor del 60% de la actividad mostrada por el de Ala, y finalmente los de Asp y Lys, ambos con 0,13 Ucbz / ml, correspondiente al 20% de la actividad del derivado de Ala. Con el resto de los sustratos la muestra no presentó valores significativos de actividad esterásica.

Figura 1.3.9. Actividad del PAR frente a sustratos N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos.

1.3.7.2. Inhibidores

Los ensayos realizados en presencia de los inhibidores E-64 (0,1 mM) y ácido iodoacético (0,1 y 1 mM) no exhibieron actividad caseinolítica detectable. Se realizaron en forma paralela los respectivos controles sin el agregado de inhibidor, donde la actividad proteolítica no se vio afectada, por

lo que se comprobó que la muestra contiene enzimas proteolíticas del tipo cisteínico, ya que la actividad es inhibida en presencia de cualquiera de los dos inhibidores específicos de ese tipo de proteasas ensayados.

1.3.7.3. Cisteína

Teniendo en cuenta que para que las proteasas cisteínicas exhiban su máxima actividad proteolítica se requiere garantizar un medio reductor, se realizó una curva de actividad caseinolítica frente a concentraciones crecientes de cisteína. En la Figura 1.3.10 observamos que con una concentración de cisteína 15 mM en el tubo de reacción la actividad enzimática se incrementa en 1,34 veces respecto al ensayo sin cisteína. Por lo tanto ese valor se considera como la concentración mínima de cisteína que debe estar presente en las determinaciones enzimáticas de esta muestra para que la actividad caseinolítica no se vea limitada por este factor. Mayores concentraciones de cisteína no incrementan la actividad.

Figura 1.3.10. Actividad caseinolítica frente a concentraciones crecientes de cisteína.

1.3.7.4. Perfil de pH óptimo

En la figura 1.3.11. se graficó la actividad caseinolítica del PAR en función del pH de reacción. Se observa que en el rango de pH comprendido entre 7,3 y 10,7 la actividad está por encima del 80% de la actividad máxima. Por otra parte la presencia de dos picos en la curva sugiere que en la muestra hay más de una fracción proteolíticamente activa y que este gráfico corresponde a la

superposición de los perfiles de pH de cada una de las proteasas presentes. A pH 6 la actividad caseinolítica es equivalente al 25% de la actividad máxima; este valor de pH fue seleccionado para el buffer de extracción, de manera que el efecto de autodigestión fuera mínimo durante la obtención y conservación de los extractos.

Figura 1.3.11. Perfil de pH del PAR.

1.3.7.5. Fuerza iónica

La concentración salina del medio es uno de los aspectos a considerar cuando se estudia la actividad de una enzima, en especial si la misma puede ser de aplicación en procesos biotecnológicos. La actividad enzimática empleando caseína en soluciones salinas de concentración creciente mostró el perfil que se observa en la figura 1.3.12. Cabe destacar que en un medio en el que la concentración de NaCl es 1M el PAR aún conserva el 70% de la actividad máxima, mientras que se reduce a un 50% cuando la concentración de NaCl es 2,5 M.

Figura 1.3.12. Actividad caseinolítica en función de la fuerza iónica.

1.3.7.6. Estabilidad térmica

En la Figura 1.3.13 se graficó el porcentaje de actividad caseinolítica residual del PAR preincubado a distintas temperaturas. Puede observarse que la preparación enzimática es muy estable preincubando a 37°C o 55°C durante dos horas, conservando más del 90% de la actividad original. Luego de 30 min a 60°C aún retiene un 80% de la actividad inicial. La muestra enzimática fue completamente inactivada por calentamiento durante 20 min a 75°C. Esta información resulta de especial importancia si la preparación resultara adecuada para su utilización en procesos industriales; en estos casos la temperatura sería un factor de regulación, que permitiría mantener la enzima activa durante el tiempo que el proceso lo requiera, para luego inactivarla cuando sea necesario detener su acción.

Figura 1.3.13. Ensayo de actividad caseinolítica del PAR preincubado a distintas temperaturas.

1.3.7.7. Actividad caseinolítica en función de la temperatura

Cuando se estudia el efecto que ejerce la temperatura en una reacción enzimática se observa un incremento en la velocidad de la reacción con el aumento de la temperatura, si los tiempos de reacción son cortos. Cuando los tiempos de reacción son prolongados, las pendientes de las curvas de actividad caen, debido a la desnaturalización de la enzima. Para el PAR de *Bromelia hieronymi* en la Figura 1.3.14 se observa que la actividad se incrementa con la temperatura hasta los 65°C, considerando tiempos de reacción de hasta 16 min. En cambio a 75°C el efecto de la desnaturalización empieza a apreciarse a los 2 min y se hace total luego de 8 min de reacción, a partir del cual no se observa incremento en la cantidad de producto.

Figura 1.3.14. Actividad caseinolítica determinada a distintas temperaturas.

1.4. Conclusiones

Bromelia hieronymi Mez (“chaguar”) forma parte de la flora autóctona del norte argentino. Es una especie únicamente utilizada por pueblos aborígenes, quienes a partir de las hojas obtienen una fibra con la que confeccionan artesanías y utensilios para uso propio. Los frutos no son utilizados, sino descartados (van Dam, 2000).

Durante la realización del presente trabajo se obtuvo un extracto crudo a partir de frutos inmaduros de *Bromelia hieronymi* Mez, que posee una actividad caseinolítica promedio de $6,8 \pm 0,9$ Ucas/ml y una concentración promedio de proteínas de 626 ± 87 µg/ml. Este extracto fue parcialmente purificado en forma preliminar por precipitación acetónica y/o etanólica fraccionada para eliminar azúcares y compuestos hidrosolubles de naturaleza fenólica. Se obtuvieron de esta manera los extractos parcialmente purificados denominados PAR y PER, que recuperan una elevada cantidad de proteínas (91% en el PAR y 79% en el PER) y de actividad caseinolítica inicial (90% en el PAR y 83% en el PER) eliminando la mayor parte de azúcares y fenoles (Bruno *et al*, 2002). El PAR constituye la muestra de partida para pasos posteriores de purificación y el PER será ensayado en estudios orientados a su posible utilización en la industria quesera.

La conservación de los extractos a -20°C mantiene un 74% de la actividad original en cuatro meses.

El SDS PAGE del PAR y del PER revela la presencia de una banda proteica mayoritaria de 25 kDa, que se desdobra en seis bandas principales al IEF. Todas las bandas resultan ser proteolíticamente activas luego de 30 minutos de exposición a la caseína en el zimograma.

Para fines prácticos se las ordenó en tres grupos:

- I, de proteasas alcalinas, pI 9,8, y 10,4.
- II, de proteasas de pI intermedio, pI 7,6 y 8,3.
- III, de proteasas ácidas, pI 5,9 y 6,4.

La presencia de numerosas proteasas de masa molecular entre 20–30 kDa en extractos obtenidos a partir de especies de la misma familia, es un hecho muy común (Rowan *et al*, 1990; Payrol *et al*, 2005; Pardo *et al*, 2000 ; López *et al*, 2001).

El extracto es activo en un amplio rango de pH, obteniéndose valores superiores al 80% de la actividad máxima entre pH 7,3 y 10,7. La aplicación de inhibidores específicos de grupo demostró que las enzimas presentes son cisteinilendopeptidasas, como todas las proteasas de Bromeliaceae aisladas hasta el momento, y en consecuencia requiere del agregado de cisteína o de otros tiol-reductores para manifestar su máxima actividad, situación que se alcanza cuando la concentración de cisteína es 15 mM.

Con respecto a la actividad esterolítica, el PAR mostró preferencia por los derivados de Ala, Gly, Gln, Asp y Lys entre los trece N- α -CBZ-L-amino ácidos ensayados. La elevada afinidad por la Ala es una característica común de las proteasa cisteínicas aisladas en nuestro laboratorio, tanto las provenientes de frutos (familia Bromeliaceae: Pardo *et al*, 2000 ; López *et al*, 2001), como las obtenidas a partir de látex (familia Asclepiadaceae, Vairo Cavalli *et al*, 2001 y 2003; Apocinaceae, Trejo *et al*, 2001)

La actividad caseinolítica se reduce un 30% si la concentración de NaCl es 1 M y un 50% cuando la concentración de NaCl es 2,5 M.

La muestra es muy termoestable ya que conserva más del 90% de la actividad original cuando es preincubada a 37°C o 55°C durante dos horas. A 75°C se inactiva en un factor superior al 90% con un tratamiento térmico de 5 min, lo que resulta ser ventajoso para detener la actividad en procesos industriales.

Si se determina la actividad caseinolítica a distintas temperaturas se observa que ésta se incrementa hasta los 65°C considerando tiempos de reacción de hasta 16 min. A tiempos mayores y temperaturas elevadas aumenta notablemente la desnaturalización proteica, no obteniéndose más cantidad de producto.

Referencias bibliográficas

- Adams, C.A. & R.W. Rinne, (1981). "The occurrence and significance of dispensable proteins in plants", *New Phytol.* **89**: 1-6.
- Alcázar Lázaro, V. (1998). "Alimentación Y Nutrición: Manual Teórico-Práctico". Biblioteca electrónica "Díaz de Santos", Madrid. <<http://www.diariomedico.com/grandeshist/lacteos/queso.html>> [consulta: 27/9/2005].
- Alvan der Hogrn, R. & J.D.G. Jones, (2004). "The plant proteolytic machinery and its role in defense". *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 400-7.
- Anderson, J.W. (1968). "Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues" *Phytochemistry* **7**: 1973-88.
- Arenas, P. (1997). "Las bromeliáceas textiles utilizadas por los indígenas del Gran Chaco", *Parodiana* **10**: 113-39.
- Arnau, J.V. "Col fermentada o choucroute" <<http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=1297>> [consulta: 24/10/2005].
- Barret, A.J. (2001). "Proteolytic enzymes: nomenclature and classification", en "Proteolytic Enzymes. A practical approach" 2nd. Edition (R. Beynon & J.S. Bond, eds.). Oxford University Press, Great Britain.
- Barrett, A.J. & N.D. Rawlings (1995). "Families and clans of serine peptidases" *Arch. Biochem. Biophys.* **318**: 247-250
- Barrett, A.J., N.D. Rawlings & J.F. Woessner (2004a). "Preface-Introduction", en "Handbook of Proteolytic Enzymes", 2nd Ed. Elsevier, London.
- Barrett, A.J., N.D. Rawlings & J.F. Woessner (2004b). "Cysteine peptidases", pags. 1051-1077 en "Handbook of Proteolytic Enzymes", 2nd Ed. Elsevier, London.
- Bate-Smith, E.C. (1968). "The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance". *J. Linn. Soc. Bot.* **60**: 325-83.
- Bell, A. (1981). "Biochemical mechanisms of disease resistance". *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**: 21-81.
- Berg, J.M., J.L. Tymoczko, L. Stryer & N.D. Clarke (2002). "Biochemistry", 5th Ed., W.H. Freeman & Company, NY, págs. 189-225.
- Beuth, J. & Brawn, J.M. (2005). "Modulation of murine tumor growth and colonization by bromelaine, an extract of the pineapple plant (*Ananas comosum* L.)". *In Vivo*, **19**(2):483-5.
- Boller, T. (1986). "Roles of proteolytic in interactions of plant with other organisms". En "Plant proteolytic enzymes" (M.J. Dalling, ed.), Vol. I, págs. 68-96. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bradford, M.B. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
- Bromeliad Society Internacional, <<http://www.bsi.org/>> [consulta: 24/9/2005].
- Bruno, M.A., Pardo, M.F., Caffini N.O. & López, L.M.I. (2002). "Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)", *Acta Farm. Bonaerense* . **21**: 51-6.
- Caffini, N.O., Natalucci, C.L., Priolo, N.S. & Buttazzoni, M.S. (1988). "Proteasas de Bromeliaceae IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulhidrilica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb.", *Acta Farm. Bonaerense* . **7**: 9-14.
- Campbell D.A. & A.K. Szardenings (2003). "Functional profiling the proteome wuith affinity labels". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**: 296-303.
- Capel, J.C. (1991) "El pan". Montserrat Matéu, Madrid.
- Cordle, Christopher T. (1994). "Control of Food Allergies Using Protein Hydrolysates". *Food Technol.* **48**: 72-76.
- Correa, J.E. & H.Y. Bernal (1990). "Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello". Tomo III. Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello (SECAB). Ciencia y Tecnología # **14**:13. Bogotá, Colombia.

- Dangl, J., R. Dietrich & H. Thomas (2000). "Senescence and programmed cell death". En "Biochemistry and Molecular Biology of Plants" (Buchanan, B., W. Gruissem & R. Jones, eds), págs. 1044-100. Rockville, Maryland.
- Dixon, M. & E. Webb (1979) "Enzymes", 3ª edición. Academic Press, NY, págs. 7-22.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers & F. Smith (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.* **28**: 350-6.
- Dussourd, D.E. (1993). "Foraging with finesse: caterpillar adaptations for circumventing plant defenses", en "Caterpillars: Ecological and evolutionary constraints on foraging" (Stamp, N.E. and T.M. Cassey, eds.), págs. 92-131. Chapman & Hall, New York.
- El Día (2004). "Recurso de amparo de la comunidad Wichí por remate de tierras". La Plata, 1º de junio de 2004.
- Enzyme Nomenclature (1984). "Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes". New York, Academic Press.
- Frøkjær, S. (1994). "Use of Hydrolysates for Protein Supplementation." *Food Technol.* **48**: 86-88
- Glazer, A.N. & E.L. Smith (1971). "Papain and other plant proteolytic enzymes". En "The enzymes" (P.D. Boyer, ed.), Vol. 3, págs. 501-46
- Goldberg, A.L., Elledge, S.J. & Harper, J.W., (2001). "The cellular chamber of doom". *Scientific American.* **284** (1):56-61
- Good, N.E. & S. Izawa (1972). "Hydrogen ion buffers", *Meth. Enzymol.* **24**: 53-68.
- Gortner, W.A. & M.J. Kent (1958). "The coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple indolacetic acid oxidase". *J. Biol. Chem.*, **233**: 731-5.
- Gregory, S. & Kelly, N.D. (1996). "Bromelain: a literature review and discussion of its therapeutic applications". *Alt Med Rev*, **1**(4):243-57
- Grudkowska, M. & B. Zagdańska (2004). "Multifunctional role of plant cysteine proteinases". *Acta Biochim. Pol.* **51**: 609-24.
- Harrach, T., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Nuck, R., Grunow, D. & Maurer, H.R. (1995) "Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain", *J. Protein Chem.* **14**: 41-52.
- Hartley, B.S. (1960) "Proteolytic enzymes", *Ann. Rev. Biochem.* **29**: 45-72.
- Jardin botanique de Montréal (2000) <http://www2.ville.montreal.qc.ca/jardin/info_verte/bromeliacees/classification.htm> [consulta: 24/9/2005].
- Karlin, U.O., L.A. Catalán & R.O. Coirini (1994). "La naturaleza y el hombre en el Chaco Seco", Colección Nuestros Ecosistemas, Ed. GTZ, Salta, Argentina.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* **227**: 680-5.
- Lahl, W.J. & S.D. Brown (1994). "Enzymatic production of protein hydrolysates for food use", *Food Technol.* **48**: 68-71
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson & M.M. Cox (2004). "Principles of Biochemistry", 4ª Ed., Worth, págs. 191-237.
- Liggieri, C.S., M.C. Arribère, S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Aviles & N.S. Priolo (2004). "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L.", *Protein J.* **23**:403-11.
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, Ch.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, L. Zipursky, & J. Darnell (2004). "Molecular Cell Biology", 5ª Ed., W.H. Freeman, NY, págs. 73-9.
- Loomis, W.D. & J. Battaile (1966). "Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes", *Phytochemistry* **5**: 423-38.
- López, L.M.I., C. Sequeiros, C.L. Natalucci, A. Brullo, B. Maras, D. Barra & N.O. Caffini (2000). "Purification and characterization of macrodontan I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodantes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)", *Protein Expres. Purif.* **18**: 133-40.

- López, L.M.I., Sequeiros, C., Trejo, S.A., Pardo, M.F., Caffini, N.O. & Natalucci, C.L. (2001). "Comparison of Two Cysteine Endopeptidases from *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **382**: 875-78.
- Lozano Teruel, J.A. (1996). "Ciencia y Vino" <http://www.canales.laverdad.es/cienciaysalud/5_2_5.html> [consulta: 24/10/2005].
- Mahmoud, M.I. (1994). "Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products", *Food Technol.* **48**: 89-95
- Mantell, S.H., Matthews, J.A. & McKee, R.A. (1985). "Principles of plant biotechnology", Blackwell Sci. Pub., Oxford, págs. 207-12.
- Maurer, H.R. (2001). "Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use". *Review Article, Cell Mol Life Sci.* **58**(9):1234-45
- Morcelle, S.R., S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Aviles & N.S. Priolo (2004). "Funastain c II: a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrium clausum*". *Protein J.* **23**: 205-15.
- Murachi, T. (1970) "Bromelain enzymes", *Meth. Enzymol.* **19**: 273-84.
- Mutlu, A. & S. Gal (1999) "Plant aspartic proteinases: Enzymes on the way to a function". *Physiol. Plant.* **105**: 569-76.
- Natalucci C.L., N.S. Priolo, M.S. Buttazzoni y N.O. Caffini (1985). "Proteasas de Bromeliaceae. II. Separación, caracterización y fraccionamiento de una proteasa aislada de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez", *Acta Farm. Bonaerense* **4**: 93-8
- Natalucci C.L., N.S. Priolo, L.M.I. López & N.O. Caffini (1988) "Proteasas de Bromeliaceae V. Separación y purificación de sulfhidril-proteasas presentes en frutos de *Bromelia balansae* Mez". *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 179-85.
- Netti, C., Bandi, G.L. & Pecielle A. (1972). "Anti-inflammatory action of proteolytic enzymes of animal, vegetable or bacterial origin administered orally compared with that of known anti-phlogistic compounds", *Il Farmaco* (Ed Pr.) **27**:453-66.
- Neurath, H. (1989). "The diversity of proteolytic enzymes". En "Proteolytic Enzymes. A Practical Approach" (Beynon, R.J. y J.S. Bond, eds.), págs. 1-13. IRL Press, Oxford.
- Obregón, W.C., M.C. Arribére, S.R. 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**: 317-25
- Ota, S., S. Moore & W.H. Stein, (1964). "Preparation and properties of purified stem and fruit bromelains". *Biochemistry.* **3**: 180-5.
- Pardo, M.F., López, L.M.I., Canals, F., Avilés, F.X., Natalucci, C.L. & Caffini, N.O. (2000) "Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae)" *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3795-800.
- Patrimonio natural Argentina (2003) <<http://www.patrimonionatural.com/staff.asp>> [consulta: 22/10/2005]
- Payrol, J.A., Obregón, W.D., Natalucci, C.L. & Caffini, N.O. (2005). "Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit". *Fitoterapia.* **6**:540-8.
- Pecham, T., L. Ye, Y. Chang, A. Mitra, L. Lin, F.M. Davis, W.B. Williams & D.S. Luthe (2000). "A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other Lepidoptera", *Plant Cell* **12**: 1031-40.
- Pedersen, B. (1994). "Removing Bitterness from Protein Hydrolysates." *Food Technol.* **48**: 96-98.
- Peterson, G.L. (1979). "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall", *Anal. Biochem.* **100**: 201-20.
- Priolo N.S., L.M.I. López, M.C. Arribére, C.L. Natalucci. y N.O. Caffini. (1991). "New purified plant proteinases for the food industry", *Acta Alimentaria* (Budapest) **20**: 189-196
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1993). "Evolutionary families of peptidases", *Biochem. J.* **290**: 205-218
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1994a). "Families of serine peptidases", *Meth. Enzymol.* **244**: 19-61.

- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1994b). "Families of cysteine peptidases", *Meth. Enzymol.* **244**: 461-86.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1995a). "Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism", *Meth. Enzymol.* **248**: 105-20.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1995b). "Evolutionary families of metallo-peptidases", *Meth. Enzymol.* **248**: 183-228.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (2004). "Introduction: clan PB containing N-terminal nucleophile peptidases", en "Handbook of Proteolytic Enzymes", 2nd Ed., págs. 2047-9. Elsevier, London.
- Rowan, A.D., Buttle, D.J. & Barrett, A.J. (1988) "Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem", *Arch. Biochem. Biophys.* **267**: 262-70.
- Rowan, A.D., Buttle, D.J. & Barrett, A.J. (1990) "The cysteine proteinases of the pineapple plant", *Biochem. J.* **266**: 869-75.
- Salvesen, G. & H. Nagase (2001). "Inhibition of proteolytic enzymes", en "Proteolytic enzymes, a practical approach", 2ª. Ed., Oxford University Press, Oxford, págs. 105-30.
- Sarath, G., R. S. de la Motte & F. Wagner (1989). "Protease assay methods", en "Proteolytic enzymes, a practical approach" (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.), IRL Press, Oxford, pág. 27.
- Schaller, A. (2004). "A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases", *Planta* . **220**: 183-97.
- Schechter, I & A. Berger (1967). "On the size of the active site in proteases", *Biochem. Biophys. Res. Com.* **27**: 157-62.
- Schmidl, M.K., Taylor, S.L., Nordlee, J.A. (1994). Use of Hydrolysate-Based Products in Special Medical Diets. *Food Technology*, **48**:77-85
- Scopes, R.K. (1984). "Protein purification. Principles and practice", Springer-Verlag, N.Y., pág. 219.
- Sequeiros C., M.J. Torres, S.A. Trejo, J.L. Esteves, 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 Am. (Apocynaceae)". *The Protein J.* **24**: 445-53.
- Sicard, P. (1982). "Applications industrielles des enzymes", en "Les enzymes. Productions et utilisations industrielles", G. Durand & P.Monsan, eds., Gauthier-Villars, Paris, págs 121-64.
- Silverstein, R.M. (1974) "The assay of the bromelains Using *N*-CBZ-L Lysine p-nitrophenyl ester and *N*-CBZ-L Glycine p-nitrophenyl ester as substrates". *Analytical Biochem.* **62**:478-84.
- Steinke, F.H., D.H. Waggle & M.N. Volgarev (1992). "New protein foods in human health: nutrition, prevention and therapy". CRC Press.
- Strasburger, E., F. Noll, H. Schenck, A.F.W. Schimper, D. von Denffer, W. Schumacher, K. Mägdefrau & F. Ehrendorfer (1981). "Tratado de Botánica". Editorial Pueblo y Educación, pág. 718. La Habana, Cuba.
- Takata, R.H. & P.J.Scheuer (1976). "Isolation of glyceryl esters of caffeic and p-coumaric acids from pineapple stems". *Lloydia*, **39**: 409-11.
- Tejera Osuna, I. (1993). "El libro del pan", Alianza Editorial, Madrid.
- Trease G.E. & W.C. Evans (1991). "Tratado de Farmacognosia". 13ª Ed. Interam., pág. 253. MacGraw-Hill, México DF.
- Trejo, S.A., López, L.M.I., Cimino, C.V., Caffini, N.O. & Natalucci, C.L. (2001). "purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae). *J. Protein Chem.* **20**: 445-53.
- Trejo, S.A., (2005). "Purificación, caracterización bioquímica y estructural y expresión de una endopeptidasa cisteínica de látex de *Asclepias fruticosa* L. (Apocynaceae)", Tesis Doctoral., Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Turk B., V. Turk & D. Turk (1997). "Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors". *Biol Chem.* **378**: 141-50
- Uhlir, H. (1998). "Industrial enzymes and their applications", Wiley-Interscience

- Publication, John Wiley & Sons, Inc., NY, Toronto, págs. 2-5
- Vairo Cavalli, S.E., Cortadi, A., Arribére, M.C., Conforti, P., Caffini, N.O. & Priolo, N.S. (2001). "Comparison of Two Cysteine Endopeptidases from Latexes of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (Asclepiadaceae)". *Biol Chem. Hoppe-Seyler*. **382**: 879-83.
- Vairo Cavalli, S., Arribére, M.C., Cortadi, A., Caffini, N.O. & Priolo, N.S. (2003). "Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae)". *J. Protein Chem.* **22**: 15-22.
- Van Dam, C. (2000). "Condiciones para un uso sostenible: el caso del Chaguar (*Bromelia hieronymi*) en una comunidad Wichí del Chaco argentino". Taller Internacional sobre Uso Sustentable de los Recursos Naturales, organizado por UICN y Noragric, As, Noruega.
- Varela, G. (1991). "El pan en la alimentación de los españoles", Eudema, Madrid.
- Walsh, G. (2004). *Proteins Biochemistry and Biotechnology*. Ed: John Wiley & Sons, LTD.pág.:420-435.
- Walreavens, V., M. Jaziri, J. van Beeumen, A.G.Schnek, T. Kleinschmidt & Y. Looze (1993). "Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex *Carica candamarcensis* Hook", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**: 501-6
- Westergaar, J.L., C. Hackbarth, M.W. Treuhaft & M.C. Roberts (1980). "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures", *J. Immunol. Meth.* **34**: 167-75.
- Williams, C.A. (1978). "The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the Bromeliaceae". *Phytochemistry*, **17**, 729-34.

Capítulo 2

Capítulo 2

Purificación y caracterización de tres endopeptidasas a partir de un extracto de *Bromelia hieronymi* Mez

2.1. Introducción

2.1.1. Endopeptidasas: mecanismo catalítico e inhibición

2.1.1.1. Peptidasas cisteínicas

La papaína es la peptidasa cisteínica más ampliamente estudiada y ha sido la primera a la cual se le determinó la estructura tridimensional (Drenth *et al.*, 1968), por lo que es considerada como el arquetipo de esta clase de peptidasas. También son de tipo cisteínico otras proteasas vegetales como ficaína, actinidaína y bromelaína, varias catepsinas de mamíferos, calpaínas citosólicas y algunas proteasas de parásitos como las de Trypanosoma, la mayoría de las cuales están incluidas dentro de la familia de la papaína.

El mecanismo catalítico ocurre a través de la formación de un intermediario covalente, al igual que en las proteasas serínicas y treonínicas, e involucra por parte de la enzima una tríada catalítica formada por los aminoácidos Cys25, His159 y Asn175, como así también el residuo de Gln19 (de acuerdo a la numeración de la papaína), que aporta al arreglo tridimensional del sitio activo (Moreau & Choplin, 2005). En la Figura 2.1.1 se encuentra esquematizado el mecanismo de reacción de las peptidasas cisteínicas.

El ataque nucleófilo lo realiza un ion tiolato proveniente de la Cys25 que es estabilizado a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la His159, que se encuentra como ion imidazolio positivo independientemente de la unión con el sustrato (Polgar & Halasz, 1982). La reacción puede considerarse dividida en dos fases: la de **acilación**, donde la formación del intermediario acil-enzima covalente está acoplado al clivaje del enlace peptídico, y la de **desacilación**, en la que se regenera la enzima libre. La desacilación es esencialmente el proceso inverso a la acilación, con una molécula de agua en reemplazo del componente aminoacídico del sustrato (Nelson & Cox, 2004). Primero el sustrato se posiciona en el sitio activo de la enzima. Luego el tiolato de la Cys25 provoca el ataque nucleofílico sobre el carbono del grupo carbonilo del polipéptido, mientras que la carga negativa generada en el oxígeno del carbonilo es estabilizada en el hueco oxianiónico por los hidrógenos imínicos de la Cys25 y la Gln19, quedando formado así un intermediario tetrahédrico de vida corta. La inestabilidad de la carga sobre el carbonilo del sustrato produce la ruptura del intermediario y se vuelve a formar el doble enlace del carbonilo, con la consiguiente ruptura de la unión C-N del enlace peptídico, liberando el primer producto peptídico que corresponde al extremo carboxilo del sustrato original, y un intermediario acil-enzima relativamente estable. Luego ingresa una molécula de agua que es desprotonada por catálisis básica, generando un ion hidróxido (nucleófilo fuerte) que ataca el C del enlace tioéster de la acil-enzima. Nuevamente la carga generada en el oxígeno del carbonilo es estabilizada en el hueco oxianiónico y queda formado un segundo intermediario tetrahédrico de vida corta. Finalmente la ruptura de este último produce la desacilación, formando el complejo enzima-producto, que al romperse libera la enzima y el segundo producto peptídico, correspondiente al extremo amino del sustrato original.

Figura 2.1.1. Mecanismo catalítico de las proteinasas cisteínicas.

Del mecanismo de reacción se deduce que el residuo Cys debe encontrarse en estado libre para realizar su acción; por lo tanto su modificación química destruye por completo la actividad de la enzima (Dunn *et al.*, 1994). En la

Figura 2.1.2 se indica en detalle la estructura del sitio catalítico, en el cual se observa la posición de la tríada catalítica y del hueco oxianiónico.

Figura 2.1.2. Esquema tridimensional del sitio activo de la papaina

Como ejemplos de peptidasas cisteínicas vegetales se pueden citar a las aisladas de *Calotropis gigantea* (Rajesh *et al.*, 2005), de *Bromelia balansae* Mez (Pardo *et al.*, 2001), de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregon *et al.*, 2001), de *Araujia angustifolia*, y de *Funastrum clausum* (Morcelle del Valle *et al.*, 2004a; Morcelle del Valle *et al.*, 2004 b), entre otras.

Las cisteinilpeptidasas manifiestan su actividad en condiciones reductoras y en presencia de agentes quelantes, ya que los iones metálicos pueden inhibirlas por unirse al grupo tiol. Este tipo de proteasas pueden identificarse mediante el agregado de reactivos bloqueantes de grupos sulfhidrilos tales como iodoacetato, cloruro mercúrico o mercuribenzoato.

Existen inhibidores naturales de las peptidasas cisteínicas ampliamente distribuidos en las plantas, como así también en los animales y los microorganismos (Malgorzata *et al.*, 2004). De acuerdo a su secuencia aminoacídica, la presencia y posición intracatenaria de los puentes disulfuro y la masa molecular de las proteínas, estos inhibidores se clasifican en tres grupos (Turk & Bode, 1991). El primero está constituido por proteínas de masa molecular aproximada de 11 kDa, sin puentes disulfuro. El segundo grupo (de las cistatinas), incluye proteínas de masa molecular de 13,4 a 14,4 kDa que contienen dos puentes disulfuro, siendo la mayoría de ellas no glicosiladas (Grzonka *et al.*, 2001). Por último, el grupo del quinínógeno está compuesto por glicoproteínas de 60-120 kDa. Recientemente se descubrió una nueva clase de inhibidores naturales que componen el grupo de la estafostatina, hallada en *Staphylococcus aureus* (Dubin *et al.*, 2003; Rzychon *et al.*, 2003). La regulación de estos inhibidores naturales es poco conocida y su expresión está limitada a órganos específicos o a etapas de crecimiento particulares como la germinación (Botella *et al.*, 1996), estadíos tempranos de la senescencia foliar (Huang *et al.*, 2001), estrés hídrico (Waldron *et al.*, 1993), estrés ante bajas temperaturas (Pernas *et al.*, 2000) y estrés salino (Van der Vyver *et al.*, 2003).

El inhibidor artificial E-64, L-trans-epoxisuccinil-leucilamido(4-guanidin)butano, forma un enlace tioéter irreversible con el tiol de la cisteína activa y es ampliamente utilizado en el estudio de estas peptidasas. Se ha demostrado que inhibe en mayor o menor medida a todas las peptidasas cisteínicas ensayadas y que no afecta a las demás peptidasas. Además se caracteriza por actuar en relación equimolecular (1:1 enzima / inhibidor), permitiendo de este modo la titulación del sitio activo (Barrett *et al.*, 1982).

2.1.1.2. Peptidasas serínicas y treonínicas

Dentro de las peptidasas serínicas encontramos la familia de la tripsina y la familia de la subtilisina. Si bien la estructura general tridimensional es diferente en las dos familias, ambas comparten la geometría de sitio activo y en consecuencia catalizan las reacciones con un mecanismo equivalente. En

los siguientes párrafos se describe el mecanismo de catálisis de una proteasa serínica.

En el proceso catalítico son esenciales tres residuos aminoacídicos: His57, Asp102 y Ser195 (numeración correspondiente a la posición de los aminoácidos del quimotripsinógeno). La primera etapa en la catálisis es la formación de un intermediario covalente acil-enzima entre el sustrato y el residuo serina, a través de un estado de transición tetrahédrico cargado negativamente que se resuelve cuando el enlace peptídico es cortado. En la segunda etapa el intermedio acil-enzima es hidrolizado para liberar el péptido, restaurándose el hidroxilo serínico de la enzima (deacilación). Esto involucra la formación de otro intermediario tetrahédrico de transición. Una molécula de agua es el nucleófilo atacante en lugar del residuo serina. La histidina provee una base general y acepta el grupo hidroxilo de la serina reactiva (Moreau & Choplin, 2005; Figura 2.1.3).

ACILACIÓN

Figura 2.1.3. Mecanismo catalítico de las proteinasas serínicas y treonínicas.

La actividad de este grupo de peptidasas suele ser máxima a valores de pH alcalinos y no requieren activadores específicos, aunque los iones calcio intervienen activando algunas proenzimas o estabilizando a algunas enzimas.

Estas enzimas son las más estudiadas en el campo de las proteasas, aunque se conocen relativamente pocas provenientes de los vegetales. Entre ellas pueden citarse a la cucumisina, aislada de *Cucumis melo* L. var. Prince (Kaneda & Tominaga, 1975; Kaneda *et al.*, 1995; Uchikoba *et al.*, 1995); la macluralisina obtenida de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Rudenskaya *et al.*, 1995) y la taraxalisina extraída de *Taraxacum officinale* Webb s.l. (Rudenskaya *et al.*, 1998). También fueron estudiadas las enzimas obtenidas a partir de *Benincasa cerifera* (Kaneda & Tominaga, 1977), de *Trichosantes cucumeroides* Maxim. (Kaneda *et al.*, 1986) y de *T. bracteata* (Lam.) Voigt (Kaneda & Uchikoba, 1994), de *Cucurbita ficifolia* (Curotto *et al.*, 1989), de *Synadenium grantii* Hook, 'f'. (Mrinalini Menon *et al.*, 2002), de *Euphorbia supina* (Arima *et al.*, 2000) y de *Melothria japonica* (Thumb) Maxim (Uchikoba *et al.*, 2001), entre otras.

Las endopeptidasas serínicas son inhibidas por el diisopropilfluorofosfato (DFP), compuesto que pertenece al grupo de los organofosforados. Actúa inactivando irreversiblemente la serina del sitio catalítico por fosforilación. Es considerado el inhibidor más útil para poder identificar esta clase de peptidasas, dado que manifiesta escasa o nula acción sobre otros tipos de endopeptidasas (Salvesen & Nagase, 2001).

Todas las proteasas de tipo treonínico conocidas son hidrolasas en las que el nucleófilo es un residuo N-terminal (Ntn-hidrolasas). El subclan PB(T) del sistema MEROPS incluye tres familias en las que el nucleófilo N-terminal es treonina. La más importante es la Familia T1, que comprende a las proteasas del proteasoma, un ensamblado macromolecular que actúa como una máquina proteolítica en el interior de casi todos los tipos de células (Goldberg *et al.*, 2001). El proteasoma de los eucariotes es un complejo 26S (2000 kDa) constituido por un cilindro hueco 20S (700 kDa) cerrado en sus dos extremos por un complejo 19S de funciones regulatorias. El complejo 20S está

compuesto por cuatro anillos heptaméricos integrados por unidades α y β ordenadas en una secuencia $\alpha \beta \beta \alpha$, en los que la subunidad β es la que tiene actividad proteolítica y es de tipo treonínico (Barrett *et al.*, 2004).

2.1.1.3. Peptidasas aspárticas

La mayoría de las proteinasas aspárticas estudiadas pertenecen a la familia de la pepsina, que incluye enzimas tales como quimosina, catepsina D y algunas proteasas fúngicas. Una segunda familia comprende proteínas virales tales como la retropepsina (proteasa del virus del SIDA). Estas enzimas son moléculas constituidas por dos lóbulos homólogos, con el sitio activo localizado entre ambos. Cada lóbulo contribuye con un residuo aspártico a la díada activa de aspartatos, que se encuentran muy próximos en la molécula activa, pero uno sólo de ambos es ionizado en el rango de pH óptimo (2–3). Por actuar en condiciones óptimas a bajos valores de pH estas proteinasas también fueron denominadas “proteinasas ácidas” (Hartley, 1960).

En contraste con las proteasas serínicas y cisteínicas, la catálisis de las aspárticas no involucra enlaces covalentes intermediarios, aunque sí existe un intermediario tetraédrico. El ataque nucleofílico se realiza por la transferencia simultánea de dos protones: uno desde una molécula de agua a la díada de dos grupos carboxilos y un segundo desde la díada al oxígeno del grupo carbonilo del sustrato, con la consecuente ruptura del enlace peptídico. Esta catálisis general ácido-base, permite la formación de un intermedio tetraédrico no covalente (Moreau & Choplin, 2005, Figura 2.1.4).

Se han aislado proteasas aspárticas vegetales a partir de hojas, flores y semillas de diferentes especies. Entre ellas podemos mencionar a la phytepsina, aislada a partir de especies de *Arabidopsis*, *Brassica*, *Centaurea*, *Cynara*, *Hordeum*, *Lycopersicum*, *Oryza* y *Vigna* (Kervinen, 1998) 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 una protease heterodimérica de una variedad de cultivo de *Cynara scolymus*, que presenta gran homología con la cardosina A (Llorente *et al.*, 2004) y también una

proteasa aspártica de flores de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Vairo Cavalli *et al.*, 2005).

Figura 2.1.4. Mecanismo catalítico de las proteinasas aspárticas.

Las peptidasas aspárticas mejor caracterizadas (pepsina, quimopepsina, catepsina D, renina y proteasas del HIV) son inhibidas por pepstatina A, un isovalerilpentapéptido de origen microbiano, que actúa de modo reversible y no afecta a otro tipo de proteasas (Umezawa, 1976).

2.1.1.4. Metalopeptidasas

Son las peptidasas que poseen un catión metálico divalente como constituyente de su centro catalítico, el cual es sostenido generalmente en su sitio por tres aminoácidos que actúan como ligandos. Del mismo modo que las proteasas aspárticas, estas enzimas catalizan un ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico mediado por una molécula de agua, siendo el ion metálico el encargado de activar la molécula de agua. El catión es usualmente cinc y en menor medida cobalto, níquel o manganeso.

En algunas metaloproteasas se requiere solamente un ión cinc para realizar su función catalítica, pero en otras son necesarios dos iones metálicos que actúen en forma conjunta. Todas aquellas que poseen cobalto o manganeso requieren dos iones metálicos presentes, en tanto que las que poseen cinc pueden contener uno o dos de estos iones. En las proteinasas con iones metálicos co-catalíticos, solamente cinco residuos aminoácidos actúan como ligandos, siendo uno de ellos el que liga a ambos iones. Todas las metaloproteinasas con iones metálicos co-catalíticos 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.

La termolisina bacteriana es una metalopeptidasa que ha sido ampliamente caracterizada y su estructura cristalográfica indica que el cinc está unido a dos histidinas y un ácido glutámico.

El mecanismo catalítico conduce a la formación de un intermedio tetraédrico no covalente luego de atacar una molécula de agua al cinc unido sobre el grupo carbonilo del enlace escindible. Este intermedio es posteriormente descompuesto por transferencia del protón del ácido glutámico al grupo saliente (Moreau & Choplin, 2005 ,Figura 2.1.5).

Figura 2.1.5. Mecanismo catalítico de las metaloproteinasas.

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 (Bond & Bowles, 1983), de *Canavalia ensiformis* (Dalkin *et al.*, 1983) y de *Fagopyrum esculentum* (Belozersky *et al.*, 1990). Recientemente se han aislado metalopeptidasas de *Arabidopsis thaliana* (Chabregas, 2003).

Las metalopeptidasas muestran máxima actividad a pH cercano a 7,0 y pueden ser inhibidas por acción de agentes quelantes como el EDTA o la 1-10 fenantrolina que bloquean los átomos metálicos esenciales para la catálisis (Dunn, 2001).

2.1.2. Síntesis y transferencia intracelular de las fitopeptidasas cisteínicas

Las peptidasas cisteínicas se sintetizan en los polisomas citoplasmáticos como un precursor o propéptido con dos secuencias escindibles: una N-terminal de corta longitud y otra C-terminal más larga. Esta proenzima inactiva se dirige al lumen del retículo endoplasmático y luego es transportada a las vacuolas o a la pared celular. La mayoría de las proteínas solubles de las plantas poseen una secuencia señal a nivel del C-terminal que le permite ser reconocida por un receptor del aparato de Golgi 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 en estas vacuolas se remueven las secuencias C- y N-terminales del propéptido, quedando la proteína en la conformación nativa que es la estructura química con capacidad de cumplir su función biológica (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

2.1.3. Fitopeptidasas cisteínicas. Endopeptidasas de Bromeliaceae

Las enzimas proteolíticas se hallan ampliamente distribuidas en las plantas superiores y la importancia fisiológica de las mismas radica en que la degradación de las proteínas y la reutilización de sus aminoácidos resultan indispensables para el desarrollo de la planta. En ciertas familias esta clase de enzimas son producidas tan abundantemente que exceden muchísimo la cantidad necesaria para el recambio proteico, razón por la cual se las denominó **proteasas no indispensables o secundarias** (Boller, 1986).

La mayoría de las fitoproteasas estudiadas pertenecen a familias caracterizadas por producir látex (Caricaceae, Moraceae, Asclepiadaceae, Euphorbiaceae). Entre las familias que carecen de laticíferos pero que producen proteasas en cantidades inusuales se destaca la de las Bromeliaceae, siendo *Ananas comosus* L. la especie más estudiada en este sentido y la bromelaína -la proteasa obtenida de tallos y frutos- una de las enzimas más comercializadas, habiéndose descripto numerosas aplicaciones industriales y medicinales de la misma (Uhlig, 1998; Walsh, 2004). La bromelaína fue introducida como compuesto terapéutico en 1.957; sus aplicaciones medicinales incluyen: inhibición de la agregación plaquetaria, actividad fibrinolítica, acción antiinflamatoria, acción antitumoral, modulación de citoquinas e inmunidad, propiedades debridantes de heridas, absorción incrementada de otras drogas, propiedades mucolíticas, auxiliar digestivo, incremento en la cicatrización de heridas y mejoras en la actividad cardiovascular y circulatoria. La bromelina es bien absorbida oralmente y la evidencia disponible indica que sus efectos terapéuticos se incrementan con altas dosis. Aunque no todos los mecanismos de acción están completamente aclarados, ha demostrado ser un suplemento terapéutico efectivo y seguro (Kelly, 1996).

2.1.4. Descripción de peptidasas purificadas de *Ananas comosus*

El conjunto de las endopeptidasas del ananá ha sido conocido bajo la denominación de **bromelina**, término que actualmente se ha reemplazado por el de **bromelaína**. Por otra parte Heinicke (1953) sugirió utilizar dicha denominación para designar en forma genérica a todas las enzimas proteolíticas encontradas en los diversos tejidos de plantas de la familia *Bromeliaceae*, pero en la práctica este criterio nunca fue adoptado y en la actualidad el nombre de bromelaína está reservado a las principales proteasas obtenidas a partir de tallos y frutos de *Ananas comosus* L. Siguiendo esta definición los nombres **bromelaína de tallo** y **bromelaína de fruto** han sido usados para describir a las enzimas responsables de la actividad proteolítica de los jugos de tallos y frutos de ananá, respectivamente.

También se denomina “bromelaína” al polvo comercial obtenido del material de desecho de los tallos de ananá, el cual es empleado en la mayor parte de los estudios de purificación y caracterización de las peptidasas del ananá (Caygill, 1979). Se ha descrito la existencia de hasta seis fracciones proteolíticamente activas en este material (Murachi, 1970; Rowan & Buttle, 1994). Actualmente se acepta la existencia de cuatro endopeptidasas en esta especie: bromelaína de tallo, la principal endopeptidasa del tallo de ananá; bromelaína de fruto, la principal endopeptidasa de fruto (Rowan *et al.*, 1990); y por último las peptidasas ananaína y comosaína, presentes en el tallo de ananá (Rowan *et al.*, 1988, 1990).

La razón de la presencia de varias endopeptidasas diferentes pero relacionadas entre sí en ananá aún no ha sido dilucidada, hecho que también se observa en otros frutos tropicales. Es posible que estas enzimas puedan proveer a la planta de protección contra parásitos, patógenos y herbívoros. Se ha mencionado la presencia de inhibidores naturales de bromelaína en el ananá, lo que regularía la actividad de las proteasas *in vivo* (Perlstein & Kezdy, 1973).

2.1.4.1. Bromelaína de tallo

La bromelaína de tallo constituye casi el 90% del material proteolíticamente activo presente en extractos de tallos de ananá (Rowan *et al.*, 1988). Posee elevada actividad sobre distintos sustratos proteicos, pero sólo actúa eficientemente sobre sustratos sintéticos que contengan uniones Arg-Arg, como también lo hace comosaína (Rowan *et al.*, 1988; Napper *et al.*, 1994). Se ha comunicado una cierta preferencia de la enzima por aminoácidos polares en las posiciones P1 y P1' (Napper *et al.*, 1994). Para una completa actividad de la enzima se requiere la presencia de agentes reductores tales como DTT o cisteína. El pH óptimo, tanto con sustratos sintéticos como proteicos es amplio y cercano a la neutralidad (Rowan & Buttle, 1994).

Una característica distintiva de esta proteasa es su relativamente débil inhibición por E-64 y la carencia de inhibición por cistatina de pollo, lo que la diferencia de la mayoría de las peptidasas de la familia C1. La bromelaína de tallo demostró ser inmunológicamente distinta tanto de la bromelaína de fruto (Rowan *et al.*, 1990) como de la ananaína (Rowan *et al.*, 1988).

La bromelaína de tallo está formada por una única cadena polipeptídica glicosilada de 24,5 kDa (Harrach *et al.*, 1995), con un pI = 9,55 (Murachi, 1970), conteniendo siete residuos Cys (Napper *et al.*, 1994; Harrach *et al.*, 1995) y por lo tanto probablemente tres puentes disulfuro. La secuencia aminoacídica completa ha sido deducida por Ritonja *et al.* (1989), demostrando que su N-terminal es diferente al de las otras endopeptidasas del ananá (Napper *et al.*, 1994).

2.1.4.2. Bromelaína de fruto

La bromelaína de fruto constituye el 30-40% de las proteínas totales y representa casi el 90% del material proteolíticamente activo de fruto (Murachi, 1970). Un sustrato sintético apropiado para bromelaína de fruto es Bz-Phe-Val-Arg-NHMec (Rowan *et al.*, 1990). La bromelaína de fruto tiene mayor actividad proteolítica que bromelaína de tallo (Rowan *et al.*, 1990) y, al igual que ésta, tiene un amplio rango de pH óptimo cercano a la neutralidad frente a sustratos proteicos y sintéticos (Rowan & Buttle, 1994).

Esta enzima está constituida por una cadena polipeptídica simple de aproximadamente 25 kDa (Rowan *et al.*, 1990), cuyo pI es 4,6 (Ota *et al.*, 1964). No está claro si se trata de una glicoproteína (Ota *et al.*, 1985; Yamada *et al.*, 1976). La secuencia N-terminal es muy semejante a la de bromelaína de tallo (Yamada *et al.*, 1976), pero es inmunológicamente distinta de ésta y de ananaína (Rowan *et al.*, 1990). A diferencia de lo que ocurre con bromelaína de tallo, Z-Arg-Arg-NHMec no es un sustrato apropiado para bromelaína de fruto (Rowan *et al.*, 1990).

2.1.4.3. Ananaína

Por cromatografía de un extracto de tallo de ananá fueron obtenidas dos fracciones menores denominadas en principio glicínesterasas A y B, que presentaron diferente perfil de actividad respecto de la bromelina de tallo, sobre sustratos sintéticos del tipo peptidil-nitrofenil ésteres (Silverstein, 1974). Al analizar una preparación comercial cristalina de bromelaína, Gounaris *et al.* (1984) encontraron que sus componentes no eran inhibidos de igual manera por el quininógeno. Posteriormente se logró purificar una enzima distinta a la bromelaína de tallo, con actividad frente a Z-Phe-Arg-NHMec, a la que se denominó ananaína, que representa el 5% de las proteínas totales del extracto de tallo de ananá (Rowan *et al.*, 1988; Napper *et al.*, 1994).

Ananaína muestra mayor preferencia por sustratos con aminoácidos polares en la posición P1'; el requerimiento para el sitio P1 es mucho menos específico (Napper *et al.*, 1994), mientras que en el sitio P2 manifiesta preferencia por una cadena lateral hidrofóbica (Rowan *et al.*, 1990). El pH óptimo tanto con sustratos sintéticos como proteicos es cercano a la neutralidad (Rowan & Buttle, 1994).

Ananaína no es glicosilada y está formada por una cadena proteica simple de 23,5 kDa (Rowan *et al.*, 1988; Napper *et al.*, 1994; Harrach *et al.*, 1995), de pI > 10 (Rowan *et al.*, 1988; Harrach *et al.*, 1995), y que presenta una A_{1%,280} de 16,5 (Rowan *et al.*, 1988). Al igual que la bromelaína de tallo contiene siete residuos Cys (Napper *et al.*, 1994). La secuencia completa de ananaína ha sido determinada y comparada con bromelaína de tallo y otras proteinasas

cisteínicas (Lee *et al.*, 1997). El modelado por homología muestra una alta similitud estructural con caricaína y papaína (proteinasas de *Carica papaya*). El análisis de la secuencia aminoacídica demuestra que ananaína es diferente del resto de las endopeptidasas de ananá, e indica que ésta tiene el menor número de cargas negativas de todas las cisteinproteinasas vegetales (Carter *et al.*, 2000). El comportamiento de la enzima frente a los inhibidores es similar al de la papaína, ya que es eficientemente inhibida tanto por cistatina de pollo como por E-64 (Rowan *et al.*, 1988)..

Ananaína demostró ser inmunológicamente distinta de bromelaína de fruto y de bromelaína de tallo (Rowan *et al.*, 1990). El procesamiento de proananaína, un precursor de 39 kDa, requiere pH 4 y ocurre a través de la formación de intermediarios. Esta enzima no presenta un residuo de carga negativa análogo al Asp 158 de la papaína, lo cual propone un mecanismo catalítico diferente al de las otras cisteinilpeptidasas (Carter *et al.*, 2000).

2.1.4.4. Comosaína

Partiendo de extracto crudo de tallo de ananá fue aislada una fracción de elevado pI, que demostró contener dos componentes (Rowan *et al.*, 1990; Napper *et al.*, 1994), uno de los cuales fue ananaína y el otro fue denominado comosaína (nombre derivado del epíteto específico del ananá), que podría ser una de las glicinesterasas primero descriptas por Silverstein (1974).

Comosaína es la endopeptidasa menos abundante del extracto de tallo de ananá y representa menos del 1% de las proteínas totales (Napper *et al.*, 1994). Tiene actividad sobre Z-Arg-Arg-NHMec (Rowan *et al.*, 1990) y muestra preferencia por residuos polares tanto en el sitio P1 como P1'; presenta una actividad proteolítica muy elevada y es inhibida por E-64 (Napper *et al.*, 1994). Se trata de una glicoproteína de 24.5 kDa y pI > 10, que contiene siete residuos Cys, con una composición similar en carbohidratos a la bromelaína de tallo, pero es marcadamente diferente en su composición aminoacídica (Napper *et al.*, 1994). Los datos de la secuencia N-terminal demuestran que comosaína es distinta de las otras endopeptidasas de ananá (Napper *et al.*, 1994; Rowan & Buttle, 1994).

2.1.5. Isoenzimas

La elevada resolución de los métodos empleados actualmente en la determinación de componentes enzimáticos de una muestra permite observar la presencia de un mayor número de ellos en muestras que, con metodología de menor resolución, parecen ser puras. Las **formas múltiples** de estas enzimas pueden ser entidades reales (diferencias genéticas, diferente procesamiento postraduccional, presencia de diversas subunidades, entre otras) o aparecer como artefactos durante la purificación. Por este motivo surgieron muchos términos diferentes para designar a estas enzimas y fue necesario un ordenamiento al respecto (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/isoen.html>).

La Unión Internacional de Bioquímica designó un subcomité que publicó en 1964 listados de normas a seguir, que luego fueron revisados por un subcomité de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica (CBN) de IUPAC-IUB y las recomendaciones realizadas fueron publicadas en 1971. Un nuevo subcomité fue posteriormente designado para unificar la nomenclatura de las enzimas modificadas covalentemente. El informe de este subcomité fue recibido por la CBN en 1972 y las recomendaciones fueron finalmente adoptadas en 1976. A continuación se describen los puntos más sobresalientes de las recomendaciones de la CBN.

1. La designación **formas múltiples de una enzima** debe ser utilizada como un término amplio que cubre todas las proteínas que catalizan la misma reacción y están presentes naturalmente en una especie única.
2. El término **isoenzima** o **isozima** debe aplicarse sólo a aquellas formas múltiples de enzimas que provienen de diferencias genéticamente determinadas en la estructura primaria y no a aquellas obtenidas por modificación de la secuencia primaria.
3. Las isoenzimas o sus subunidades no deberían ser designadas sobre la base de su distribución en los tejidos. Estas variaciones son comúnmente denominadas **isoformas**, como por ejemplo las formas múltiples de la fosfatasa

alcalina ósea, renal, placentaria y hepática (G. Casals Mercadal & J.M. Augé Fradera, 2004). No es conveniente reconocerlas como isoenzimas debido a la variación existente entre especies; estas formas homólogas pueden ocurrir en tejidos totalmente diferentes en especies diferentes.

4. Las **subunidades** pueden ser denotadas por números romanos o letras griegas, pero no por términos que hagan referencia a su distribución tisular.

5. En el caso de aislamiento de nuevas **aleloenzimas** o variantes genéticas, el nombre sistemático o trivial de la enzima normal debería ser usado, seguido de un nombre trivial para la variante descubierta, que puede relacionarse con la ciudad, universidad, país, etc. donde se la identificó.

6. Una **enzima interconvertible** es la que existe en al menos dos formas bien definidas reversiblemente convertibles, producidas por modificaciones covalentes de aminoácidos en condiciones biológicas. No se incluyen en esta definición los intermediarios modificados covalentemente que aparecen durante el proceso catalítico. Las formas interconvertibles pueden ser designadas por las letras **o** y **m** para las formas **original** y **modificada**, respectivamente.

7. Algunas formas múltiples de enzimas surgen como el resultado de proteólisis u otra modificación irreversible en condiciones biológicas. Para éstas, el precursor inactivo se denominará adicionando el sufijo **ógeno** al nombre de la enzima activa.

Algunos ejemplos de formas múltiples de enzimas se incluyen en la Tabla 2.1.1.

Tabla 2.1.1. Formas Múltiples de enzimas^a

Grupo	Razón de la multiplicidad de formas	Ejemplo
1	Proteínas genéticamente independientes ^b	Malato deshidrogenasa en mitocondria y citosol
2	Heteropolímeros (híbridos) de dos o más cadenas polipeptídicas, no covalentemente unidas ^b	Formas híbridas de lactato deshidrogenasas
3	Variantes genéticas (aleloenzimas) ^b	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasas humanas
4	Proteínas conjugadas o derivadas a. Proteínas conjugadas con otros grupos b. Proteínas derivadas de cadenas polipeptídicas simples	Fosforilasa <i>b</i> , glicógeno sintasa <i>a</i> Familia de quimotripsinas proveniente de quimotripsinógeno
5	Polímeros de una subunidad simple	Glutamato deshidrogenasa de masa molecular 1,000,000 y 250,000
6	Diferentes formas conformacionales	Todas las modificaciones alostéricas de enzimas

^a Los artefactos que ocurren durante la preparación no están incluidos en esta tabla.

^b Estas clases caen dentro de la categoría de isozimas.

2.1.6 Cinética enzimática

Una manera de distinguir entre sí las formas múltiples de enzimas que se encuentran en una muestra es mediante la determinación de especificidad por diferentes sustratos sintéticos y el cálculo posterior de las constantes cinéticas, hecho realizado por ejemplo con las proteasas de ananá citadas en el apartado 2.1.4.

La **cinética enzimática** es la rama de la enzimología que estudia los factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas. Los más importantes son: la concentración de enzima, la concentración de los ligandos (sustratos, productos, activadores e inhibidores), el pH, la fuerza iónica y la temperatura. Cuando todos estos factores se analizan de una manera adecuada se puede conocer mucho acerca de la naturaleza de una enzima. Por otra parte el conocimiento de los principios básicos de la cinética enzimática es fundamental para la aplicación correcta en la práctica de los ensayos o análisis enzimáticos, los que constituyen una herramienta analítica muy poderosa no sólo para la bioquímica, sino también para la biotecnología (Chávez *et al.*, 1990).

2.1.6.1. Utilización de la velocidad inicial

Cuando se grafica la concentración de producto (o consumo de sustrato) en función del tiempo de una reacción catalizada enzimáticamente se obtiene la

curva de progreso de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato y la concentración de producto $[P]$ se hace constante. Por este motivo se mide la velocidad inicial de la reacción (v_0), que es un parámetro constante en una cinética de primer orden.

La v_0 de la reacción es igual a la pendiente de la curva de progreso de la reacción a tiempo cero (Figura 2.1.5). De esta forma, la medida de v_0 se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la concentración de sustrato $[S]$ como esencialmente constante a lo largo del experimento. Además, en estas condiciones no es necesario considerar la reacción inversa, ya que la cantidad de producto formada es tan pequeña que la reacción inversa apenas ocurre. De esta forma se simplifican cuantiosamente las ecuaciones de velocidad.

Figura 2.1.5 Curva de avance de una reacción

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato $[S]_0$ sobre la v_0 de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. Si representamos los datos experimentales de v_0 frente a $[S]_0$ obtenemos una gráfica como la de la Figura 2.1.6. Cuando $[S]_0$ es **pequeña**, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato y por lo tanto la reacción es de **primer orden**. A **altas** $[S]_0$, la enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de

$[S]_0$. En este punto, la reacción es de **orden cero** y la **velocidad es máxima** ($V_{\max}$) (Stryer, 2002).

Figura 2.1.6. Representación de la variación de la v_0 en función de la $[S]_0$

2.1.7.2. Cinética michaeliana (Dixon & Webb, 1979)

Los estudios sistemáticos del efecto de la $[S]_0$ sobre la actividad enzimática comenzaron a realizarse a fines del siglo XIX. Ya en 1882 se introdujo el concepto del complejo enzima-sustrato como intermediario del proceso de catálisis enzimática. En 1913 Leonor Michaelis y Maud Menten desarrollaron esta teoría y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de las enzimas .

Para explicar la relación observada entre la v_0 y la $[S]_0$ Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas. En la primera etapa se forma el complejo enzima-sustrato (ES), que dará lugar en la segunda etapa a la formación del producto (P) liberando la enzima libre (E):

En este esquema, k_1 , k_2 y k_3 son las constantes cinéticas individuales de cada proceso y también reciben el nombre de **constantes microscópicas** de

velocidad. Del esquema se pueden deducir las ecuaciones para las velocidades de cada una de las reacciones que ocurren:

$$v_1 = k_1 [E] [S]$$

$$v_2 = k_2 [ES]$$

$$v_3 = k_3 [ES]$$

Se puede distinguir entre las moléculas de enzima libre [E] y las unidas al sustrato [ES] de forma tal que la concentración total de enzima [ET], que es constante a lo largo de la reacción es:

$$[ET] = [E] + [ES]$$

Como $[E] = [ET] - [ES]$ multiplicando cada término por $k_1[S]$ resulta que:

$$v_1 = k_1[S] [ET] - k_1 [S] [ES]$$

Este modelo cinético adopta la hipótesis del **estado estacionario**, según la cual la concentración del complejo ES es pequeña y constante a lo largo de la reacción, como se observa en la Figura 2.1.7.

Por lo tanto, si la concentración de [ES] es constante, su velocidad de formación (v_1) es igual a la de su disociación ($v_2 + v_3$):

$$v_1 = v_2 + v_3$$

Además, como [ES] es constante, la velocidad de formación de los productos (v) es constante:

$$v = v_3 = k_3 [ES] = \text{constante.}$$

Como $v_1 = v_2 + v_3$, reemplazando cada término podemos decir que:

$$k_1[S] [ET] - k_1 [S] [ES] = k_2 [ES] + k_3 [ES]$$

Despejando [ES], queda que:

$$[ES] = \frac{[ET] [S]}{K_M + [S]}$$

$$\text{donde } K_M = (k_2 + k_3)/k_1$$

siendo K_M la **constante de Michaelis-Menten**. Por lo tanto, en el estado estacionario, la velocidad de formación del producto es:

$$v = v_3 = k_3 [ES] = \frac{k_3 \cdot [ET] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ecuación general de la velocidad}$$

Figura 2.1.7. Comportamiento de las concentraciones de los participantes de una reacción catalizada enzimáticamente bajo condiciones de estado estacionario.

Para cualquier reacción enzimática [ET], k_3 y K_M son constantes. A partir del modelo de Michaelis-Menten se puede explicar lo observado experimentalmente para concentraciones de sustrato muy pequeñas o muy elevadas:

1. A $[S] \ll K_M$

$$v = (k_3 [ET]/K_M) [S]$$

Como los términos entre paréntesis son constantes, pueden englobarse en una nueva constante, k_{obs} , de forma que la expresión queda reducida a: $v = k_{obs} [S]$, con lo cual la reacción es un proceso cinético de **primer orden**.

2. A $[S] \gg K_M$

$$v = k_3 [ET]$$

La velocidad de reacción es independiente de la concentración del sustrato, y por tanto, la reacción es un proceso cinético de **orden cero**. Además, tanto k_3 como $[ET]$ son constantes, y nos permite definir un nuevo parámetro, la velocidad máxima de la reacción (V_{max}):

$V_{max} = k_3 [ET]$, que es la velocidad que se alcanzaría cuando toda la enzima disponible se encuentra unida al sustrato.

Si introducimos el parámetro $V_{\max}$ en la ecuación general de la velocidad, obtenemos la expresión más conocida de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Hay enzimas cuyo comportamiento cinético no obedece la ecuación de Michaelis-Menten. Se dice que su cinética no es michaeliana. Esto ocurre con las enzimas **alostéricas**, cuya gráfica v_0 frente a $[S]_0$ no es una hipérbola, sino una sigmoide (Figura 2.1.8). En la cinética sigmoidea, pequeñas variaciones en la $[S]$ en una zona crítica (cercana a la K_M) se traduce en grandes variaciones en la velocidad de reacción (Lehninger, 2004).

Figura 2.1.8. Comportamiento cinético de una enzima alostérica.

2.1.7.3. Cálculo de la K_M y de la $V_{\max}$ de una enzima (Lodish, 2004)

La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten, v_0 frente a $[S]_0$, es una hipérbola (Figura 2.1.9) como se explicó en el apartado anterior. La $V_{\max}$ corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental, y la K_M corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la $V_{\max}$.

Para determinar los valores de K_M y $V_{\max}$ se pueden utilizar herramientas informáticas como los programas Sigma Plot 8.0 Enzyme Kinetics Module (Systat Software) u Origin 6.1 (OriginLab) que realizan regresiones no lineales

de datos y calculan los parámetros cinéticos a partir de los datos experimentales.

Figura 2.1.9. Cálculo de los parámetros cinéticos en una enzima de comportamiento Michaeliano.

También se puede linealizar la ecuación de Michaelis mediante diversas transformaciones algebraicas, como la representación doble recíproca ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$), que corresponde a la ecuación de una recta y recibe el nombre de representación de Lineweaver-Burk (Figura 2.1.10). En esta ecuación la pendiente es la relación K_M/V_{max} , la abscisa en el origen ($1/v_0 = 0$) es $-1/K_M$ y la ordenada en el origen ($1/[S]_0 = 0$) es $1/V_{max}$.

De esta forma, a partir de los datos experimentales se puede calcular gráficamente, los valores de K_M y V_{max} de una enzima para diversos sustratos (<http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ3.htm#ae>).

Figura 2.1.10. Linealización doble recíproca de Lineweaver-Burk

2.1.7.4. Significado de los parámetros cinéticos

Para caracterizar una enzima se determinan sus constantes cinéticas. Ellas son la K_M , la V_{max} , la k_{cat} y la relación k_{cat} / K_M .

K_M y V_{max} son parámetros que se pueden obtener experimentalmente de manera sencilla pero proporcionan muy poca información acerca del número, velocidad o naturaleza química de especies intervinientes en la reacción. Para enzimas de comportamiento michaeliano se puede considerar a la K_M como una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato, pero la realidad muestra una situación más compleja donde K_M sería una constante de disociación aparente que puede ser tratada como una constante global de disociación de todos los complejos enzimáticos intermediarios, y no muestra una relación sencilla con la afinidad por el sustrato (Lehninger, 2004).

La V_{max} es una velocidad inicial que representa la máxima eficiencia catalítica de una enzima frente a un sustrato específico, a una dada concentración de enzima y determinadas condiciones de reacción.

La constante catalítica o cinética, **k_{cat}** , es calculable en cinéticas michaelianas como $V_{max}/[E_0]$, sólo si la enzima se halla purificada. En el mecanismo catalítico sencillo de Michaelis-Menten donde hay un solo complejo intermediario y todas las etapas de disociación son rápidas, k_{cat} es la

constante de primer orden para la conversión química del complejo ES en EP. Para reacciones más complicadas, k_{cat} es una función de todas las constantes de velocidad de primer orden y no puede ser asignada a un proceso particular, con excepción que se presenten algunas características que simplifiquen el proceso. La k_{cat} se denomina frecuentemente **número de recambio** de una enzima porque representa el número máximo de moléculas de sustrato transformadas en producto por sitio activo y por unidad de tiempo, o el número de veces que la enzima recambia por unidad de tiempo.

Se denomina **constante de especificidad** a la relación k_{cat}/K_M . A bajas concentraciones de sustrato la velocidad viene dada como dependiente de la concentración de E_0 y de S_0 , por lo tanto k_{cat}/K_M es una constante de velocidad de segundo orden. Es importante pues relaciona la velocidad de reacción con la concentración de enzima libre. La relación k_{cat}/K_M determina la especificidad para sustratos que compiten por una misma enzima debido a que esta relación no es afectada por uniones no productivas, ni por acumulación de intermediarios. Los valores de k_{cat}/K_M no pueden ser mayores que cualquiera de las constantes de velocidad para la asociación de la enzima y del sustrato. Es una constante de velocidad aparente de segundo orden que describe las propiedades y reacciones de la enzima y del sustrato libres (Chávez, 1990).

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Purificación cromatográfica (FPLC)

2.2.1.1. Preparación de las muestras

Como material de partida para las primeras etapas de purificación cromatográfica se utilizó el PAR obtenido con cuatro volúmenes de acetona que fue redissuelto en el buffer de la cromatografía y filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa especialmente tratada para minimizar la unión de proteínas y con un tamaño de poro de 0,22 μm .

En el caso de las recromatografías se sembraron fracciones recolectadas en la cromatografía precedente, debe tenerse en cuenta que estas muestras eluyen de la columna diluidas y con una cierta concentración de cloruro de sodio, por lo que se debió proceder a su desalado y concentración previamente a su siembra. Dichas muestras fueron desaladas y concentradas por ultrafiltración empleando filtros Millipore (Amicon Ultra-15, 10000 MWCO) o por precipitación con cuatro volúmenes de acetona, centrifugación y redisolución de los precipitados en el buffer de corrida de la siguiente etapa cromatográfica.

2.2.1.2. Estrategia de purificación

Todas las etapas de purificación cromatográfica se llevaron a cabo a 20°C empleando el sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia) utilizando una columna XK 16/40 de Pharmacia con adaptadores. La estrategia de purificación se elaboró en base al resultado del isoelectroenfoque y del zimograma realizados al PAR (*cfr.* 1.3.6). La diversidad de los valores de punto isoeléctrico de las fracciones activas motivó el empleo de intercambiadores aniónicos y catiónicos a diferentes valores de pH y gradientes salinos específicos para obtener cada fracción pura.

Se realizaron más de 150 cromatografías para purificar y caracterizar adecuadamente las endopeptidasas presentes en el PAR.

Los protocolos desarrollados se consignan a continuación:

- Intercambiador catiónico fuerte (sulfopropil Sepharosa Fast Flow, SP-FF) equilibrado con buffer Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5, utilizando gradientes de NaCl comprendidos entre 0-0,5 M y 0-0,15 M.
- Intercambiador catiónico débil (carboximetil Sepharosa Fast Flow, CM-FF) equilibrado con buffer Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5, utilizando gradientes de NaCl comprendidos entre 0-0,25 M y 0-0,15 M, logrando mejor resolución con gradiente quebrado.
- Intercambiador catiónico débil (CM-FF) equilibrado con buffer Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, empleando un gradiente de NaCl 0-0,3 M.
- Intercambiador catiónico débil (CM-FF) equilibrado con buffer fosfatos 0,05 M, a pH 7,0; 6,8; 6,4; 6,2 y 6,0, eluyendo con un gradiente de NaCl 0-0,4 M.
- Intercambiador aniónico débil (dietilaminoetil Sepharosa, DEAE-FF) equilibrado con buffer Tris-HCl 0,05 M, pH entre 8,5 y 7,5 empleando gradientes de NaCl 0-0,5 M y 0-0,3 M.
- Intercambiador aniónico fuerte (trimetil amonio metileno Sepharosa High Performance, Q-HP) equilibrado con Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5, aplicando distintos gradientes de NaCl, de 0-0,5 M a 0-0,2 M.
- Intercambiador aniónico fuerte (Q-HP) equilibrado con Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5, utilizando distintos gradientes de NaCl quebrados en dos o tres etapas, de 0-0,25 M a 0-0,6 M.

A continuación se detalla el esquema de purificación final empleado para obtener tres fracciones purificadas de la muestra.

2.2.1.3. Purificación de hieronymaína I

Se utilizaron dos etapas cromatográficas de intercambio catiónico. El intercambiador empleado en ambos casos fue CM-Sepharose FF y el volumen de columna fue de 30 ml. El volumen de muestra sembrado fue de 10 ml.

En la primera etapa la columna fue equilibrada a pH 8,0 con buffer Tris-HCl 50 mM y se eluyó con un gradiente salino quebrado: en la primera parte se aplicó una pendiente más abrupta (NaCl 0,0 a 0,1 M en 20 min) y en la segunda una pendiente menor (NaCl 0,1 a 0,15 M en 70 min).

Para la recromatografía la columna se equilibró a pH 7,5 con buffer Tris-HCl 50 mM, empleando luego un gradiente salino de NaCl 0,0 a 0,3 M en 60 min. En todos los casos la velocidad de elución fue de 1 ml/min y se recolectaron fracciones en alícuotas de 2 ml.

2.2.1.4. Purificación de hieronymaína II

En este caso el intercambiador utilizado fue Q-Sepharose HP (volumen de columna 33 ml; volumen de muestra sembrada, 10 ml), equilibrado con buffer Tris-HCl 50 mM de pH 8,5 y se eluyó con un gradiente salino quebrado de cloruro de sodio (primera etapa: 20 min de 0,0-0,10 M de NaCl; segunda etapa: 160 min con menor pendiente, de 0,1-0,3 M de NaCl). Las fracciones se recolectaron en alícuotas de 2 ml y la velocidad de flujo fue 1 ml/min.

Este cromatograma mostró dos fracciones retenidas que presentaron actividad caseinolítica, a partir de las cuales se purificaron dos endopeptidasas.

La primera fracción activa fue recromatografiada en un intercambiador catiónico fuerte, SP-Sepharose HP (33 ml), utilizando como buffer ácido cítrico-citrato de sodio 20 mM de pH 5,6 y eluida con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0,0-0,4 M en 140 min. Se recolectaron fracciones de 3 ml y la velocidad de flujo fue de 1 ml/min.

2.2.1.5. Purificación de hieronymaína III

Para obtener hieronymaína III se recromatografió la segunda fracción retenida activa obtenida en el primer cromatograma del apartado 2.2.1.2 en SP-Sepharose HP (33 ml), pero utilizando en este caso buffer ácido cítrico-citrato de sodio 20 mM de pH 4,5 y eluida con un gradiente lineal de cloruro de sodio desde 0,0 hasta 0,25 M en 140 min. Se recolectaron fracciones de 3 ml y la velocidad de un flujo fue de 1 ml/min.

2.2.2. Actividad caseinolítica

Con la finalidad de establecer si los picos de los cromatogramas que muestran absorbancia a 280 nm contenían endopeptidasas, se determinó la actividad caseinolítica al contenido de cada tubo colectado, siguiendo el

protocolo descrito en el apartado 1.2.6.1. El tiempo de incubación de la reacción de hidrólisis fue de 30 min.

2.2.3. Caracterización de las fracciones activas

Las fracciones activas de mayor interés fueron analizadas para determinar su homogeneidad y luego caracterizadas, para lo cual se realizaron los estudios descritos en el capítulo anterior: determinación del contenido de proteínas (*cfr.* 1.2.4), efecto de inhibidores (*cfr.* 1.2.8), activación con cisteína (*cfr.* 1.2.9), determinación del perfil de pH óptimo (*cfr.* 1.2.10), SDS-PAGE (*cfr.* 1.2.14), isoelectroenfoque (*cfr.* 1.2.15) y zimograma (*cfr.* 1.2.16).

2.2.4. Titulación del sitio catalítico

Para determinar la proporción de moléculas de enzima activas, se midió la actividad enzimática utilizando caseína como sustrato luego de incubar la enzima con diferentes concentraciones de E-64, un inhibidor específico de proteasas cisteínicas que reacciona únicamente con el grupo sulfhidrilo del centro activo en la relación 1:1. El método utilizado es una modificación del desarrollado por Barrett *et al.* (1982). Fracciones (75 μ l, 3 μ M) de enzima fueron incubadas con 25 μ l de concentraciones diferentes (0 a 10 μ M) de E-64 durante 30 min a 37°C. La actividad residual fue ensayada sobre caseína al 1% con el agregado de cisteína 20 mM a pH 9,75. La molaridad de enzima fue calculada utilizando los datos de masa molecular (determinada por MS MALDI-TOF) y de concentración de proteínas (Bradford, 1976).

De esta manera se obtuvo la concentración mínima de E-64 capaz de inhibir totalmente a la preparación. Luego se calculó el porcentaje de enzima activa en la muestra (Barrett & Kirschke, 1981).

2.2.5. Sustratos sintéticos: actividad y cinética

Para cada sustrato empleado se realizaron ensayos previos para determinar si las enzimas poseían o no actividad hidrolítica sobre ellos.

En caso afirmativo se realizaron determinaciones sobre un rango adecuado de concentraciones de sustrato y se calcularon las constantes cinéticas. Las medidas de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro UV-visible

Agilent 8453E con celda termostatzada y se realizaron triplicados de la muestra y del blanco en todos los casos.

2.2.5.1. N- α -CBZ-*p*-Nitrofenil ésteres de aminoácidos

Se ensayó la actividad de las proteasas purificadas sobre los cinco N- α -CBZ-L-aminoácidos *p*-nitrofenil ésteres que fueron hidrolizados por el PAR: los derivados de Ala, Asp, Gln, Gly y Lys. La técnica empleada fue la misma que se utilizó con el PAR, descrita en el inciso 1.2.6.2 y la mezcla de reacción se detalló en la Tabla 1.2.3. De esta manera se determinaron las unidades Ucbz de las tres enzimas purificadas sobre los cinco sustratos enumerados.

Por otra parte se obtuvieron los parámetros cinéticos de cada una de las fracciones purificadas sobre aquellos derivados que mostraron mayor actividad esterásica. Se utilizaron concentraciones de sustrato en stock entre 0,25 y 5,0 mM.

2.2.5.2. P-Glu-Phe-Leu-*p*-nitro-anilida (PFLNA)

La reacción se llevó a cabo como se muestra en la Tabla 2.2.1. La actividad amidásica fue determinada a 410 nm y a 37°C, midiendo la cantidad de *p*-nitroanilina liberada por la hidrólisis del sustrato. Se tomó como base el protocolo descrito por Filippova *et al.* (1984).

Tabla 2.2.1. Ensayo de actividad sobre PFLNA.

Tubo de reacción	Muestra	Blanco
Sustrato 1 mM (en DMSO)	180 μ l	180 μ l
Buffer TRIS-HCl 0.1 M, pH 8,0, EDTA 0,1 mM, KCl 0,1M y DTT 3 mM	1,5 ml	1,85 ml
Muestra	120 μ l	-
Agua	-	120 μ l
Lectura de la absorbancia a 410 nm cada 5 s durante 4 min		

Para obtener los parámetros cinéticos se utilizó la misma técnica pero empleando sustrato en stock de concentraciones entre 0,25 y 5,0 mM.

2.2.5.3. Z-Phe-Arg-*p*-nitro-anilida y Z-Arg-Arg-*p*-nitro-anilida

En estos sustratos, el ensayo fue llevado a cabo según el protocolo detallado en la Tabla 2.2.2, que es similar al descrito por Lee *et al.* (1997) y

el progreso de la reacción fue seguido midiendo la absorbancia del producto a 410 nm y 37 °C a intervalos de 5 segundos.

Tabla 2.2.2. Ensayo de actividad sobre Z-Phe-Arg-*p*-nitro-anilida y Z-Arg-Arg-*p*-nitro-anilida.

Tubo de reacción	Muestra	Blanco
Sustrato 1 mM (en DMSO)	50 µl	50 µl
Buffer TRIS-HCl 0.1 M, pH 8,0, EDTA 4 mM y DTT 8 mM	1,35 ml	1,35 ml
Muestra	600 µl	-
Agua	-	600 µl
Lectura de la absorbancia a 410 nm cada 5 s durante 4 min		

Para calcular las constantes cinéticas el rango de concentración de sustrato empleado fue de 0,25 a 10 mM.

2.2.6. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas ha sido considerada durante mucho tiempo como el método más seguro y sensible para obtener la información sobre el peso molecular de moléculas pequeñas. La incorporación de procesos suaves de ionización como el de desorción/ionización por matriz asistida con láser (MALDI) permiten ahora la detección de proteínas y de otros biopolímeros (Thiede, 1997).

Se utilizó un equipo MALDI-TOF-TOF para determinar el grado de pureza y la masa molecular de las endopeptidasas purificadas. Las muestras fueron mezcladas con la matriz constituida por ácido sinapínico disuelto en ácido trifluoroacético al 1%. El espectro de masas fue obtenido con un espectrómetro Bruker modelo Ultraflex equipado con láser de nitrógeno (337 nm con pulsos de 1-5 ns) y una fuente de aceleración de iones de 25 kV, utilizando tripsinógeno bovino para su calibración interna.

2.2.7. Secuenciamiento del extremo N-terminal

Esta determinación se realizó con el objeto de determinar la homogeneidad de las fracciones purificadas y para realizar comparaciones con datos bibliográficos de secuencia de otras endopeptidasas. El extremo N-terminal de las proteasas purificadas fue obtenido utilizando un secuenciador automático de péptidos (Applied Biosystems model 476) que utiliza el método

degradativo de Edman. Se registró el porcentaje de identidad con otras proteasas utilizando el servicio BLAST (Altschul *et al*, 1997) disponible en internet.

2.2.8. Clonado de una peptidasa de *Bromelia hieronymi* Mez

2.2.8.1. Diseño de cebadores (“primers”) específicos

Como primer paso se compararon las secuencias N-terminales de las tres endopeptidasas purificadas de *Bromelia hieronymi* con las de peptidasas pertenecientes a *Ananas comosus*. De esta especie, fueron seleccionadas bromelaína de tallo y bromelaína de fruto por presentar los porcentajes de identidad más elevados con hieronymaína I, II y III. Luego se recopiló información de las secuencias nucleotídicas de las peptidasas de *Ananas comosus* mencionadas, empleándose para ello el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Finalmente, se puso especial atención en aquellos aminoácidos donde la secuencia proteica de las peptidasas de *Bromelia hieronymi* era diferente de la secuencia de las bromelaínas. Los codones de los cebadores correspondientes a esos aminoácidos se diseñaron conservando la mayor cantidad de nucleótidos que presentaban las secuencias de las bromelaínas, pero respetando la identidad del aminoácido correspondiente de las hieronymaínas. De esta manera se diseñaron los oligonucleótidos de la Tabla 2.2.3 como cebadores directos.

Tabla 2.2.3. Diseño de cebadores.

Secuencia de bromelaína de tallo	A	V	G	Q	S	I	D	W	R
cDNA de bromelaína de tallo	GCG	GTG	GGT	CAA	AGT	ATT	GAT	TGG	AGA
Secuencia de bromelaína de fruto	A	V	P	Q	S	I	D	W	R
cDNA de bromelaína de fruto	GCG	GTG	CCT	CAA	AGT	ATT	GAT	TGG	AGA
Secuencia N-terminal hieronymaína I	A	L	P	E	S	I	D	W	R
Secuencia cebador Nt-H1 →	GCG	CTG	CCT	GAA	AGT	ATT	GAT	TGG	AGA [*]
Secuencia N-terminal hieronymaína II	A	V	P	Q	S	I	D	W	R
Secuencia cebador Nt-H2-3 →	GCG	GTG	CCT	CAA	AGT	ATT	GAT	TGG	AGA [*]

^{*}Las adeninas resaltadas en negrita no formaron parte de los cebadores

Además fue necesario emplear cebadores reversos (Tabla 2.2.4) como el oligonucleótido $R_0R_{1\text{polid}}(T)$ que fue utilizado en la reacción de retrotranscripción (*cfr.* 2.2.8.3.1), y el cebador R_0 utilizado en las reacciones de PCR (*cfr.* 2.2.8.3.2).

Tabla 2.2.4. Cebadores reversos.

Nombre	Secuencia
R_0	5'-CCGGAATTCACTGCAG 3'
$R_0R_{1\text{polid}}(T)$	5'-CCGGAATTCACTGCAGGGTACCCAATACGA CTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

2.2.8.2. Extracción del RNA total de fruto

Se colocaron trozos de frutos (aproximadamente 2 g) de *Bromelia hieronymi* sin semillas en un mortero colocado en baño de hielo. La muestra fue triturada en presencia de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvillo fino y homogéneo. Rápidamente se pesaron fracciones de 0,2 g, las cuales se utilizaron para la extracción de RNA total utilizando el kit Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit, Invitex. Este kit cuenta con dos posibles buffers de lisis (RP y DCT), por lo que se obtuvieron dos extractos diferentes. Dicha extracción, que emplea cromatografía en microcolumnas, fue llevada a cabo siguiendo las indicaciones descriptas por el fabricante. El RNA se eluyó con 50 µl buffer de elución provisto por el kit.

2.2.8.3. RACE-PCR

La RACE¹-PCR² (Frohman *et al.*, 1988) es una técnica diseñada para conocer la secuencia de los extremos de un RNA. Con este método se generan cDNAs (obtenidos por PCR) que incluyen copia de la secuencia del extremo 3' o 5' del RNA (3'RACE o 5'RACE, respectivamente). La estrategia consiste en añadir una secuencia diana (secuencia inespecífica) en el extremo del cDNA que se desea obtener, para amplificar luego una secuencia del gen buscado empleando un cebador específico.

¹ RACE = Rapid Amplification of cDNA Ends (amplificación rápida de extremos de cDNA).

² PCR = Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

La 3'RACE-PCR consta de una primera etapa de retrotranscripción (RT) en la que se adiciona la secuencia diana unida a un homopolímero polidT y de una segunda etapa en la que se amplifican por PCR los cDNAs específicos utilizando dos cebadores, uno correspondiente a la secuencia del gen buscado y otro a la secuencia diana.

2.2.8.3.1. Reacción de retrotranscripción (RT)

Esta reacción tiene como finalidad la obtención de moléculas de cDNA a partir de moléculas de RNA mensajero, utilizando la secuencia de poli-A que poseen en su extremo 3' terminal. Para la obtención de la primer cadena de cDNA se utilizó un kit comercial ("First Strand cDNA Síntesis Kit for RT-PCR, AMV³", Roche) y se empleó el primer R₀R₁polidT diseñado con una diana en el extremo 5' (R₀R₁) y una secuencia poli-dT en el extremo 3', para unirse por complementariedad de bases con el poli-A de los RNA mensajeros durante la reacción.

Como paso previo a la reacción de RT, el RNA fue mantenido durante 15 min a 65°C y luego colocado durante 5 min en baño de hielo para provocar la ruptura de su estructura secundaria. La mezcla de reacción se describe en la Tabla 2.2.5.

Tabla 2.2.5. Mezcla de reacción de RT	
Buffer de reacción 10x (Roche)	2 µl
MgCl ₂ 25 mM	4 µl
dNTP 10 mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 2,5 mM c/u)	2 µl
Primer R ₀ R ₁ polidT 25 µM	2 µl
Inhibidor de RNasas 50 U/µl	1 µl
Transcriptasa reversa AMV	1 µl
RNA desnaturalizado	10 µl

La reacción se llevó a cabo en un termociclador EZ Cyler, Ericomp (10 min a 25°C; 120 min a 42°C; 5 min a 99°C; 5 min a 10°C).

2.2.8.3.2. PCR

Para amplificar y aislar los productos específicos de la reacción anterior se hizo una PCR utilizando los primers específicos diseñados a partir de los datos

3 Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de aves. AMV (Avian Myeloblastosis Virus).

de secuencia N-terminal y el primer R₀ que reconoce parte de la secuencia diana insertada durante la retrotranscripción.

Los productos de la reacción anterior (*cfr.* 2.2.8.3.1) fueron utilizados de dos maneras diferentes: sin diluir o diluidos 10 veces con agua MilliQ estéril; una alícuota de cada una de estas soluciones fue utilizada como molde de cDNA para la PCR. En la siguiente tabla (2.2.6) se describe la composición de las mezclas de reacción.

Tabla 2.2.6. Mezcla de reacción de PCR	
Buffer EcoTaq 10x, Ecogen	5 µl
MgCl ₂ 50 mM	2 µl
dNTP 10 mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 2,5 mM c/u)	2 µl
Primer Ro 25 µM	1 µl
Primer Nd1-8 25 µM	1 µl
Agua MilliQ	37 µl
cDNA molde	1,5 µl
EcoTaq 5U/ µl, Ecogen (Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>)	0,5 µl

La reacción se llevó a cabo utilizando el mismo termociclador que se empleó en 2.2.8.3.1 y el siguiente programa:

- 1 ciclo de 5 min a 95°C, seguido de 15 min a 72°C.
- 40 ciclos de tres etapas: 1 min a 94°C, 1 min empleando un gradiente de T° programado de 48°C a 54°C y finalmente 2 min a 72°C.
- 1 ciclo de 15 min a 72°C.
- 1 ciclo de 16 h a 10°C.

Como control de RT-PCR se utilizó como molde en la reacción de PCR una alícuota del RNA total. Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

2.2.8.4. Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de DNA fueron analizadas en geles de agarosa, que poseen menor poder de resolución que los de poliacrilamida, pero permiten un mayor rango de separación. Se empló el equipo BlueMarine 200, Serva, para geles horizontales de 15 x 15 cm, con una fuente Biotech EPS 200 de Pharmacia.

2.2.8.4.1. Preparación de las muestras

Las muestras a sembrar fueron mezcladas con una décima parte en volumen de buffer de muestra 10x. La composición de los buffers de corrida y de muestra se encuentra detallada en las Tablas 2.2.7 y 2.2.8.

Tabla 2.2.7. Buffer Tris-acético-EDTA (TAE) 50x

Tris base	242 g
EDTA 0.5 M pH 8,0	100 ml
Ácido acético glacial	57,1 ml
Agua MilliQ c.s.p.	500 ml

Tabla 2.2.8. Buffer Buffer de muestra 10x

Buffer TAE 10x	1 ml
Glicerol	5 ml
Orange G	15 mg
Agua MilliQ c.s.p.	10 ml

2.2.8.4.2. Preparación de los geles

Los geles fueron preparados utilizando el bastidor plástico del equipo de electroforesis mencionado. La composición de la solución a gelificar se muestra en la Tabla 2.2.9.

Tabla 2.2.9. Composición de los geles de agarosa

Tipo de gel	2%	1%
Agarosa	2 g	1 g
Orange Buffer TAEG	100 ml	100 ml
Calentar a ebullición hasta transparentización. Enfriar hasta 60 °C		
Bromuro de etidio (10mg/ml)	2 µl	2 µl

2.2.8.4.3. Condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron en las calles del gel cubierto con buffer TAE, con pipeta automática de 20 µl. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante, manteniendo una relación de 10 mV por cada cm de longitud de gel.

2.2.8.4.4. Revelado y estimación de pesos moleculares

El revelado de las bandas de DNA se realizó colocando el gel en un transiluminador de luz UV. El bromuro de etidio se une a los fragmentos de

DNA, que presentan fluorescencia de color rojo cuando se exponen a la luz UV.

Los pesos moleculares de los fragmentos de DNA se estimaron por comparación con patrones de peso molecular Roche, DNA Marker X y III (Figura 2.2.1).

Figura 2.2.1. DNA markers

2.2.8.5. Purificación de Fragmentos de DNA

Habiéndose confirmado mediante electroforesis la presencia de bandas del tamaño esperado en los productos de PCR se procedió a la purificación del DNA. Las bandas de DNA seleccionadas fueron recortadas del gel de agarosa bajo luz UV y tratadas con un kit de extracción de DNA (QIAEX II Agarose Gel Extraction, QIAGEN GmbH). El cDNA se eluyó con 50 μ l de agua libre de RNAasas y DNAasas y se almacenó a -20°C .

2.2.8.6. Clonado del cDNA

El cDNA aislado fue clonado utilizando una cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue (Sambrook *et al.*, 1989) y un vector pGEM-T Easy, Promega.

Durante el procedimiento de clonado se utilizaron dos medios de cultivo líquidos descritos en las Tablas 2.2.10 y 2.2.11.

Tabla 2.2.10. Medio 2YT	
Bacto-Triptona	16 g
Bacto-Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min. Conservar a T° ambiente	

Tabla 2.2.11. Medio Luria-Bertani (LB)	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min. Conservar a T° ambiente	

Posteriormente se trabajó en placas de cultivo con medio sólido cuya composición se detalla en la Tabla 2.2.13. Las placas de Petri (9 cm de diámetro) fueron preparadas en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo y contienen aproximadamente 20 ml de medio cada una. Luego de solidificar bajo campana las cajas fueron tapadas, colocadas durante 30 min en estufa a 37°C y conservadas a 4°C.

Tabla 2.2.12. Medio LB	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Enfriar a 60°C en estufa antes de plaquear.	

También se utilizaron reactivos adicionales para impartir selectividad al proceso de clonado (Tablas 2.2.13, 2.2.14 y 2.2.15).

Tabla 2.2.13. Solución de ampicilina (100 mg/ml)

Ampicilina (Sigma)	1 g
Agua MilliQ c.s.p.	10 ml
Esterilizar por filtración y conservar a -20°C en alícuotas de 1 ml.	

Tabla 2.2.14. Solución de Isopropil- β -D-tiogalactósido 0,1 M (IPTG⁴)

IPTG, Roche	1,19 g
Agua MilliQ c.s.p.	50 ml
Esterilizar por filtración y conservar a -20°C en alícuotas de 1 ml.	

Tabla 2.2.15. Solución de 5-Br-4-Cl-3-Indol- β -D-galactósido 20 mg/ml (X-Gal)

X-Gal, Roche	400 mg
N,N'-dimetilformamida, Sigma c.s.p.	20 ml
Conservar a -20°C en alícuotas de 1 ml.	

El clonado consta de tres etapas sucesivas. En primer lugar se procede a introducir los fragmentos de cDNA de interés en un vector, proceso denominado **ligación**. Luego se introduce el vector en células bacterianas competentes, o **transformación**. Por último se cultivan las bacterias transformadas en medios apropiados y se seleccionan las colonias que poseen el fragmento de interés.

2.2.8.6.1. Ligación

Se utilizó el vector pGEM-T Easy que contiene los promotores de las RNA polimerasas T7 y SP6, flanqueando una zona de clonado múltiple, dentro de la región codificante de la enzima β -galactosidasa (*lac Z*), lo que permite secuenciar el inserto introducido en el vector empleando los cebadores correspondientes. La zona de clonado múltiple incluye sitios de digestión para diferentes enzimas de restricción, lo que permite la liberación de insertos. En cada uno de sus extremos lleva además una timidina 3' terminal, lo que aumenta la eficiencia de ligación con productos de PCR obtenidos con DNA polimerasas sin actividad de 3'→5' exonucleasa, las que suelen añadir una adenina 3' terminal. El vector posee además una región que codifica para la β -lactamasa (*Amp^r*), con lo que las bacterias sensibles a ampicilina se vuelven resistentes al ser transformadas con el vector pGEM-T Easy.

⁴ IPTG es un análogo no fermentable de la lactosa que inactiva al represor del operón *lacZ*.

Figura 2.2.2. Esquema del vector pGEM-T Easy

Cuando se liga un inserto al vector se produce una interrupción en el marco de lectura de la región que codifica para la β -galactosidasa, lo que impide la expresión de esta enzima. Dado que la acción de la β -galactosidasa sobre el X-Gal hace que se libere un compuesto de color azul, la inserción de un fragmento de DNA en el vector se evidencia por la ausencia de color azul.

Los fragmentos de DNA seleccionados y purificados fueron ligados al vector pGEM-T Easy. La mezcla de ligación se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 2.2.16).

Tabla 2.2.16. Mezcla de Ligación

Buffer de ligación 2X, Promega	5 μ l
Vector pGEM-T Easy 50 ng/ μ l	1 μ l
DNA (cfr. 26.2.4)	3 μ l
DNA ligasa T4 3 U/ μ l, Promega	1 μ l
Incubar a 4 °C toda la noche	

2.2.8.6.2. Transformación

En primer lugar se obtuvieron bacterias en estado competente procediendo según el protocolo descrito en Sambrook *et al.* (1989). Se partió de un cultivo puro en etapa de crecimiento exponencial, para lo cual se inocularon las células de una colonia de *E. coli* aislada de un cultivo en placa LB en 5 ml de

medio de cultivo 2YT y se incubaron a 37°C durante toda la noche con agitación a 250 rpm. Una alícuota de 100 µl de este cultivo fue inoculada en 10 ml de medio fresco y se hizo crecer en las mismas condiciones hasta una densidad óptica de 0,6 (DO₅₅₀). Este cultivo se mantuvo en baño de hielo durante 10 min y luego se centrifugó a 4°C durante 10 min a 3000 rpm. Trabajando bajo campana de flujo se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 ml de CaCl₂ 0,05 M estéril. Nuevamente se dejó en baño de hielo durante 10 min, se centrifugó como se indicó anteriormente y luego de descartar el sobrenadante asépticamente, las células fueron cuidadosamente resuspendidas en 1 ml de CaCl₂ estéril 0,05 M preenfriado a 4°C.

La suspensión de células fue almacenada en heladera a 4°C durante toda la noche, luego se tomaron alícuotas de 100 µl y a cada una de ellas se le adicionó 23 µl de glicerol 80% (v/v) estéril. Cada alícuota de suspensión de células competentes fue almacenada a -80°C hasta el momento de ser utilizada.

La transformación bacteriana se realizó agregando 10 µl de la mezcla de ligación a una alícuota de 100 µl de suspensión de un cultivo de *E. coli* (XL1-Blue) competente siguiendo un protocolo de shock térmico (30 min en hielo, 90 s a 42°C y finalmente 5 min en hielo).

A la suspensión de células proveniente de la mezcla de transformación se le añadió 300 µl de medio LB y se incubó durante 15 minutos a 37°C en estufa de cultivo y luego se centrifugó 2 minutos a 2.000 rpm. A partir de aquí se trabajó en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar. Se desecharon 200 µl de sobrenadante, las células fueron cuidadosamente resuspendidas en el sobrenadante restante y trasvasadas con pipeta automática a una placa de Petri con medio LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (50 µg/ml) y X-Gal (50 µg/ml). Utilizando una espátula de Digralsky se extendió homogéneamente la suspensión de células y luego de secar los restos de humedad bajo campana se incubó durante toda la noche en estufa a 37°C.

2.2.8.6.3. Selección de los clones

Las bacterias que fueron transformadas son resistentes a la ampicilina y crecen en el medio de cultivo. Aquellas bacterias que poseen el inserto de cDNA en el vector tienen interrumpido el gen que codifica para la β -galactosidasa, por lo que no pueden degradar al X-Gal y dan colonias blancas, mientras que la presencia de colonias azules indica que hubo escisión del X-Gal, tratándose de colonias sin inserto.

Las colonias blancas fueron seleccionadas para verificar por PCR que contuvieran el inserto buscado. Cada una de ellas fue aislada con un palillo de madera estéril y colocada en un tubo eppendorf para realizar la PCR utilizando cebadores específicos. En este caso los cebadores utilizados fueron el Nt H₁ y Nt H₂₋₃ y el R₀. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Por otra parte, se prepararon inóculos con el fin de obtener cultivos que permitan inmortalizar los clones. A tal efecto cada uno de los palillos utilizados anteriormente, conteniendo remanentes de la colonia aislada, fue introducido en un tubo conteniendo 3 ml de medio de cultivo LBA [LB (*cfr.* 2.2.13) con 50 μ g/ml de ampicilina (*cfr.* 2.2.14)]. Los inóculos de cada uno de los clones fueron incubados a 37°C con agitación (200 rpm) durante toda la noche.

Para conservar los clones seleccionados se añadió 92 μ l de glicerol 80% (v/v) estéril a alícuotas de 400 μ l de cada cultivo. Cada suspensión fue rápidamente homogeneizada y congelada a -80°C. El glicerol (15 – 20%) se utiliza como crioprotector para evitar que las células se rompan al congelar y descongelar la muestra. Los clones así tratados pueden ser conservados por largos períodos.

2.2.8.7. Secuenciación del cDNA Clonado

2.2.8.7.1. Aislamiento de DNA plasmídico

Para obtener el DNA plasmídico se tomó una alícuota de 1,5 ml proveniente de los cultivos de interés. Se centrifugó a 14000 rpm durante 30 s y se eliminó el sobrenadante. Luego se utilizó el kit de extracción Fast Plasmid Mini Kit, Eppendorf. La técnica consiste en lisar las células y eliminar restos celulares y proteínas. Luego el DNA plasmídico queda retenido en pequeñas columnas cromatográficas y es eluido con agua MilliQ estéril.

2.2.8.7.2. Digestión con enzimas de restricción

Esta etapa fue realizada para determinar la cantidad de DNA plasmídico presente en una muestra y para confirmar la presencia de insertos específicos dentro del vector en cuestión. La mezcla de reacción se describe en la Tabla 2.2.17.

Tabla 2.2.17. Digestión de DNA con enzimas de restricción	
Buffer de reacción 10X (específico para cada enzima)	1 µl
Enzima de restricción	0,5 µl
Muestra de DNA	1 µl
Agua MilliQ	7,5 µl
Incubar en estufa a 37 °C durante 2 h	

Los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

2.2.8.7.3. Secuenciación del DNA

Las muestras fueron secuenciadas a través de los servicios de secuenciación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, España). Los cromatogramas fueron analizados con el programa Chromas v2.0 (Copyright©) 1988–2001 Technelysium Pty. Ltd.

2.2.8.7.4. Análisis de las secuencias de los cDNAs

Las secuencias obtenidas de los cDNAs de los clones fueron analizadas con el software de alineamiento Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994) para obtener una secuencia consenso. La secuencia consenso fue traducida en los

seis marcos de lectura con el software Translate Tool disponible en el servidor de ExPASy para poder identificar la presencia de elementos conservados en la secuencia aminoacídica de cisteínendopeptidasas.

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Obtención de fracciones purificadas

El PAR obtenido a partir de *Bromelia hieronymi* Mez posee actividad proteolítica debido a la presencia de numerosas proteasas. En el apartado 1.3.6 se las asoció en tres grupos de acuerdo al resultado del IEF-zimograma. Cada grupo posee dos bandas proteicas con actividad caseinolítica de pI cercano.

En las etapas de purificación por cromatografía de intercambio iónico, se decidió iniciar el fraccionamiento a pH 8,5, empleando buffer Tris HCl 0,05 M, ya que a este valor de pH las proteínas del grupo I (pI >9,3) poseen carga positiva, mientras que las de los grupos II (pI 8,3 y 7,6) y III (pI 6,4 y 5,9) están cargadas negativamente. Por lo tanto, frente a un intercambiador catiónico, el grupo I quedaría retenido en la columna y los grupos II y III deberían eluir durante el lavado.

Si se plantea el caso contrario, o sea utilizando un intercambiador aniónico al mismo valor de pH, las fracciones retenidas serían las de los grupos II y III, mientras que el grupo I debería eluir durante el lavado de la columna con el buffer de corrida. Para encontrar la mejor estrategia de purificación se probaron intercambiadores aniónicos y catiónicos, fuertes y débiles, e incluso en algunos casos se utilizó el tipo HP (High Performance) o FF (Fast Flow).

2.3.1.1. Separación de los tres grupos de proteasas

2.3.1.1.1. Cromatografía de intercambio catiónico

En la Figura 2.3.1 se presenta una cromatografía de intercambio catiónico en CM Sepharose FF, en la que se observa la presencia de un pico retenido mayoritario con actividad caseinolítica, que por IEF (Figura 2.3.2) revela la presencia de las dos fracciones de pI alcalino. Se obtuvo un pico más angosto y definido utilizando un gradiente quebrado.

Figura 2.3.1. Cromatografía de intercambio catiónico (CM Sepharose FF) del PAR. Velocidad de elución, 1 ml/min. Volumen de las fracciones colectadas 2 ml, pH 8,5.

Figura 2.3.2. IEF. Línea 1, patrones de pI; línea 2, fracción retenida (figura 2.3.1); línea 3, primera fracción no retenida (figura 2.3.1); línea 4, PAR.

Cuando se utilizó SP Sepharose FF en lugar de CM, se observó la presencia de dos picos retenidos bien resueltos y se consideró que se había logrado la separación de las dos proteasas más básicas (grupo I, pI 9,8 y 10,4); sin embargo el IEF mostró que cada pico contenía las dos fracciones de pI

alcalino. Una interpretación posible para este comportamiento es que se trate de una única proteasa con dos formas interconvertibles que se separan en dos picos cromatográficos, en base a su diferente pI, y luego cada una generaría la otra forma, encontrándose ambas presentes cuando luego se analizan las muestras por IEF.

En la fracción no retenida en la columna de CM Sepharose FF se observaron dos picos (Figura 2.3.1) con actividad caseinolítica que contienen mayoritariamente las peptidasas del grupo III (primer pico) y del grupo II (segundo pico). Si bien en esta etapa no tiene lugar el intercambio, la aparición de dos fracciones con proteasas distintas alentó la posibilidad de utilizar cada pico como material de partida para purificar estas enzimas, pero se observó que al aumentar la cantidad de muestra sembrada en la columna (lo cual es necesario para recuperar mayor cantidad de enzima para usos posteriores), los dos picos no retenidos se mezclaban más entre sí, por lo que hubo que descartar esta alternativa. Es por esta razón que la cromatografía de la Figura 2.3.1 fue utilizada únicamente como primer paso de purificación de una proteasa alcalina situada en la fracción retenida, lo que se detallará en el apartado 2.3.1.1.3.

2.3.1.1.2. Cromatografía de intercambio aniónico

En primer lugar se intentó separar los componentes de los grupos II y III de la muestra utilizando un intercambiador aniónico débil, DEAE, a pH 8,5 (Tris-HCl 0,05 M). De esta manera se obtuvo un cromatograma con una única fracción retenida, que analizada por IEF reveló la presencia de las proteínas de los grupos II y III juntas. Por lo tanto se optó por utilizar un intercambiador aniónico fuerte y de alta resolución, Q Sepharose HP, y se obtuvo un cromatograma con dos fracciones retenidas y una no retenida (Figura 2.3.3). El primer pico retenido contiene las peptidasas del grupo II, de pI intermedio, en tanto que el segundo incluye a las del grupo III, de pI más ácido; como era de prever, en la fracción no retenida están presentes las proteasas del grupo I (Figura 2.3.4).

Figura 2.3.3. Cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose HP). del PAR. Velocidad de elución: 1 ml/min. Volumen de las fracciones colectadas: 2 ml. pH: 8,5.

Figura 2.3.4. IEF. Línea 1, PAR; línea 2, fracción no retenida: grupo I (Fig. 2.3.3); línea 3, primera fracción retenida: grupo II (Fig 2.3.3); línea 4, segunda fracción retenida: grupo III (Fig 2.3.3); línea 5, patrones de pI.

También se realizó una cromatografía igual a la anterior pero empleando Q Sepharose FF (de menor resolución). En un principio la separación resultó menos eficiente, ya que los picos eluidos se presentaban menos definidos y más anchos; sin embargo, variando las condiciones del gradiente se pudo

lograr una separación semejante a la obtenida con Q-HP, como muestra la Figura 2.3.5. En este caso se aumentaron las pendientes de los gradientes en un 50% respecto al cromatograma original mostrado en la Figura 2.3.3 y para eluir el segundo pico retenido fue necesario realizar una tercera etapa, de igual pendiente que la primera (Figura 2.3.5).

Figura 2.3.5. Cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose FF). del PAR. Velocidad de elución, 1 ml/min. Volumen de las fracciones colectadas 2 ml, pH, 8,5.

Cualquiera de las dos opciones (Figuras 2.3.3 y 2.3.5) se utilizaron como primer paso para purificar las proteasas de los grupos II y III.

2.3.1.2. Hieronymaína I

La fracción retenida del cromatograma de la Figura 3.3.1 fue recromatografiada en CM Sepharose FF al mismo pH (8,5) empleando varios gradientes cuya pendiente era cada vez menor. Pero no se logró separar de esta manera las dos proteínas de pI alcalino. Entonces se varió el pH del buffer de elución, utilizando ahora Tris-HCl de pH 7,5 (Figura 2.3.6).

Figura 2.3.6. Recromatografía de intercambio catiónico (CM Sepharose FF) del primer pico retenido de la cromatografía de la figura 2.3.1. Velocidad de elución, 1 ml/min. Volumen de las fracciones colectadas 2 ml. PH, 7,5.

Puede observarse la presencia de una fracción retenida con actividad caseinolítica elevada y una no retenida con muy poca actividad. Cuando se realizó el IEF-zimograma (Figura 2.3.7) se evidenció únicamente la banda correspondiente a la peptidasa más alcalina (pI 10,4) en el pico retenido. De esta manera se obtuvo la primer peptidasa purificada, denominada **hieronymaína I**.

Figura 2.3.7. IEF-zimograma de la cromatografía de la figura 2.3.6. Líneas 1 y 2, IEF y zimograma del PAR; líneas 3 y 4, IEF y zimograma de hieronymaína I.

La homogeneidad de hieronymaína I fue comprobada mediante la obtención de su espectro de masas (Figura 2.3.8), donde se observa la presencia de un único pico de masa molecular 24.066 Da. La obtención de una única secuencia N-terminal (ALPESIDWRAKGAVTEVKRQDG) constituye una prueba adicional de la homogeneidad de esta nueva enzima.

Figura 2.3.8. Espectro de masas de hieronymaína I.

2.3.1.3. Hieronymaína II

La primera fracción retenida del cromatograma de la Figura 2.3.3 (conteniendo mayoritariamente las proteasas de pI intermedio) fue recromatografiada utilizando CM Sepharose FF y buffer fosfatos para la elución, eligiéndose inicialmente un valor de pH intermedio entre las dos proteínas del grupo II (7,6 y 8,3) para intentar separarlas. Sin embargo esta estrategia de separación no funcionó, ya que ambas quedaban en la fracción no retenida del cromatograma, por lo que se probó con valores de pH menores, desde 8,0 hasta 6,0. A pH 6,0 ambas proteínas quedaron retenidas en un único pico, no pudiéndose hallar un valor de pH que permitiera su separación. Con la finalidad de aumentar la afinidad de las proteínas por la columna, se utilizó finalmente un intercambiador catiónico fuerte de alta resolución, SP-Sepharose HP, empleando en todos los casos buffer ácido cítrico-citrato de Na 0,02 M, testeando en el rango de pH 5,0 a 6,0. En la Figura 2.3.9 se observa lo que ocurre a pH 5,6, donde puede apreciarse la

presencia de una fracción retenida y una no retenida, ambas con actividad caseinolítica.

Figura 2.3.9. Recromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose HP) del primer pico retenido de la cromatografía de la figura 2.3.3. Velocidad de elución: 1 ml/min. Volumen de las fracciones colectadas: 3 ml. pH: 5,6.

En el IEF de la Figura 2.3.10 se observa la diferencia entre la fracción sembrada (primer pico retenido del cromatograma de la Figura 2.3.3) y la fracción retenida colectada en la cromatografía mostrada en la Figura 2.3.9, donde se aprecia un incremento en el grado de pureza de la fracción (desaparece una proteína minoritaria de menor pI), pero las proteasas de pI 7,6 y 8,3 no se logran separar.

De acuerdo a estos resultados la fracción purificada presenta dos bandas en el IEF. Sin embargo no fue posible separarlas por cromatografía, ni aún con gradientes salinos de muy poca pendiente, por lo que esas dos bandas podrían ser el resultado de un procesamiento ocurrido durante el desarrollo del IEF. Por lo tanto se analizó su homogeneidad por espectrometría de masas, que es un método de mayor resolución.

Figura 2.3.10. IEF de la cromatografía de la Figura 2.3.8. Línea 1, patrones de pI; líneas 2, muestra sembrada; línea 3, PAR; línea 4, fracción retenida (hieronymaína II)

En la Figura 2.3.11 se observa el espectro de masas de la muestra. A la derecha se ve la señal producto de la doble ionización y a la izquierda la de la fracción purificada. La señal única y aguda indica la presencia de una proteína de masa molecular de 23.411 Da. El pico se ve homogéneo y es consistente con la presencia de una única especie molecular, que fue denominada **hieronymaína II**. Este hecho no es novedoso, ya que en algunas proteasas purificadas de Bromeliaceae también se observa la presencia de más de una banda al IEF (Rowan *et al.*, 1990). En el caso de bromelina de tallo de *Ananas comosus* se observó que por modificación química (desaminación de ciertos residuos y sustitución por hidroxilo), la enzima presenta dos formas, visibles como dos bandas separadas al IEF, manteniendo constante su masa molecular (Harrach *et al.*, 1998). Al igual que en el caso de hieronymaína I, la obtención de una única secuencia N-terminal (AVPQSIDWRVYGAV) reafirma la homogeneidad de esta nueva enzima.

La secuencia N-terminal de hieronymaína II es, y será comparada con otras en el apartado 2.3.1.5.

Figura 2.3.11. Espectro de masas de hieronymaína II.

2.3.1 4. Hieronymaína III

Para continuar con la purificación de las proteínas del grupo III, contenidas en el segundo pico retenido de los cromatogramas de las Figuras 2.3.3 y 2.3.5, se realizó una recromatografía de esta fracción en SP Sepharose HP, empleando buffer ácido cítrico-citrato de Na de pH 4,5. Se ensayó inicialmente con un gradiente de 0 a 0,5 M de NaCl en 140 min. Se obtuvo una fracción retenida con actividad caseinolítica que contenía las dos proteínas del grupo III. Para intentar separarlas se disminuyó sucesivamente la pendiente del gradiente, hasta un valor de 0 a 0,1 de NaCl en 140 min, pero se obtuvo el mismo cromatograma. En la Figura 2.3.12 se observa lo mencionado anteriormente, empleando un gradiente de 0 a 0,25 M NaCl en 140 min. En el IEF se ve la mayor pureza de la muestra al salir de la columna (Figura 2.3.13).

Figura 2.3.12. Recromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose HP). del segundo pico retenido de la cromatografía de la figura 2.3.3. Velocidad de elución, 1 ml/min. Volumen de las fracciones colectadas 3 ml, pH, 4,5.

Figura 2.3.13. IEF del cromatograma de la figura 2.3.11. Línea 1, patrones de pI; línea 2, muestra ingresada a la columna; línea 3, salida de la columna.

Esta fracción retenida, a la que se denominó **hieronymaína III**, fue analizada por espectrometría de masas como muestra la Figura 2.3.14. En el espectro de masas puede observarse el producto de la doble ionización a la izquierda, y a la derecha la señal de la muestra, donde se ven dos picos definidos de 23.643 y 23.713 Da. La diferencia de masas entre los picos es de

aproximadamente 70 Da, lo que puede corresponder a la masa de un residuo de Ala, descontando una molécula de agua de la hidrólisis del enlace peptídico.

La secuencia del extremo N-terminal demostró que en la muestra conviven dos poblaciones moleculares, cuya secuencia difiere en un residuo Ala del extremo N-terminal: AVPQSIDWRRYGAVTTSRNQG y VPQSIDWRRYGAVTTSRNQG, que podría corresponder a la diferencia en masas determinada por espectrometría. Estos datos podrían correlacionarse con el clivaje proteolítico que se produce durante la maduración de la proenzima para obtener la enzima activa, donde posiblemente el corte pueda ocurrir alternativamente a la derecha o a la izquierda del residuo de Ala citado, pudiendo de esta manera formar parte o no de la enzima activa.

Figura 2.3.14. Espectro de masas de hieronymaina III.

2.3.2. Caracterización de las fracciones purificadas

Las tres endopeptidasas purificadas fueron caracterizadas. Se observaron algunas similitudes, pero también muchas diferencias que permiten distinguirlas claramente e identificarlas como enzimas distintas.

2.3.2 1. Tablas de purificación

Los datos de actividad caseinolítica y concentración de proteínas fueron empleados para calcular la actividad específica, el grado de purificación y el porcentaje de recuperación de actividad a través de cada etapa de purificación. (Tablas 2.3.1, 2.3.2 y 2.3.3).

Tabla 2.3.1. Esquema de purificación de **hieronymaína I**

Etapas de purificación	Actividad caseinolítica (Ucas totales)	Proteínas (mg totales)	Actividad específica (Ucas/ mg proteína)	Purificación n-veces	Recuperación %
Extracto crudo	42,9	3,67	11,7	1,0	100
PAR	34,3	2,73	12,5	1,1	80
Grupo I	15,3	1,07	14,3	1,2	35,7
Hieronymaína I	9,2	0,42	21,9	1,9	21,4

Tabla 2.3.2. Esquema de purificación de **hieronymaína II**

Etapas de purificación	Actividad caseinolítica (Ucas totales)	Proteínas (mg totales)	Actividad específica (Ucas/ mg proteína)	Purificación n-veces	Recuperación %
Extracto crudo	80,3	7,48	10,7	1	100
PAR	63,8	5,70	11,2	1,05	79,5
Grupo II	6,0	0,41	14,6	1,36	7,5
Hieronymaína II	5,1	0,30	17	1,59	6,4

Tabla 2.3.3. Esquema de purificación de **hieronymaína III**

Etapas de purificación	Actividad caseinolítica (Ucas totales)	Proteínas (mg totales)	Actividad específica (Ucas/ mg proteína)	Purificación n-veces	Recuperación %
Extracto crudo	92,82	9,72	9,54	1	100
PAR	74,7	7,40	10,1	1,06	80,5
Grupo III	6,39	0,23	27,7	2,90	6,88
Hieronymaína III	1,86	0,055	33,8	3,54	2

A partir de los datos de las tablas se observa que hieronymaína III es la endopeptidasa purificada que posee la actividad específica más elevada (33,8 Ucas/mg de proteína) y el mayor número de veces de purificación (3,54). Por otra parte, durante el proceso de purificación de hieronymaína I se recupera la mayor cantidad de actividad total (21,4%), dato que puede ser interesante desde el punto de vista económico en el caso que la enzima resulte de utilidad para algún proceso industrial.

2.3.2 2. Perfil de pH

En la Figura 2.3.15 se encuentran graficados los perfiles de pH del PAR y de las tres peptidasas purificadas. En el caso del PAR se observa un perfil mucho más amplio que el presentado por las fracciones puras, ya que contiene todas las proteasas juntas y su gráfico es la suma de las actividades de cada componente. Hieronymaína I y III presentan un óptimo más alcalino que hieronymaína II. Por otra parte ninguna de las tres peptidasas tiene su rango de pH óptimo alrededor del valor de pH 10, donde se observa un máximo para el PAR, lo que podría indicar la existencia de alguna otra proteasa aún no purificada con rango óptimo en esa zona.

Figura 2.3.15. Perfiles de pH

2.3.2.3. SDS-PAGE

Las fracciones purificadas fueron analizadas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes para obtener su masa molecular aproximada. Como era previsible, teniendo en cuenta el comportamiento del PAR descrito en 1.3.6, todas las peptidasas presentaron una única banda cercana a los 25.000 Da. Este valor es algo más elevado que las masas obtenidas para cada peptidasa por espectrometría de masas, hecho común detectado en otras proteasas vegetales (Harrach *et al*, 1998).

2.3.2.4. Acción de cisteína e inhibidores

Las enzimas purificadas requirieron ser incubadas con cisteína 20 mM durante 15 min a 0°C previamente a la determinación de actividad, concentración de cisteína que resultó óptima para activar las enzimas en estudio. Por otra parte el medio de reacción debe contener también cisteína 15 mM. En la Tabla 2.3.4 se observa el número de veces que se incrementa la actividad caseinolítica cuando se preincuba cada fracción con cisteína.

Tabla 2.3.4. Incremento de la actividad preincubando las fracciones con cisteína 20mM.

proteasa	Incremento de actividad (n-veces)
Hieronymaína I	11
Hieronymaína II	6
Hieronymaína III	1,7

Las tres peptidasas, al igual que el PAR (*crf.* 1.3.7.2), fueron totalmente inhibidas por la presencia de E-64 (0,1 mM) y ácido iodoacético (0,1 y 1 mM), lo cual confirma su naturaleza de cisteinilpeptidasas, al igual que otras proteasas vegetales purificadas de la familia Bromeliaceae.

2.3.2.5. Titulación del sitio activo con E-64

El E-64 es un inhibidor que se une en forma equimolecular y específica con la cisteína del sitio activo de las endopeptidasas cisteínicas. En las Figuras 2.3.16, 2.3.17 y 2.3.18 se observan las curvas de titulación con E-64 de hieronymaína I, II, y III, respectivamente.

Figura 2.3.16. Titulación de sitio activo de hieronymaína I

Figura 2.3.17. Titulación de sitio activo de hieronymaína II

Figura 2.3.18. Titulación de sitio activo de hieronymaína III

A partir de los valores de concentración de E-64 obtenidos de los gráficos para los cuales la actividad enzimática se hace nula, se calcularon los porcentajes de enzima activa en las muestras purificadas. Esos porcentajes son cercanos al 57% para hieronymaína I y II y 61 % para hieronymaína III. Es un hecho común que las fitopeptidasas una vez purificadas presenten una actividad menor a la esperada (Liggieri, 2005; Barret *et al.*, 1982; Trejo *et al.*, 2001). La disminución de la actividad podría deberse a procesos de oxidación irreversibles o de autodigestión.

2.3.2.6. Comparación de la secuencia N-terminal

Las secuencias N-terminal de las tres peptidasas purificadas fueron comparadas con la de otras endopeptidasas vegetales.

En el caso de hieronymaína I se determinaron 22 residuos aminoacídicos de la secuencia N-terminal, que fueron alineados y comparados con los de otras 28 peptidasas cisteínicas vegetales, presentando con ellas un grado de identidad mayor al 55% (Tabla 2.3.5).

Tabla 2.3.5. Alineamiento de la secuencia N-terminal de hieronymaína I con otras endopeptidasas cisteínicas vegetales.

Proteasa / fuente	Secuencia	Referencia	Identidad
Hieronymaína I	ALPESIDWRAKGAVTEVKRQDG	Bruno <i>et al.</i> (2003)	100%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ELPESIDWRKKGAVAEVKDQGG	Koizumi <i>et al.</i> (1993)	77%
Papaya proteinasa IV	DLPEVDWRAKGAVTPVKHQGY	Buttle <i>et al.</i> (1990)	73%
Oryzaína α	ALPEVDWRTKGAVAEIKDQGG	Watanabe <i>et al.</i> (1991)	73%
<i>Pseudotsuga mentziesii</i>	DLPESIDWREKGAFTAVKNQGS	Tranbarger & Misra (1996)	73%
<i>Zea mays</i> L.	DLPEVDWRAKGAVAEVKDQGS	Pechan <i>et al.</i> (1999)	73%
<i>Glycine max</i>	GLPENFDWREKGAFTVKLQGR	Nong (1995)	68%
<i>Vasconcellea stipulata</i>	DYPESIDWRQKGAVTPVKNQNP	Kyndt <i>et al.</i> (2007)	68%
<i>Zingiber officinale</i>	-LPDSIDWREKGAFTVPVKNQGG	Choi, K. & Laursen (2000)	68%
<i>Ipomoea batatas</i>	SLPDSIDWREKGAFAEVKDQGS	Chen <i>et al.</i> (2006)	68%
Mexicaína	-YPESIDWREKGAFTVPVKNQNP	Lian Z. (1999)	68%
Balansaína I	AVPESIDWRDYGAVTSVKNQGG	Pardo <i>et al.</i> (2000)	68%
<i>Carica candamarcensis</i>	-YPESIDWRKKGAVTPVKNQGS	Jaziri <i>et al.</i> (1994)	68%
Quimopapaína	NYPQSIDWRAKGAVTPVKNQGA	Taylor <i>et al.</i> (1999)	68%
Macrodonataína II	AVPQSIDWRDYGAVTNEVKNQNP	López <i>et al.</i> (2001)	64%
<i>Pisum sativum</i>	-VPSSIDWRKKGAVTDVKDQ--	Cercos <i>et al.</i> (1999)	64%
Macrodonataína I	AVPQSIDWRDYGAVTNEVKNQGP	López <i>et al.</i> (2000)	64%
Bromelaína	AVPQSIDWRDYGAVTSVKNQNP	Ritonja <i>et al.</i> (1989)	64%
<i>Dianthus caryophyllus</i>	-LPESVDWRKKGAVSHVKDQGG	Jones <i>et al.</i> (1995)	64%
Oryzaína β	-LPESVDWREKGAFTAPVKNQGG	Watanabe <i>et al.</i> (1991)	64%
<i>Vicia sativa</i>	-VPSSIDWRNKGAVTGVDKQGG	Shutov & Vaintraub (1987)	64%
Comosaína	-VPQSIDWRNYGAVTSVKNQGG	Napper <i>et al.</i> (1994)	59%
<i>Zinnia elegans</i>	DLPKSVDWRRKGAFTSPVKNQGG	Ye & Varner (1996)	59%
Papaína	-IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGS	Kamphuis <i>et al.</i> (1984)	59%
Ananaína	-VPQSIDWRDSGAVTSVKNQGR	Lee <i>et al.</i> (1997)	59%
Papaya peptidasa III	-LPENVDWRKKGAVTPVRHQGS	Revell <i>et al.</i> (1993)	59%
<i>Ricinus communis</i>	-VPASVDWRKKGAVTSVKDQGG	Schmid <i>et al.</i> (1998)	59%
<i>Phaseolus mungo</i>	-VPASVDWRKKGAVTDVKDQGG	Yamuchi <i>et al.</i> (1992)	59%
CYP-7 <i>Nicotiana tabacum</i>	DLPADFDWRDHGAFTGVKNQGS	Linthorst <i>et al.</i> (1993)	55%

El mayor porcentaje de identidad se observa con una de las proteasas de *Arabidopsis thaliana* (77%), seguida de Papaya proteinasa IV, Oryzaína α y las proteasas de *Pseudotsuga mentziesii* y *Zea mays* L. (73%).

En las Tablas 2.3.6 y 2.3.7 se comparan las secuencias N-terminal de hieronymaína II (14 residuos) y III (21 residuos) respectivamente con otras 16 fitopeptidasas cisteínicas. Se observa una mayor semejanza entre estas dos peptidasas entre sí que con hieronymaína I. Ambas presentan un grado de identidad elevado (mayor que 70 %) con las peptidasas de *Ananas comosus* y *Pseudananas macrodantes*.

Tabla 2.3.6. Alineamiento de la secuencia N-terminal de hieronymaína II con otras endopeptidasas cisteínicas vegetales.

Proteasa / fuente	secuencia	Referencia	identidad
Hieronymaína II	AVPQSIDWRVYGAV	Bruno <i>et al.</i> (2006)	100%
Macrodonataína II	AVPQSIDWRDYGAV	López <i>et al.</i> (2001)	92%
Macrodonataína I	AVPQSIDWRDYGAV	López <i>et al.</i> (2000)	92%
Bromelaína	AVPQSIDWRDYGAV	Ritonja <i>et al.</i> (1989)	92%
Fastuosaina	AVPQSIDWRDYGAV	Cabral <i>et al.</i> (2004)	92%
Bromelaína de fruto	AVPQSIDWRDYGAV	Muta <i>et al.</i> (1994)	92%
Balansaína I	AVPESIDWRDYGAV	Pardo <i>et al.</i> (2000)	86%
Comosaína	-VPQSIDWRNYGAV	Napper <i>et al.</i> (1994)	86%
Ananaína	-VPQSIDWRDSGAV	Lee <i>et al.</i> (1997)	77%
<i>Mesembryanthemum</i> sp	-VPRSIDWRVKGAV	Firsthoefel <i>et al.</i> (1998)	77%
Hieronymaína I	ALPESIDWRAKGAV	Bruno <i>et al.</i> (2003)	71%
Quimopapaína	NYPQSIDWRAKGAV	Watson <i>et al.</i> (1990)	71%
<i>Vicia sativa</i>	-VPSSIDWRNKGAV	Shutov & Vaintraub (1987)	71%
<i>Oriza sativa</i>	AAPQSMIDWRAMGAV	Buell <i>et al.</i> (2005)	71%
CC-IV (<i>Carica candamarcensis</i>)	-YPEIDSWRKKGAV	Walreavens <i>et al.</i> (1993)	64%
GP-II (<i>Zyngiber officinale</i>)	DLPSIDSWRENGAV	Choi & Laursen (2000)	64%
<i>Daucus carota</i>	ELPQSVIDWREKGA	Mitsubishi <i>et al.</i> (2004)	64%

Tabla 2.3.7. Alineamiento de la secuencia N-terminal de hieronymaína III con otras endopeptidasas cisteínicas vegetales.

Proteasa / fuente	Secuencia	Referencia	identidad
Hieronymaína III	AVPQSIDWRRYGA VTTSRNQG		100
Fastuosaina	AVPQSIDWRDYGA VTSVK NQG	Cabral & Leopoldino (2006)	81%
Comosaína	-VPQSIDWRNYGA VTSVK NQG	Napper <i>et al.</i> (1994)	76%
Bromelaína	AVPQSIDWRDYGA VTSVK NQN	Ritonja <i>et al.</i> (1989)	81%
Bromelaína de fruto	AVPQSIDWRDYGA VNEVK NQN	Muta <i>et al.</i> (1994)	76%
Macrodonataína I	AVPQSIDWRDYGA VNEVK NQG	López <i>et al.</i> (2000)	76%
Macrodonataína II	AVPQSIDWRDYGA VNEVK NQN	López <i>et al.</i> (2001)	71%
Ananaína	SVPSIDWRDSGA VTSVK NQG	Lee <i>et al.</i> , (1997)	71%
Quimopapaína	NYPQSIDWRAKGA VTPVK NQG	Taylor <i>et al.</i> (1999)	66%
<i>Vasconcellea stipulata</i>	NIPASIDWRQKGA VTPVR NQG	Kyndt <i>et al.</i> (2007)	66%
<i>Oryza sativa</i>	AVPESVDWRKEGA VTPAKH QG	Ohyanagi <i>et al.</i> (2006)	62%
CC-IV (<i>Carica candamarcensis</i>)	-YPEIDSWRKKGA VTPVK NQG	Walreavens <i>et al.</i> (1993)	62%
<i>Glycine max</i>	SVPPSVDWRKNGA VTGVKD QG	Ling <i>et al.</i> (2003)	57%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KVPDSVDWRKKGA VTNVKD QG	Funk <i>et al.</i> (2002)	57%
<i>Daucus carota</i>	HLPSSVDWRKHGA VTPIK NQG	Sakuta <i>et al.</i> (2001)	57%
<i>Petunia hybrida</i>	DLPKSVDWRKKGA VTPVK NQG	Jones <i>et al.</i> (2005)	57%
Hieronymaína I	ALPESIDWRAKGA VTEVKR QD	Bruno <i>et al.</i> (2003)	57%

En los extremos N-terminales de todas las proteasas comparadas (con la excepción de hieronymaína II, cuyo N-terminal ha sido determinado hasta el residuo 14) se hallan conservados los residuos Pro2 y Gln19 (numeración de

la papaína) y los motivos DWR y GAV. La presencia de la Pro2 podría relacionarse con la prevención de proteólisis no deseada por parte de aminopeptidasas y la Gln19 aparentemente ayudaría a la formación del “hueco oxianiónico” (Rawlings & Barrett, 1994).

2.3.2.7. Sustratos sintéticos

Las tres peptidasas purificadas mostraron un comportamiento diferente frente a los distintos sustratos sintéticos ensayados. Las preferencias respecto a los sustratos y los parámetros cinéticos calculados se detallan en los siguientes apartados.

2.3.2.7.1. PFLNA

De las tres proteasas purificadas, la única que hidrolizó el PFLNA fue hieronymaína I, liberando 2,035 μ moles de producto por min y por ml de enzima. En este caso se realizaron estudios de cinética y se analizaron los datos utilizando tres regresiones lineales y una hiperbólica (Tabla 2.3.8).

Tabla 2.3.8. Cinética de hieronymaína I con PFLNA		
Regresión	K_M (mM)	V_{max} (μ M/seg)
Lineal de Lineweaver-Burk	0,44	0,0448
Lineal de Hanes	0,55	0,0525
Lineal de Eadie Hofstee	0,49	0,0484
Hiperbólica (programa:Sigma Plot)	0,54	0,0524

Como se observa en la tabla, los valores obtenidos para las diferentes regresiones fueron semejantes. Las regresiones lineales presentaron un coeficiente R^2 superior a 0,85, pero en estos casos las constantes cinéticas se calculan a partir de los datos de las ordenadas al origen extrapolando las curvas. La curva obtenida por regresión hiperbólica se ajusta mejor a los datos experimentales, por lo que fue seleccionada para obtener K_M y V_{max} y para calcular k_{cat} y la relación k_{cat}/K_M (Tabla 2.3.9).

Tabla 2.3.9. Cinética con PFLNA				
Enzima	K_M (mM)	V_{max} (μ M/seg)	k_{cat} (1/seg)	k_{cat}/K_M (1/mM.seg)
Hieronymaína I	0,542	0,0524	0,48	0,885

2.3.2.7.2. CBZ-*p*-Nitrofenil ésteres de aminoácidos

Las tres peptidasas purificadas presentaron diferente comportamiento con los cinco sustratos sintéticos ensayados (N- α -CBZ-*p*-Nitrofenil ésteres de aminoácidos, Figuras 2.3.19–21. Tanto hieronymaína I como II muestran mayor preferencia por el derivado de Ala, con una actividad de 0,563 y 0,188 Ucbz/ml, respectivamente, mientras que para hieronymaína III este sustrato ocupa el tercer lugar en importancia (0,018 Ucbz/ml). Por su parte hieronymaína III hidroliza preferentemente el derivado de Lys (0.319 Ucbz/ml), mientras que las otras dos enzimas lo hidrolizan en menor grado.

Hieronymaína I y II se diferencian entre sí porque el sustrato preferido en segundo lugar es el derivado de Gly (0.225 Ucbz/ml) para la primera y el de Asp (0.165 Ucbz/ml) para la segunda.

Figura 2.3.19. Actividad de hieronymaína I frente a sustratos N- α -CBZ-*p*-nitrofenil ésteres de aminoácidos.

Figura 2.3.20. Actividad de hieronymaína II frente a sustratos N-α-CBZ-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos.

Figura 2.3.21. Actividad de hieronymaína III frente a sustratos N-α-CBZ-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos.

En función de las preferencias manifestadas por las tres proteasas por los sustratos anteriormente mencionados, se realizaron estudios de cinética enzimática para cada enzima. En la Tabla 2.3.10 se consignan las constantes cinéticas calculadas a partir de los datos experimentales utilizando regresión hiperbólica.

Tabla 2.3.10. Cinética con N-α-CBZ-p-Nitrofenil ésteres de aminoácidos						
Enzima	Sustrato	K_M (mM)	V_{max} (μ M/seg)	k_{cat} (1/seg)	k_{cat}/K_M (1/mM.seg)	
Hieronymaína I	Ala	0,099	0,68	0,106	1,074	
Hieronymaína II	Ala	0,074	0,24	0,028	0,377	
	Asp	0,059	0,16	0,009	0,147	
Hieronymaína III	Lys	0,109	0,250	0,144	1,319	

2.3.2.7.3. Z-Phe-Arg-*p*-nitro-anilida

Hieronymaína I y II mostraron diferente grado de afinidad y número de recambio frente al sustrato Phe-Arg-*p*-nitro-anilida. Las constantes cinéticas se calcularon mediante el uso de una regresión hiperbólica correspondiente al modelo enzimático de Michaelis-Menten (Tabla 2.3.11). La actividad de hieronymaína III frente a este sustrato no fue detectable.

Tabla 2.3.11. Cinética con Phe-Arg-*p*-nitroanilida

Enzima	K _M (mM)	V _{max} (μM/seg)	k _{cat} (1/seg)	k _{cat} /K _M (1/mM.seg)
Hieronymaína I	1.13	0.1360	1.12	0.99
Hieronymaína II	0,72	0.0128	1.82	2,54

Este sustrato es también hidrolizado por todas las proteasas de *Carica papaya* y por bromelaína de fruto, ananaína y comosaína, pero no por bromelaína de tallo (Barret *et al.*, 2004).

2.3.2.7.4. Z-Arg-Arg-*p*-nitro-anilida

Hieronymaína I y II no presentaron actividad detectable frente a este sustrato, mientras que hieronymaína III lo hidrolizó liberando 0,404 μmoles de *p*-nitroanilina por mg de enzima por minuto. Este sustrato es también hidrolizado por bromelaína de tallo y comosaína, marcando una preferencia por los residuos polares en el sitio activo de la enzima.

2.3.3. Clonado y secuenciamiento del cDNA de una peptidasa de *Bromelia hieronymi*

2.3.3.1. Obtención del cDNA

A partir de frutos de *Bromelia hieronymi* triturados en nitrógeno líquido se extrajo el RNA total que permitió obtener el cDNA de una peptidasa cisteínica mediante 3'RACE-PCR.

En primer lugar se obtuvo la primera cadena de cDNA por retrotranscripción empleando el cebador RoR₁polidT y la transcriptasa reversa AMV. Esta cadena fue posteriormente amplificada por PCR, utilizando los cebadores específicos Nt-H₁ y Nt-H₂₋₃ y el cebador reverso R₀. Las

muestras provenientes de la retrotranscripción fueron utilizadas para la PCR sin diluir o diluyendo 1:10, y se emplearon tres temperaturas diferentes de “annealing”. Se trabajó en paralelo con dos extractos de RNA obtenidos con los dos buffers de lisis provistos por el kit. En la Tabla 2.3.12 se detallan las condiciones de reacción para cada tubo.

Tabla 2.3.12. Reacción de PCR.							
Cebador Nt H-1				Cebador Nt H-2-3			
Buffer de lisis	Dilución	Tº	Número de tubo	Buffer de lisis	Dilución	Tº	Número de tubo
RP	Sin diluir	48	1	RP	Sin diluir	48	13
		50,8	2			50,8	14
		54	3			54	15
	1:10	48	4		1:10	48	16
		50,8	5			50,8	17
		54	6			54	18
DCT	Sin diluir	48	7	DCT	Sin diluir	48	19
		50,8	8			50,8	20
		54	9			54	21
	1:10	48	10		1:10	48	22
		50,8	11			50,8	23
		54	12			54	24

Los productos de la reacción fueron analizados en un gel de agarosa como muestra la Figura 2.3.22.

Figura 2.3.22. Electroforesis de agarosa al 2% de los productos de RT-PCR. Calles 1-6: tubos 1-6; calles 7 y 26; patrones de PM "DNA MW Marker X", Roche; calles 8-25: tubos 1-24.

A partir de estos resultados se puede observar que la PCR tuvo mayor rendimiento a 48°C. Los dos cebadores utilizados fueron igualmente útiles, ya que en todos los tubos hubo amplificación. Por otra parte el empleo de diferentes buffer de lisis en la obtención del RNA no afectan los resultados, y además se logró la amplificación utilizando la muestra diluida 1:10 o sin diluir.

En la electroforesis se observa la presencia de bandas de alrededor de 900 pb, valor esperado para moléculas de cDNA que codifican proteínas de unos 300 residuos, compatibles con el tamaño de las proteasas vegetales cisteínicas.

2.3.3.2. Clonado del cDNA

El cDNA proveniente de productos de la PCR fue clonado en *E. coli* (XL1-Blue) utilizando el vector pGEM-T Easy, Promega. La inserción del cDNA de interés en los clones de colonias blancas fue verificada a través de PCR utilizando los cebadores Nt-H1 y Nt-H2-3 y R₀ seguida de electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar los productos de reacción.

Con el fin de obtener el DNA plasmídico en cantidad suficiente para ser secuenciado se prepararon cultivos de cada uno de los clones seleccionados y se realizó la extracción del mencionado material plasmídico. Una alícuota de cada una de las muestras fue digerida con la enzima de restricción SAL I y posteriormente las mismas fueron analizadas y cuantificadas utilizando un gel de agarosa al 1% (Figura 2.3.23).

Figura 2.3.23. Electroforesis de agarosa al 2% de los DNA plasmídicos amplificados por PCR. Calles 8 y 24: patrones de PM "DNA MW Marker III", Roche. Calles 1-7, 9-23 y 25-32 contienen los DNA plasmídicos de los 30 clones.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las muestras provenientes de los clones visualizados en las calles 10, 13, 14 y 28, que fueron enviadas a secuenciar. Se solicitó la secuenciación utilizando los cebadores "T7 promotor" y "SP6 promotor" (estos cebadores permiten amplificar a partir de cada uno de los extremos la zona de inserción de DNA en el vector pGEM-T Easy), lo que permitió obtener la secuencia de las dos cadenas de DNA para cada uno de los clones.

2.3.3.3. Obtención de la secuencia de una peptidasa

En la Tabla 2.3.13 se observa la secuencia consenso que fue obtenida luego de analizar y procesar las secuencias de los clones mencionados en el punto anterior. Dicha secuencia consenso está constituida por 875 nucleótidos (en color negro), de los cuales los 690 primeros, justo antes de la localización del

codón “TGA” de stop, codifican para una cadena polipeptídica (en color rojo) cuyo extremo N-terminal no coincide exactamente con ninguna de las tres proteasas purificadas a partir de este material vegetal (apartado 2.3.2.6). El triplete “TGA” que se muestra resaltado en gris corresponde a la señal de stop para la síntesis proteica. Al final de la secuencia nucleotídica se observa la secuencia señal de poliadenilación “AATAAA” (en color azul) y la cola poliA propiamente dicha (en color verde), constituida por 17 residuos de A. La secuencia de la peptidasa madura consta de 230 aminoácidos. Posee siete residuos de cisteína (resaltados en celeste), lo que es característico de fitopeptidasas cisteínicas (Napper *et al.*, 1994).

Tabla 2.3.13. Secuencia consenso del cDNA. En esta figura se muestra la secuencia aminoacídica (rojo) y nucleotídica (negro) consenso de la peptidasa clonada.	
1 1	A V P Q S L D W R D Y G A V T S V K N Q GCGGTGCCTCAAAGTCTTGATTGGAGAGACTATGGTGCCGTCACAAGTGTCAAGAATCAA
21 61	G R C G S C W S F S A I A T V E G I Y K GGCAGATGCGGTTCTTGCTGGTCATTCTCTGCAATTGCGACGGTCGAGGGAATTTACAAA
41 121	I K T G N L V S L S E Q E V L D C A V S ATCAAAACAGGGAACCTTAGTATCTCTATCGGAGCAAGAAGTTCTCGATTGTGCTGTTAGC
61 181	H G C K G G W V D K A Y N F I I S N N G CACGGGTGCAAAGGCGGGTGGGTGGACAAGGCTACAACCTTCATCATATCTAACACGGT
81 241	V T S A A Y Y P Y K G Y Q G T C G A N S GTGACCTCCGCAGCTTACTATCCTTATAAAGGATACCAAGGCACCTGCGGTGCCAATAGC
101 301	V P N A A Y I T G Y K Y V Q R N N E R S GTGCCCAATGCAGCCTACATTACTGGTTATAAATATGTGCAGAGGAACAACGAACGCAGC
121 361	M M Y A L S N Q P I A A L I D A S G K N ATGATGTACGCTTTGTGCAATCAACCTATAGCTGCTCTCATTGACGCTAGCGGGAAAAAC
141 421	F Q Y Y K G G V Y S G P C G T S L N H A TTTCAATATTACAAAGGCGGTGTGTATAGCGGACCTTGTGGAAC TAGTCTCAATCATGCC
161 481	I T V I G Y G Q D S S G I K Y W I V K N ATCACCGTTATAGGTTACGGGCAAGATAGCAGCGGAATAAAATATTGGATAGTAAAGAAC
181 541	S W G T S W G E R G Y I R M A R D V S S TCATGGGGTACTTCATGGGGTGAGCGTGATATATTCGTATGGCGAGAGATGTGTCATCT
201 601	S G I C G I A M A P L F P T L D S G A N TCAGGAATATGTGGAATTGCCATGGCTCCTCTTTTCCCACTCTAGATTCAGGAGCCAAT
221 661	V E V L K M V S E T stop GTCGAAGTTCTTAAGATGGTTTCTGAACTTGAAGCTCCGTATGAGTCGGAAGCGATGAT
721	CTAGCAATGCACTACAATGTGCTATAAATAAGGATGTTTCGCATCCAATTGTACTTCCCT
781	TGCTTCGACGTTGTGGTTTTCTGTTATATTTTCGTTGTATCCATACCAGTGAGTATGTACG
821	TTTGAATATCTACATTTGAATTAATGTGCTCCTTAATTAAAAA

Esta secuencia fue introducida en el programa ProtParam tool del sitio web ExPASy Proteomics server (www.expasy.org) y se calcularon algunas de las propiedades fisicoquímicas del polipéptido: masa molecular, 24.773 Da; pI teórico, 8,6; coeficiente de extinción molar a 280 nm, 58.705 M⁻¹ cm⁻¹ (asumiendo que todos los residuos Cys aparecen como mitad de una cistina).

En la Tabla 2.1.13 se muestra el alineamiento de la estructura primaria de la peptidasa clonada con las secuencias completas de cuatro proteasas cisteínicas: fastuosaina (Cabral *et al.*, 2006), ananaína (Lee *et al.*, 1997), macrodontaina I (López *et al.*, 2000) y bromelaina de tallo (Ritonja *et al.*, 1999).

Tabla 2.1.13. Alineamiento de la peptidasa clonada con otras cuatro cisteíno proteasas vegetales.		
B. hieronymi	AVPQSLDWRDYGAVTSVKNOGRCSGWSFSAIATVEGIYKIKTGNLVSL	
Fastuosaina	AVPQSLDWRDYGAVTSVKNGSCGSAWAFSAIATVEGIYKIKAGNLISL	
ananaína	SVPQSLDWRDSGAVTSVKNOGRCSGSAFASAIATVESIYKIKRGNLVSL	
Macrodontaina I	AVPQSLDWRDYGAVNEVKNGPCGGSAWAFSAIATVEGIYKIRKGNLVYLS	
Stem bromelain	AVPQSLDWRDYGAVTSVKNOGPCGSAWAFSAIATVESIYKIKKGILEPLS	
B. hieronymi	EQEVLDCAVSHGCKGGWVDKAYNFIISNNGVTSAAIYPYKGYQGTGANS	
Fastuosaina	EQEVLDCALSYGCDGGWVNKAYDFIISNNGVTSFANLPYKGYKGPCNHND	
ananaína	EQEVLDCAVSYGCKGGWINKAYSFIISNNGVASAAIYPYKAAKGTCKTNG	
Macrodontaina I	EQEVLDCAVSYGCKGGWVNRAYDFIISNNGVTTDENYPYRAYQGTGNANY	
Stem bromelain	EQEVLDCAKGYGCKGGWEFRAFEFIISNNGVASGAIIYPYKAAKGTCKTDG	
B. hieronymi	VPNAAYITGYKYVQRNNERSMMYALSNQPIAALIDASGKNFQYYKGGVYS	
Fastuosaina	LPNKAYITGYTYVQSNNERSMMIAVANQPIAALIDAGG-DFQYYKSGVFT	
ananaína	VPNSAYITTRYTYVQRNNERNMMYAVSNQPIAALIDASG-NFQHYKRGVFT	
Macrodontaina I	FPNSAYITGYSYVRRNDESHMMYAVSNQPIAALIDASGDNFQYYKGGVYS	
Stem bromelain	VPNSAYITGYARVPRNNESSMMYAVSKQPIITVAVDANA-NFQYYKSGVFN	
B. hieronymi	GPCGTSLNHAIITVIGYGQDSGKIYWIIVKNSWGTSWGERGYIRMARDVSS	
Fastuosaina	GSCGTSLNHAIITVIGYGQTSSTGKYWIIVKNSWGTSWGERGYIRMARDVSS	
ananaína	GPCGTRLNHAIVIGYGQDSGKKFWIVRNSWGAGWEGEGYIRLARDVSS	
Macrodontaina I	GPCGFSLNHAITTIIGYGRDS----YWIIVRNSWGSSWGQGGYVIRRDVSH	
Stem bromelain	GPCGTSLNHAVAITVIGYGQDSI-----IYPKKWGAKEAGYIRMARDVSS	
		Porcentaje de identidad
B. hieronymi	---GICGIAMAPLEPTLDSGANVEVLKMOVSET	100%
Fastuosaina	-PYGLCGIAMAPLEPTLQSGANADEVKIMISES	81%
ananaína	SSFGICGIAMDPLYPTLQSGPSVEVI	74%
Macrodontaina I	-SGGVCGIAMSPLPTL	72%
Stem bromelain	-SSGICGIAIDPLYPTLEE	64%

Se encuentran resaltados en azul los residuos comunes a todas las secuencias y por otra parte están escritos en rojo aquellos residuos que

forman parte del sitio catalítico. El elevado porcentaje de identidad de la secuencia obtenida con respecto a las correspondientes a las cuatro fitopeptidasas cisteínicas con las que se la comparó, se puede concluir que se ha obtenido la secuencia de una proteasa cisteínica. Hay residuos que se encuentran altamente conservados, como los del sitio catalítico (Gln19, Cys25, His159 y Asn175, numeración de papaína) que definen su función biológica, así como las seis cisteínas restantes, que realizan un gran aporte a la estructura tridimensional por formación de puentes disulfuro.

Sin embargo, la masa molecular calculada es superior a las de hieronymaína I, II y III y la región N-terminal de la secuencia no coincide con ninguna de ellas (Tabla 2.1.14). Tampoco coincide el valor de pI teórico (8,6) con ninguna de las bandas mayores detectadas al IEF, aunque este dato no es relevante, ya que el valor de pI real depende de factores como la presencia de grupos fosfato que provocan variación en la carga de la molécula y no son considerados en el cálculo teórico. Por lo tanto se podría pensar que esta secuencia pertenece a una cuarta proteasa presente en la muestra.

Tabla 2.1.14. Comparación de la secuencia N-terminal obtenida por clonación y hieronymaína II	
Secuencia nueva	AVPQSLDWRDYGAVTSVKNQGR
Hieronymaína I	ALPESIDWRAGAVTEVKRQDG
Hieronymaína II	AVPQSIDWRVYGAV
Hieronymaína III	AVPQSIDWRRYGAVTTSRNQG

2.4. Conclusiones

En el capítulo 1 se describió el aislamiento y caracterización de una preparación proteolíticamente activa de un extracto crudo de *Bromelia hieronymi* obtenido por precipitación acetónica (PAR). Por isoelectroenfocamiento se determinó la presencia de entre 3 y 6 proteasas en dicha muestra.

Empleando diferentes sistemas cromatográficos de intercambio iónico (FPLC) se purificaron tres peptidasas que fueron posteriormente caracterizadas bioquímicamente y estructuralmente. En la Tabla 2.4.1 se describen comparativamente las características de hieronymaína I, II y III.

Tabla 2.4.1. Comparación de las propiedades determinadas a las tres endopeptidasas purificadas			
	Hieronymaína I	Hieronymaína II	Hieronymaína III
Método de purificación:			
cromatografía	CM Sepharose FF pH 8,5	Q Sepharose HP pH 8,5	Q Sepharose HP pH 8,5
recromatografía	CM Sepharose FF pH 7,5	SP Sepharose HP pH 5,6	SP Sepharose HP pH 4,5
Masa molecular	24.066	23.411	23.713
pI	10,4	7,6-8,3	5,9-6,4
Actividad específica	21,9	17	33,8
% de recuperación	21,4	6,4	2
Rango de pH óptimo	8,5-9,5	7,5-9,0	8,6-9,3
Incremento de actividad con cisteína	11%	6%	1,7%
E-64 y ácido iodoacético	Inhibición total	Inhibición total	Inhibición total
% de enzima activa	57	57	61
	PFLNA	-	-
Preferencia por sustratos sintéticos	N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de Ala y Gly	N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de Ala y Asp	N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de Lys y Asp
	Z-Phe-Arg-p-nitroanilida	Z-Phe-Arg-p-nitroanilida	-
	-	-	Z-Arg-Arg-p-nitroanilida
Secuencia N-terminal	ALPESIDWRAK-GAVTEVKRQDG	AVPQSID-WRVYGAV	AVPQSIDWRRY-GAVTTSRNQG

La estrategia de purificación se basó en el valor de los pI de las fracciones activas observadas en el IEF-zimograma, ya que las masas moleculares son muy semejantes, lo que dificulta una separación por exclusión molecular.

Todas las proteasas aisladas son activadas por cisteína e inhibidas por E-64 y ácido iodoacético, lo cual permite clasificarlas como cisteinilpeptidasas. El rango de pH óptimo (mayor al 90% actividad) se ubica en todos los casos en la zona alcalina. La homogeneidad de las fracciones puras se verificó mediante el análisis de las muestras por MALDI-TOF-TOF y el ulterior secuenciamiento del extremo N-terminal. La presencia de más de una proteasa es un hecho común en otros representantes de la familia Bromeliaceae, como fue descrito para *Ananas comosus* (Murachi, 1970; Rowan & Buttle, 1994) *Bromelia balansae* (Pardo *et al.*, 2001), *B. Pinguin* (Payrol *et al.*, 2005) y *Pseudananas macrodontes* (López *et al.*, 2000; López *et al.*, 2001), entre otras. Las diferencias en masa molecular, secuencia N-terminal, así como en la preferencia por sustratos sintéticos específicos les otorga a las tres hieronymaínas una identidad propia.

Adicionalmente, se extrajo el RNA total a partir de frutos inmaduros de *B. hieronymi*, que permitió obtener por RT-PCR el cDNA de una peptidasa cisteínica, que fue amplificado por PCR utilizando cebadores específicos y se clonó en *Escherichia coli* XL1-Blue, utilizando el vector pGEM-T Easy. Los clones seleccionados fueron secuenciados, obteniéndose la secuencia de una peptidasa cuyas características estructurales permiten incluirla dentro de la familia de la papaína. La masa molecular y la secuencia aminoacídica N-terminal de la peptidasa clonada difieren de las correspondientes a las tres peptidasas purificadas por cromatografía, datos que indicarían la presencia de una nueva peptidasa existente en el extracto crudo pero que podría haber sufrido una temprana degradación en el proceso de extracción inicial.

Referencias bibliográficas

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Saffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller W. & Lipman, D.J. (1997). " Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database searchprograms" . *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-402.
- Arima, K., Uchikoba, H., Yonezawa, H., Shimada, M., Kaneda, M., (2000). " Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*" . *Phytochemistry*. **53**: 639-644.
- Barrett A. J. & Kirschke, H. (1981). " Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L" . *Meth. Enzymol.* **80**, 535-561.
- Barrett, A.J., Kumbhavi, A.A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G., Tamai, M., Hanada, K. (1982). " L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L" . *Biochem. J.* **201**:189-198.
- Barrett A.J., Rawlings N.D. & Woessner, J.F. (2004). " Handbook of Proteolytic Enzymes" (2nd.Ed.), Academic Press, London, UK.
- Belozersky, A., Dunaevsky, Y.E., Voskoboinikova, N. (1990). " Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat *Fagopyrum esculentum* seeds" . *Biochem. J.* **272**:677-682.
- Boller, (1986). " Roles of proteolytic in interactions of plant with other organisms" . Plant proteolytic enzymes (J.M. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol I, págs.:68-96.
- Bond, H.M., Bowles, D.J. (1983). " Characterization of soybean endopeptidase activity using exogenous and endogenous substrates" . *Plant Physiol* **72**:345-370.
- Botella, MA., Xu, Y., Prabhe, TN., Zhao, Y., Narasimahan, ML., Wilson, KA., Nielsen, SS., Bressau, RA. & Hasegawa, PM. (1996). " Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate" . *Plant Physiol.* **112**:1201- 10.
- Bradford, M.B. (1976). " A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" , *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
- Bruno M.A., Pardo, M.F., Caffini, N.O. & López, L.M. I., (2003). " Hieronymain I, a New Cysteine Peptidase Isolated from Unripe Fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)" . *Journal of Protein Chemistry*, **22**(2):127-34.
- Bruno, M.A., Trejo S.A., Avilés, F.X.Caffini, N.O. &López, L.M.I. (2006). " Isolation and Characterization of Hieronymain II, Another Peptidase Isolated from Fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *The Protein J.* **25**(3):224-31.
- Buell C.R., Yuan Q., Ouyang S., Liu J., Zhu W., Wang A., Maiti R., Haas B., Wortman J., Pertea M., Jones K.M., Kim M., Overton L., Tsitrin T., Fadrosh D., Bera J., Weaver B., Jin S., Johri S., Reardon M., Webb K., Hill J., Moffat K., Tallon L., Van Aken S., Lewis M., Utterback T., Feldblyum T., Zismann V., Iobst S., Hsiao J., de Vazeille A.R., Salzberg S.L., White O., Fraser C.M., Yu Y., Kim H.-I., Rambo T., Currie J., Collura K., Kernodle-Thompson S., Wei F., Kudrna K., Ammiraju J.S.S., Luo M., Goicoechea J.L., Wing R.A., Henry D., Oates R., Palmer M., Pries G., Saski C., Simmons J., Soderlund C., Nelson W., de la Bastide M., Spiegel L., Nascimento L., Huang E., Preston R., Zutavern T., Palmer L., O'Shaughnessy A., Dike S., McCombie W.R., Minx P., Cordum H., Wilson R., Jin W., Lee H.R., Jiang J., Jackson S.; (2005). "Sequence, annotation, and analysis of synteny between rice chromosome 3 and diverged grass species.";*Genome Res.* **15**:1284-91.
- Buttle, D.J, Ritonja, A., Pearl, L.H., Turk, V., and Barrett, A.J. (1990). " Selective cleavage of glycyl bonds by papaya proteinase IV" .*FEBS Lett.* **260**, 195-197.

- Cabral, H., Rahal, P., Tajara, E.H.S., Leopoldino, A.M., and Bonilla-Rodriguez, G.O. (2004) GenBank, accession AY563270, Direct Submission.
- Cabral, H., Leopoldino A.M., Tajara, E.H., Greene L.J., Faca, V.M., Mateus R.P., Ceron, C.R., de Souza Judice W.A., Julianod L. & Bonilla-Rodriguez G.O. (2006). "Preliminary functional characterization, cloning and primary sequence of Fastuosain, a cysteine peptidase isolated from fruits of *Bromelia fastuosa*" . *Protein Pept Lett.* **13**(1):83-9.
- Carter, C.E., Marriage, H. & Goodenough P.W. (2000). " Mutagenesis and kinetic studies of a plant cysteine proteinase with an unusual arrangement of acidic amino acids in and around the active site" . *Biochemistry.* **39**(36):11005-13
- Casals Mercadal; G. & Augé Fradera, J.M. " Pruebas de funcionalismo hepático: colestasis" . *Servicio de Bioquímica Clínica. CDB. Hospital Clínic. Barcelona. El Farmacéutico Hospitales.* **158**: 46-48; www.edicionesmayo.es, visitado en noviembre de 2006.
- Cercós M, Santamaría S, Carbonell J (1999). Cloning and characterization of TPE4A, a thiol-protease gene induced during ovary senescence and seed germination in pea. *Plant Physiol.* **119**:1341-48
- Caygill, C.P.J. & Ayling, C.M. (1979). " Effect of contaminating proteolytic activity upon insulin and insulin-protamine complex" . *J. of Pharmacy and Pharmacology.* **31** (12): 849-52.
- Chabregas, S. (2003). " Caracterização da localização subcelular da proteína THI1 de *Arabidopsis thaliana*" . Tesis doctoral. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Brasil.
- Chávez, M.A., Díaz, J., Pérez, U. & Delfín, J., (1990). " Fundamentos de cinética de reacciones enzimáticas" . Temas de Enzimología. Facultad de Biología. Santiago de Cuba
- Chen H.-J., Huang D.-J., Hou W.-C., Liu J.-S., Lin Y.-H., (2006). "Molecular cloning and characterization of a granulin-containing cysteine protease SPCP3 from sweet potato (*Ipomoea batatas*) senescent leaves". *J. Plant Physiol.* **163**:863-876.
- Choi, K. H. & Laursen, R. A. (2000). " Amino-acid sequence and glycan structures of cysteine proteases with proline specificity from ginger rhizome *Zingiber officinale*" .*Eur. J. Biochem.* **267** (5), 1516-1526.
- Cordeiro, M., Brodelius, P.E., Pais, S.M. (1998). Cyprosin. Handbook of Proteolytic Enzymes. (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. eds.), Academic Press, London, págs.: 839-42.
- Curotto, E., González, G. S., Reilly, O., Tapia, G. (1989). " Isolation and partial characterization of a protease from *Cucurbita ficifolia*" . *FEBS Lett.* **243**:363-365.
- Dalkin, K.S., Marcus, Bowles, D.J. (1983). " Endopeptidase activity in jackbeans and its effect on concanavalin A" . *Planta* **157**:531-5.
- Dixon, M. & E. Webb (1979) " Enzymes" , 3ª edición. Academic Press, NY. 47-206.
- Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M., Wolthers, B.G. (1968). " Structure of papain" . *Nature* **218**:929-932.
- Dubin, A. (2003). " Defense against own arms: staphylococcal cysteine proteases and their inhibitors" . *Acta Biochim Polon.* **50**: 715-24.
- Dunn, B.M. (2001). " Determination of protease mechanism. Proteolytic enzymes, a practical approach" (Beynon, R. And Bond, J.S., eds), *IRL Press*, Oxford. 79-84.
- Dunn, B.M., Kay, J., Gustchina, A. & Wlodawer, A. (1994). " Subsitepreferences of retroviralproteinases" . *Meth. Enzymol.* **241**: 254-78.
- Filippova, I.Yu., Lysogorskaya, E.N., Oksenoit, E.S., Rudenskaya, G.N., and Stepanov, V.M. (1984). "L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-.rho.-nitroanilide--A Chromogenic Substrate for Thiol Proteinase Assay," *Anal. Biochem.* **143**, 293-297.
- Firsthoefel, N.R., Cushman, M.A.F., Ostrem, J.A., and Cushman, J.C. (1998). " Induction of a cysteine protease cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum* leaves by

- environmental stress and plant growth regulators" . *Plant Sci.* **136**: 195–206.
- Frohman, M. A., M.K. Dush & G.R. Martin (1988) Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998– 9002.
- Funk, V., Kositsup, B., Zhao, C. & Beers E.P., (2002). "The Arabidopsis xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog." . *Plant Physiol.* **128**:84–94.
- Goldberg, A.I., Elledge, S.J. & Harper, J.W., (2001). " The cellular chamber of doom" . *Sci. Am.* **284**:58–61.
- Gounaris A.D., Brown, M.A. & Barret, A.J. (1984). " Human plasma α -cysteine proteinase inhibitor. " Purification by affinity chromatography, characterization and isolation of an active fragment" . *Bioch. J.* **221** (2): 445–52.
- Grudkowska, M. & Zagdańska, B. (2004). " Multifunctional role of plant cysteine proteinases" . *Acta Biochim. Polon.* **51** (3): 609– 624.
- Grzonka, Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Łankiewicz, L., Wicz, W., Wiczerzak, E., Ciarkowski, J., Drabik, P., Janowski, R., Kozak, E., Jaskólski, M., Grubb, A., (2001). " Structural studies of cysteine proteases and theirs inhibitors" . *Acta Biochim Polon.***48**: 1– 20.
- Hara, I.& Matsubara, H. (1980). " Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin. V. Proteolytic activities involved in globulin degradation in ungerminated seeds" . *Plant Cell Physiol.* **21**:219–232.
- Harrach T., Eckert K., Schulze-Forster K., Nuck R., Grunow D. & Maurer H.R. (1995). " Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain" . *J. Protein Chem.*, **14**(1): 41–52.
- Harrach, T., Eckert, K., Maurer, H.R., Machleidt, I., Machleidt, W., and Nuck, R. (1998). " Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase" . *J. Protein Chem.* **17**, 351–361.
- Hartley, B.S. (1960). " Proteolytic enzymes" . *Ann. Rev. Biochem.* **29**:45–72.
- Heinicke, R.M. (1953) " Complementary enzyme actions in the clotting of milk" . *Science.* **118**: 753–4.
- Huang, Y.J., To, K.Y., Yap, M.N., Chiang, W, Suen, D.F., Chen, S.C.G. (2001). " Cloning and characterization of leaf senescence up-regulated genes in sweet potato" . *Physiol Plant.* **113**:384– 91.
- Jaziri M, Yoshimatsu K, Homes J & Shimomura K (1994). " Traits of transgenic *Atropa belladonna* doubly transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **38**:257– 262
- Jones M.L., Chaffin G.S., Eason J.R. & Clark D.G., (2005). "Ethylene-sensitivity regulates proteolytic activity and cysteine protease gene expression in petunia corollas." .*J. Exp. Bot.* **56**:2733–44.
- Kamphuis IG, Kalk KH, Swarte MB, Drenth J. (1984) " Structure of papain refined at 1.65 Å resolution" .*J Mol Biol.* **179**:233–56
- 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., Sobue, A., Eida, S., Tominaga, N. (1986). " Isolation and characterization of proteinases from the sarcocarp of snake-gourd fruit" . *J. Biochem.* **99**:569–577.
- Kaneda, M., Tominaga, N. (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.
- Kelly G.S. (1996). " Bromelain: A literature review and discussion of its therapeutic applications" . *Alternative Medicine Review* **1** (4), 243–57.
- Kervinen, J. (1998). Aspartic Peptidases. En: Handbook of Proteolytic Enzymes (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J. ed.), Academic Press, London. Págs.: 836–9.

- Kyndt T., Van Damme E.J., Van Beeumen J. & Gheysen G. (2007). "Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp."; *FEBS J.* **274**:451-462.
- Koizumi, M., Yanaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H. and Shinozaki, K. (1993). "Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*." *Gene.* **129**: 175- 82.
- Lee, K.L., Albee, K.L., Bernasconi, R.J. & Edmunds, T., (1997). "Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases". *Biochem. J.* **327**,199-202.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson & M.M. Cox (2004). "Principles of Biochemistry", 4th Ed., Worth, 191-237.
- Lian Z. (1999). "Modification of calcite crystal morphology by designed phosphopeptides and primary structures and substrate specificities of the cysteine proteases mexicain and chmyomexicain". Thesis, Boston University, USA.
- Liggieri, C.S. (2005). "proteasas del látex de *Asclepias curassavica* L. Caracterización y potencial aplicación en la síntesis de péptidos." Tesis Doctoral., Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Ling, J.Q., Kojima, T., Shiraiwa, M. & Takahara H., (2003). "Cloning of two cysteine proteinase genes, CysP1 and CysP2, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis.". *Biochim. Biophys. Acta* **1627**:129-39
- Linthorst, H.J.M., van der Does, C, Van Can J.A. & Bol, J.F. (1993). "Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding tomato (*Lycopersicon esculentum*) cysteine proteinase. *Plant Physiol.* **101**: 705-6
- Llorente B.E., Brutti, C.B. & Caffini N.O. (2004). "Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.)". *J. of Agric. and Food Chem.* **52** (26): 8182-9.
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, Ch.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, L. Zipursky, & J. Darnell (2004). "Molecular Cell Biology", 5th Ed., W.H. Freeman, NY, págs. 73-9.
- López, L.M.I., C. Sequeiros, C.L. Natalucci, A. Brullo, B. Maras, D. Barra & N.O Caffini (2000). "Purification and characterization of macrodonta I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodonta* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)", *Protein Expres. Purif.* **18**: 133-40.
- López, L.M.I., Sequeiros, C., Trejo, S.A., Pardo, M.F., Caffini, N.O. & Natalucci, C.L. (2001) "Comparison of Two Cysteine Endopeptidases from *Pseudananas macrodonta* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **382**: 875-78.
- Malgorzata, R., Chmiel, D. & Stec-Niemczyk, J., (2004). "Modes of inhibition of cysteine proteases". *Acta Bichim. Polon.* **51**(4):861-873.
- 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., Caffini, N., Priolo, N. (2004b). "Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex". *Fitoterapia.* **75**: 480-490.
- Mitsuhashi W., Yamashita T., Toyomasu T., Kashiwagi Y., Konnai T., (2004). "Sequential Development of Cysteine Proteinase Activities and Gene Expression during Somatic Embryogenesis in Carrot."; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:705-713
- Moreau & Choplin, (2005) <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html> Copyright © Thierry MOREAU 1996-2005 INSERM U618 Université François Rabelais.
- Mrinalini Menon, P.J. Vithayathil, S.M. Raju, C.S., Ramadoss. (2002). "Isolation and characterization of proteolytic enzymes from

- the latex of *Synadenium grantii* Hook" .*Plant Science* **163**:131-139.
- Murachi, T. & Yamazaki, M. (1970) "Changes in conformation and enzymatic activity of stem bromelain in alkaline media" . *Biochemistry* **9** (9): 1935-8.
- Muta, E., Okamoto, Y., and Ota, S. (1994) DDBJ, Accession D38531, Direct Submission.
- Napper A.D., Bennett S.P., Borowski M., Holdridge M.B., Leonard M.J., Rogers E.E., Duan Y., Laursen R.A., Reinhold B. & Shames S.L. (1994). "Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain" . *Biochem. J.* **301** (3): 727- 35.
- Nelson, D. & M. Cox (2004), en Lehninger, Principles of Biochemistry, (4th. Ed.), Freeman, N.Y.
- Nong V.H., Becker C. & Muntz K. (1995). "cDNA cloning for a putative cysteine proteinase from developing seeds of soybean." . *Biochim. Biophys. Acta* **1261**:435-438.
- Obregón, W.D., Arribére, M.C., Morcelle del Valle, S., Liggieri, C., Caffini, N.O., Priolo, N.S. (2001). "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits" . *J. Protein Chem.* **20**:17-25.
- Ohyanagi, H., Tanaka, T., Sakai, H., Shigemoto, Y., Yamaguchi, K., Habara, T., Fujii, Y., Antonio, B.A., Nagamura, Y., Imanishi, T., Ikeo, K., Itoh, T., Gojobori, T. & Sasaki, T., (2006). "The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. japonica genome information." . *Nucleic Acids Res.* **34**:D741-D744.
- Okamoto, T., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., & Minamikawa, T. (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.
- Ota, S., E. Muta, Y. Katanita & Y. Okamoto (1985) "Reinvestigation of the fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelains" , *J. Biochem. (Tokyo)* **98**: 219-28.
- Ota, S., S. Moore & W.H. Stein (1964) "Preparation and properties of purified stem and fruit bromelains" . *Biochemistry.* **3**: 180-5.
- Pardo, M.F., López, L.M.I., Canals, F., Avilés, F.X., Natalucci, C.L. & Caffini, N.O. (2000) "Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae)" *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3795-800.
- Pardo, M.F., López, L.M.I., Caffini, N.O., Natalucci, C.L. (2001). "Properties of a milk clotting protease isolated from Fruits of *Bromelia balansae* Mez". *Biological Chemistry Hoppe-Seyler.* **382**: 871-874.
- Payrol, J.A., Obregón, W.D., Natalucci, C.L & Caffini, N.O. (2005). "Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit" . *Fitoterapia.* **6**:540-8.
- Pechan, T., Jiang, B.-H., Steckler, D.S., Ye, L., Lin, L., Luthe, D.S., and Williams, W.P. (1999.). cDNA clones encoding cysteine proteinases from corn (*Zea mays* L.) callus" . *Plant Mol. Biol.* **40**:, 111- 119.
- Perlstein S.H. & Kezdy F.J.(1973). "Isolation and characterization of a protease inhibitor from commercial stem bromelain acetone powder" . *J. of Supramolecular and Cellular Biochemistry.* **1** (3): 249-254.
- Pernas, M., Sanchez-Mong, R., Salcedo, G. (2000). "Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut" . *FEBS Lett.* **467**:206- 10.
- Pires, E. (1998a). "Cardosin A" . En: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J. ed.), Academic Press, London. págs.: 843-4.
- Pires, E. (1998b). "Cardosin B" . En: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J. ed.), Academic Press, London, págs.: 844-6.
- Polgar, L. & P. Halasz (1982). "Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteinases" . *Biochem. J.* **207**: 1-10.

- Priolo, N., Morcelle del Valle, S., Arribére, M.C., López, L.M.I., Caffini, N. (2000). "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits" . *J. Protein Chem.* **19**:39-49.
- Rajesh, R., Raghavendra Gowda, C.D., Natarajo, A., Dhananjava, B.L., Kemparaju, K., Vishwanath, B.S. (2005). "Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrinolytic activity" . *Toxicon* **46**: 84-92.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1994). "Families of cysteine peptidases" , *Meth. Enzymol.* **244**: 461-86.
- Revell.D.F, Cummings.NJ., Baker.K.C, Collrns.M.E., Taylor.M.A.J., Sumner.I.G., Pickersgill.R.W., Connerton.I.F. & Goodenough.P.W. (1993). "Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNAs encoding papaya proteinase omega from *Carica papaya*" *Gene*, **127**:221-5.
- Ritonja, A.,Buttle, D.J., Rawlings, N.D., Turk, V. & Barret, A.J. (1989). "Papaya proteinase I amino acid sequence" . *FEBS Lett.* **258**(1): 109-12
- Rowan, A.D., Buttle, D.J. & Barrett, A.J. (1988). "Ananain: a novel cysteine proteinases found in pineapple stem" . *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **267**(1): 262-70.
- Rowan, A.D., Buttle, D.J. & Barrett, A.J. (1990). "The cysteine proteinases of the pineapple plant" . *Biochem. J.*, **266**: 869-75.
- Rowan A.D. & Buttle D.J. (1994). "Pineapple cysteine endopeptidases" . *Methods in Enzymology* . **244**: 555-68
- 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., Bogacheva, A.M., Preusser, A., Kuznetsova, A.V., Dunaevsky Y.E., Golovkin, B.N. Stepanov, V.M. (1998). "Taraxalisin- a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb. s.l" . *FEBS Lett.* **437**:237-240.
- Rzychon, M., Sabat, A., Kosowska, K., Potempa, J., Dubin, A. (2003). "Staphostatins: an expanding new group of inhibitors with a unique specificity for the regulation of staphopains, *Staphylococcus* ssp. Cysteine proteinases" . *Mol Microbiol.* **49**:1051- 66.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sakuta C., Oda A., Konishi M., Yamakawa S., Kamada H. & Satoh S., (2001). "Cysteine proteinase gene expression in the endosperm of germinating carrot seeds." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**:2243-8.
- Salvesen, G.S., Nagase, H. (2001). "Inhibition of proteolytic enzymes" . En: *Proteolytic Enzymes* 2nd edition (Beynon, R. and Bond, J.S., eds), Oxford University Press, Oxford. págs.: 116-9.
- Schmid, M., Simpson, D., Kalousek, F., & Gietl, C. (1998). «A cysteine endopeptidase with C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosoma, a putative lytic compartment. » *Planta*. **206**: 466-75.
- Shutov, A. & Vaintraub, I. (1987). Degradation of storage proteinsin germinating seeds. *Phytochemistry.* **26**: 1557-66.
- Silverstein, R.M. (1974) "The assay of the bromelains using *N*-CBZ-L-lysine-*p*-nitrophenyl ester as substrates" *Anal. Biochem.* **62**: 478-84.
- Stryer, L., J.M. Berg & J.L. Tymoczko (2002). "Biochemistry" , 5th Ed, W.H. Freeman, NY, págs. 189-225.
- Taylor, M.A., Al-Sheikh, M., Revell, D.F., Sumner, I.G. & Connerton, I.F., (1999). "cDNA cloning and expression of *Carica papaya* prochymopapain isoforms in *Escherichia coli*." . *Plant Sci.* **145**:41-47.
- Thiede, B. (1997) "Mass spectrometry in peptide and protein sequence analysis" , en "Protein structure analysis. Preparation, characterization, and microsequencing" (R.M. Kamp, T. Choull-Papadopoulou & B. Witmann-Liebold, eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, págs. 279-93.

- Thompson, J.D., D.G. Higgins, & T.J. Gibson (1994) "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice". *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-80.
- Tranbarger TJ, Misra S (1996) Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotain) from Douglas fir. *Gene*. **172**: 221-226.
- Trejo, S.A.; López, L.M.I., Cimino, C.V., Cafini, N.O. & Natalucci, C.L., (2001). "Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae)." *Journal of protein Chemistry*. **20**(6): 469-77.
- Turk V, Bode W. (1991). "The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases". *FEBS Lett.* **285**:213- 9.
- Uchikoba, T., H. Yonezawa, H., Kaneda, M. (1995). "Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine protease". *J. Biochem.* **117**: 1126-30.
- Uchikoba, T., Hosoyamada, S., Onjyo, M., Arima, K., Yonezawa, H., Kaneda, M. (2001). "A serine endopeptidase from the fruits of *Melothria japonica* (thumb Maxim)". *Phytochemistry*. **57**:1-5.
- Uhlir, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. Nueva York: Wiley & Sons, págs.: 1-11, 146-79.
- Yonezawa, H. (1976). "Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin". *Meth. Enzymol.* **45**:678-95.
- Vairo Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N. & Natalucci, C. (2005). "Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate". *J. Dairy Res.*, **72**(3): 271-5.
- Van der Vyver, C., Schneiderei, J., Driscoll, S., Turner, J., Kunert, K. & Foyer C., (2003). "Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance". *Plant Biotech. J.* **1**:101- 12.
- Waldron, C., Wegrich, L.M., Merlo, P.A.O., Walsh, T.A., (1993). "Characterization of genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor". *Plant Mol. Biol.* **23**: 801- 12.
- Walsh, G. (2004). "Proteins Biochemistry and Biotechnology". Ed: John Wiley & Sons, LTD.págs.:420-435.
- Walreavens, V., Jaziri, M., van Beeumen, J., Schnek, A.G., Kleinschmidt, T. & Looze Y.(1993). "Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook.". *Biol. Chem.* **374**:501-506.
- Watanabe, H., Abe, K., Emory, J. Hosoyama, H. & Arai, S., (1991). "Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains)". *J. Biol. Chem.* **266**(25):16897-902.
- Watson, D.C., Yaguchi, M., and Lynn, K.R. (1990). "The amino acid sequence of chymopapain from *Carica papaya*". *Biochem. J.* **266**: 75 - 81.
- Yamada, F., N. Takahashi & T. Murachi (1976) "Purification and characterization of a proteinase from pineapple fruit, fruit bromelain A2", *J. Biochem. (Tokyo)* **79**: 1223-34.
- Yamuchi, D., Akasofu, H., and Minamikawa, T. (1992). "Cysteine endopeptidase from *Vigna mungo*. Gene structure and expression". *Plant Cell Physiol.* **33**: 789-97.
- Ye ZH, Varner JE (1996) "Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*. *Plant Mol Biol* **30**: 1233-1246.

Capítulo 3

Capítulo 3

Aplicación de un extracto de *Bromelia hieronymi* Mez en la elaboración de quesos

3.1. Introducción

3.1.1. Producción láctea en Argentina

3.1.1.1. Ubicación de las cuencas lecheras

La producción láctea de Argentina se concentra en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y Tucumán. Las regiones lecheras reciben una denominación específica (Figura 3.1.1), quedando conformadas dos grandes cuencas lecheras: la **cuenca de abasto**, la cual produce mayoritariamente leche fresca para consumo y la **cuenca de la industria** especializada en la elaboración de productos industriales tales como quesos y manteca.

La participación relativa de las principales provincias (Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y La Pampa, Figura 3.1.2) ha ido variando en función del tiempo. Si bien todas han mostrado crecimiento en los últimos años, la provincia de Buenos Aires ha perdido participación relativa. Esto puede explicarse, principalmente, por la mayor tasa de crecimiento que ha presentado la provincia de Santa Fe. Por otro lado, Córdoba mantiene su posición al igual que Entre Ríos, La Pampa y otras provincias (SAGPyA, 2003).

Figura 3.1.1. Ubicación de las cuencas lecheras argentinas: 1, Mar y Sierras; 2, Oeste; 3, Abasto Sur; 4, Abasto Norte; 5, Entre Ríos Cuenca B; 6, Entre Ríos Cuenca A; 7, Santa Fe Sur; 8, Santa Fe Central; 9, Córdoba Sur; 10, Villa María; 11, Noreste; 12, La Pampa y 13, Trancas.

Figura 3.1.2. Producción láctea provincial relativa respecto del total nacional según, INDEC -CNA, año 2002.

3.1.1.2. Producción Mundial

La producción mundial de leche cruda alcanzó en el año 2004 un volumen de 515,84 millones de t, del cual un 64% ingresó en el circuito industrial para la elaboración de productos lácteos, un 34% se utilizó como leche fluida y el 2% restante fue empleado como alimento animal. Al analizar la participación en la producción lechera por país en los últimos 5 años no se encuentran grandes cambios. El único país que incrementó su participación fue China, que pasó de 8,2 a 22 millones de t (6% mundial) en el año de análisis. Argentina se ubica

en el lugar N° 11 a nivel mundial con 9,2 millones de t y es el segundo productor de América del Sur detrás de Brasil (Corradi *et al.*, 2005).

3.1.1.3. Mercado Local

En Argentina la industria láctea se ubica en tercer lugar dentro de las industrias de alimentación del país y participa con el 12% del producto bruto del sector alimentario (año 2003). Aporta el 5,4% del valor bruto de producción, el 2,1% del empleo, el 2,1% de las exportaciones y el 0,1% de las importaciones de la industria nacional. Se caracteriza por presentar una estructura en la que coexisten por un lado un gran número de pequeñas empresas, muchas de ellas artesanales y que operan en el circuito informal de producción con un reducido peso económico, y por el otro unas pocas grandes y medianas empresas multiplantas y multiproductos, responsables de la mayor parte de la producción. En la Figura 3.1.3. se detallan las características más sobresalientes de la industria láctea argentina.

Producción	
Producción argentina de leche	9.169 mill. de lts.
Participación sobre la producción mundial	1,8% (posición N° 11)
Principales provincias productoras	Córdoba, Santa Fe, Bs. As., Entre Ríos, La Pampa
Establecimientos con rodeo de tambo	15.250
Vacas en ordeño (bajo control lechero oficial)	3 mill. de cab.
Industria y Consumo	
Número de plantas	848
Plantas por provincia	Córdoba: 332, Buenos Aires: 276, Santa Fe: 162, Entre Ríos: 54, La Pampa: 24
Litros procesados	8.522 mill. de lts.
9 Principales empresas	51% de la recepción de leche cruda
Principales productos elaborados:	
Leche pasteurizada	1.051 mill. de lts
Yogures	357 mil t
Leche en polvo	260 mil t
Queso pasta blanda	207 mil t
Consumo real de productos lácteos	186,8 lts/hab/año (equivalente leche)
Exportación	
Volumen de productos sólidos	275 mil t
Volumen de productos líquidos	2.163 mill. de lts.
Monto total de productos lácteos	542 mill. de u\$s
Principales productos sólidos	Leche en polvo (72%), Quesos (13%)
Principales destinos de productos sólidos	Argelia (21,6%), Venezuela (17,3%), México (10,5%) y Brasil (9,6%)

Figura 3.1.3. Industria láctea argentina (datos del año 2004).

A nivel industrial, durante la crisis económica del período 2001–2002 la reducción en los volúmenes de leche cruda recibida en planta incrementó la capacidad ociosa de los establecimientos industriales y ocasionó el cierre de algunos. Es probable que algunas industrias no hayan caído en quiebra o venta debido al estatus jurídico de cooperativa que caracteriza a varias de ellas. Por otro lado, la devaluación afectó el ingreso y la capacidad de pago de la industria. Se inició a partir de entonces una serie de reacomodamientos con enfrentamientos en el sector primario, y una fuerte competencia del sector informal. En el año 2004, la producción primaria fue de 9.169 millones de litros, lo que significó un aumento del 17% en sólo un año. Este incremento se explica por el ingreso de animales jóvenes de reposición, por el mayor precio de la leche que permitió una mayor ingesta del rodeo recompuesto que se expresa en la producción individual y por una mayor producción media por tambo, debido a la mayor eficiencia de los tambos que subsistieron a la crisis (Corradi *et al.*, 2005).

3.1.1.4. Principales productos lácteos

Hasta comienzos de la década del '90 las leches fluidas absorbían aproximadamente el 20% de la leche producida, siendo la leche pasteurizada la de mayor participación dentro de éstas con el 93%, mientras que la leche esterilizada sólo representaba el 5%. El 2% restante correspondía a la leche chocolatada. En cuanto a los productos lácteos, los **quesos** siempre tuvieron una participación muy importante, absorbiendo para su elaboración el 38% de la leche cruda producida y el 53% de la leche destinada a productos lácteos. En Argentina se elaboran, principalmente, tres tipos de quesos: el queso de pasta blanda, el de pasta semidura y el de pasta dura. El queso de pasta blanda es el de mayor importancia, representando el 47–50% de los quesos producidos en la década del '80. Las firmas más pequeñas se dedican casi exclusivamente a la elaboración de quesos, sobre todo los de pasta blanda, debido a los elevados costos financieros que involucra el estacionamiento de los quesos duros. En las empresas más grandes se registra una mayor diversificación de la producción, pero la elaboración de quesos sigue siendo

un rubro importante (los quesos representan alrededor del 30% de la producción, siendo más importante los de pasta semidura y dura). En la Figura 3.1.4 se puede observar la distribución en porcentaje de los diversos productos lácteos.

Figura 3.1.4. Participación de los principales productos lácteos, en % del total de la leche a productos. Dirección de Industria alimentaria, SAGPyA, año 2004.

La creciente inserción en los mercados externos durante la década del '90 indujo a la incorporación de nuevos productos, así como la diferenciación de productos y marcas dentro de los más tradicionales. Tal es el caso de las leches esterilizadas, leches en polvo (entera y descremada) y los quesos de pasta semidura.

Con respecto al comercio exterior, históricamente el principal destino de las exportaciones argentinas era Brasil, que consumía aproximadamente el 50% de las mismas. A partir del 2002 las exportaciones comenzaron a distribuirse hacia más países. En ese año el Mercosur absorbió el 42,8% de las exportaciones lácteas y el resto se destinó a otras regiones, tales como Medio Oriente, Argelia, Venezuela y México. Los principales productos de exportación son la leche en polvo y los quesos, con una participación, en el 2004, del 72% y el 13%, respectivamente. En relación a los quesos exportados, el de pasta semidura y el pasta dura son los de mayor importancia, con un total de 19.600 t y 9.900 t exportadas, respectivamente, siendo sus principales destinos México y Rusia para los semiduros y EE.UU. para los duros.

En cuanto a las importaciones, en los años 1991 y 1992 llegaron a alcanzar el 12% de la oferta interna, debido al fuerte crecimiento del consumo interno, que no pudo ser cubierto con la producción nacional. Sin embargo, en años posteriores disminuyeron y se ubicaron en torno al 2 o 3%. El MERCOSUR es el principal proveedor de productos lácteos de Argentina, siendo Uruguay el país que concentra la mayor parte de las importaciones de nuestro país. Las importaciones registradas en el 2004 fueron un 70% menor respecto de las registradas en el año 2003. Los principales productos importados son leches fluidas, quesos y productos fermentados distintos a los yogures y caseinatos (Corradi *et al.*, 2005).

3.1.2 Composición de la leche

La leche es el producto integral del ordeño total e ininterrumpido de una vaca lechera, bien constituida, bien alimentada y no fatigada. Debe recogerse limpiamente y no contener calostro. Desde el punto de vista físico constituye un sistema complejo: es una suspensión coloidal de partículas, en una fase acuosa dispersante. Por un lado las partículas son glóbulos de materia grasa de 3 a 5 μm de diámetro, pero también hay micelas proteicas, de 0,1 μm de diámetro, formadas por la interacción de caseínas y otras proteínas entre sí y con sales minerales y lactosa presentes en solución acuosa (Cheftel & Cheftel, 1976).

La composición de la leche, por su valor nutricional, es la única fuente de alimento para el mamífero joven. Está compuesta por una compleja mezcla de lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales. La composición media de la leche se muestra en la Tabla 3.1.1.

Tabla 3.1.1. Composición de la leche de vaca de razas occidentales.

Componente	Porcentaje medio
Agua	86,6
Grasa	4,1
Proteína	3,6
Lactosa	5,0
Ceniza	0,7

La mayor variabilidad composicional es exhibida por la fracción lipídica y como consecuencia, cuando se compran leches individuales, se observa un amplio rango de porcentajes de grasa. El pH de la leche recién obtenida es de 6,6-6,7, ligeramente inferior al de la sangre.

3.1.2.1. Proteínas de la leche

La leche contiene 30-35 g/l de proteína total de alta calidad nutritiva. La glándula mamaria sintetiza seis productos genéticos de carácter mayoritario: α_{s1} -caseínas, α_{s2} -caseínas, β -caseínas, κ -caseínas, β -lactoglobulinas y α -lactoalbúminas, que exhiben polimorfismo genético. Las proteínas de la leche se clasifican en caseínas y proteínas del lactosuero. Todas las caseínas forman un complejo esférico singular altamente hidratado, conteniendo fosfato cálcico, denominado micela (30-300 nm de diámetro). Debido a las características particulares de las caseínas y del complejo micelar, las proteínas de la leche pueden separarse fácilmente en las fracciones citadas. Históricamente esta separación mediante precipitación ácida o la coagulación con cuajo ha constituido la base de muchos productos lácteos, como el queso, productos del suero e ingredientes alimentarios (Fennema, 1992).

La caseína constituye la mayor fracción de las proteínas de la leche bovina; consecuentemente el coágulo formado por aglomeración de micelas de caseína durante la fabricación del queso retiene la mayoría de la proteína total de la leche.

Las proteínas del suero representan el 16,8% del total de proteínas y el porcentaje restante incluye hormonas y enzimas (Taverna, 2002). Anteriormente el suero lácteo era descartado. Luego fue utilizado para alimentación de animales y actualmente es incorporado a formulaciones alimentarias para el hombre, por su alta calidad proteica (Grasselli *et al.*, 1997; Conforti & Lupano, 2004; Macdermid & Stannard, 2006; Marshall, 2004).

En la leche también se encuentran componentes proteicos menores provenientes de proteólisis postraducciona, probablemente debido a la presencia de la proteasa plasmática plasmina. Así, las γ -caseínas y las

proteosas peptonas derivan de la β -caseína. Además se encuentran presentes, la albúmina de suero y algunas inmunoglobulinas (Fennema, 1992).

3.1.2.2. Lípidos de la leche

La composición lipídica de la leche bovina es la más compleja que se conoce. Los triglicéridos constituyen el 97-98% de los lípidos totales y se encuentran en glóbulos de 2-3 μm de diámetro rodeados por una membrana derivada de la membrana plasmática apical celular. Durante el almacenamiento hay lipólisis, aumentando la concentración de ácidos grasos libres, monoglicéridos y diglicéridos. Se han encontrado más de 400 ácidos grasos diferentes, pero sólo 20 de ellos son los más abundantes, de cadena corta (4-8 átomos de carbono). Los fosfolípidos y esteroides se presentan en las fracciones de membrana celular que pasan a la leche. Abundan fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina. El colesterol se encuentra en la membrana del glóbulo graso, su concentración no es elevada y está relacionada con el contenido graso total (Fennema, 1992).

3.1.2.3. Lactosa

Es el carbohidrato predominante en la leche bovina, constituyendo el 50% de los sólidos de la leche descremada. Su síntesis está asociada a la α -lactoalbúmina, que varía la especificidad de una de las enzimas involucradas en su síntesis. La lactosa se presenta tanto en forma α como β , siendo la segunda más soluble. Este disacárido, cuyo dulzor es aproximadamente la quinta parte del que posee la sacarosa, contribuye al sabor característico de la leche. Es el sustrato utilizado por las bacterias lácticas en el proceso de fermentación, que la desdoblan en glucosa y galactosa (Cheftel, 1976).

3.1.2.4. Sales minerales

Las sales de la leche son cloruros, fosfatos, citratos y bicarbonatos de sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales, componente inorgánico de la leche, no deben confundirse con las cenizas, que están constituidas por los óxidos de los minerales resultantes de la combustión. Las sales están distribuidas en una fase soluble, que puede obtenerse por diálisis o ultracentrifugación y una fase coloidal. La distribución de calcio, magnesio,

fosfato y citrato entre las fases soluble y coloidal y sus interacciones con las proteínas son factores importantes en la estabilidad de los productos lácteos. Si se tiene en cuenta que por el mecanismo de biosíntesis la osmolalidad debe ser constante, encontramos una relación entre el contenido de sales y la lactosa. Tal relación inversa ha sido probada para los contenidos de sodio y lactosa, y entre los contenidos de sodio y potasio. Como consecuencia la leche tiene un punto de congelamiento estable entre $-0,53$ y $-0,57$ °C, propiedad que se utiliza para detectar su adulteración por agregado de agua (Fennema, 1992).

3.1.2.5. Enzimas

Están presentes en pequeñas cantidades pero pueden influir de manera importante en la estabilidad de los productos lácteos. Sus efectos son mayores en el procesado de la leche a alta temperatura y tiempo corto y en el almacenamiento prolongado de los productos, puesto que tales condiciones favorecen la actividad residual de las enzimas o su reactivación. Las enzimas pueden estar presentes en la leche como resultado del crecimiento microbiano, pero también hay enzimas indígenas, sobre todo proteasas y lipasas, que ejercen sus efectos sobre el aroma y la estabilidad de las proteínas. Las óxidoreductasas también pueden tener efectos sobre la estabilidad del aroma, debido a su influencia sobre el estado oxidativo, particularmente de la fracción lipídica (Fennema, 1992).

3.1.3. Caseínas

La fracción caseínica de la leche representa cerca del 80% de las proteínas totales y está compuesta por α_{s1} , α_{s2} , β y κ caseínas y algunos productos de proteólisis, como la γ -caseína. Ellas pueden separarse por electroforesis o por ultracentrifugación. La fracción caseínica total puede obtenerse por precipitación a pH 4,6 (valor de pI). Su particular composición aminoacídica, su naturaleza anfifílica y la presencia de grupos fosfato esterificados en algunos residuos de serina, son factores que llevan a las caseínas a interactuar entre sí y con el fosfato cálcico para formar grandes complejos esféricos denominados **micelas** (Ikonen & Ojala, 1995).

La estructura primaria de la α_{s1} -caseína muestra que posee ocho posibles puntos de fosforilación donde puede interactuar con el calcio. Posee agrupamiento de residuos aminoacídicos polares y no polares distanciados, conformando una estructura dipolar singular compuesta de un dominio cargado altamente solvatado y un dominio globular hidrofóbico. La naturaleza flexible del dominio polar hace que la molécula sea muy sensible a la fuerza iónica y a la fijación de iones, particularmente protones y calcio. Por otra parte las interacciones intermoleculares entre dominios hidrofóbicos conducen a la autoasociación molecular o a la asociación con otras proteínas. Las características estructurales de esta caseína son compartidas con la α_{s2} y la β . Las homologías estructurales, particularmente en la región de agrupamiento de los residuos fosfoserilo, sugieren que todas estas proteínas pueden haber evolucionado de un gen ancestral común (Fennema, 1992).

La naturaleza anfifílica de la estructura de la κ -caseína es un factor clave de su capacidad única para estabilizar la micela de caseína. No contiene agrupamientos de residuos de fosfoserilo en su dominio polar a diferencia de las caseínas sensibles al calcio (α_{s1} , α_{s2} y β). Por lo tanto no liga tanto calcio y el dominio polar no puede variar su carga ni deshidratarse por adición de dicho ion y consecuentemente no precipita en su presencia. La carga electrostática y la hidratación del dominio polar de algunas moléculas de κ -caseína aumentan por glicosilación con oligosacáridos cargados. Esta proteína presenta un dominio N-terminal que tiene la particularidad de ser muy hidrofóbico. En buffers fisiológicos las κ -caseínas aisladas se encuentran en forma de grandes agregados esféricos parecidos a micelas de jabón, que se mantienen lateralmente unidos entre sí por los residuos hidrofóbicos, interactuando también con la porción hidrofóbica de las otras caseínas. (Fennema, 1992).

3.1.4. Estructura de la micela de caseína

La función biológica de la micela de caseína es la de **aportar** grandes cantidades de fosfato de calcio, que es altamente insoluble, en forma líquida al mamífero lactante, para asegurar una nutrición más eficiente (Ikonen & Ojala,

1995). Como ya se mencionó anteriormente, las micelas son partículas esféricas que contienen 92% de proteína compuesta por α_{s1} , α_{s2} , β y κ caseínas en una relación media de 3:1:3:1; además contienen fragmentos peptídicos (γ -caseína), fosfato de calcio, citrato, otros iones y suero lácteo retenido en su interior. La composición media de la micela de caseína se encuentra detallada en la Tabla 3.1.2. El tamaño promedio de la micela de caseína es de 130 a 160 nm (Alais, 1984).

Tabla 3.1.2. Composición media de la micela de caseína en g%.			
Caseínas		Componentes salinos	
α_{s1}	33%	Calcio	2,9%
α_{s2}	11%	Magnesio	0,2%
β	33%	Fosfato	4,3%
κ	11%	Citrato	0,5%
γ	4%		
Total caseínas	92%	Componentes salinos totales	8%

Existen muchos modelos que describen la estructura de la micela, pero todos respetan el concepto básico de que estaría conformada por un núcleo o centro hidrofóbico, recubierto por una capa hidrofílica constituida por la κ -caseína. (Mao *et al.*, 1992; Mercier & Vilotte, 1993).

En los últimos 40 años han sido propuestos muchos modelos para describir la micela de caseína y se los puede agrupar en tres categorías. En primer lugar los modelos “**coat-core**” únicamente postulan que el interior de la micela está compuesto de proteínas diferentes de las que están en el exterior. Estos modelos puede incluirse como un subconjunto de cualquiera de los otros dos grupos. Los modelos de **estructura interna** típicamente asignan interacciones específicas entre las caseínas y consideran la micela como una red porosa de proteínas. Los modelos de **subunidades** describen a la micela formada por submicelas idénticas o diferentes (Mc Mahon & Mc Manus, 1998).

La apariencia corpuscular y globular de la micela de caseína en micrografías electrónicas ha sido el soporte de los modelos de subunidades, donde se observan las submicelas casi esféricas, con un diámetro de 15 a 20 nm (Mc Mahon & Mc Manus, 1998)

Figura 3.1.5. Micrografía electrónica de una micela de caseína (70.000 X)

Las micelas se caracterizan por tener una estructura esponjosa y porosa que mantienen en equilibrio sus componentes con los de la fase sérica, contribuyendo a un grado de hidratación excepcional. La superficie es altamente hidratada y carece de reactividad. La supresión del dominio polar de la κ -caseína cambia las características superficiales de la micela, volviéndose reactiva, induciendo la asociación de las micelas y la formación de geles (Fennema, 1992).

Durante los últimos 20 años la información disponible por microscopía electrónica ha cobrado importancia, obteniéndose imágenes de muy alta resolución con detalles muy finos de las micelas de caseína, lo que provocó el advenimiento de nuevos modelos (Mc Mahon & Mc Manus, 1998)

3.1.5. Composición del cuajo (Calvo, M., <http://milksci.unizar.es>)

Para producir quesos se utiliza tradicionalmente el cuajo que se obtiene del abomaso (cuarto estómago) de terneros jóvenes. La quimosina, cuyo código es E.C.3.4.23.4, es una enzima proteolítica del cuajo. Cumple el rol de enzima digestiva junto con la pepsina, siendo la proporción de quimosina, y por ende la calidad del cuajo, mayor cuanto más joven es el animal. Durante muchos siglos se ha utilizado en la fabricación de quesos directamente el estómago de los terneros secado al sol y triturado.

En la década de 1870, Christian Hansen obtuvo la primera preparación de quimosina relativamente pura y de calidad constante de un lote a otro, fundando una compañía para su comercialización, que lleva su nombre y que todavía es una de las más importantes en la fabricación de enzimas para la industria alimentaria. Comercializó la quimosina disuelta en una solución salina concentrada, tal como se continúa haciendo actualmente.

La quimosina se sintetiza como pre-pro-quimosina inactiva que tiene en su cadena 58 aminoácidos más que la quimosina activa. Se secreta al estómago como pro-quimosina y se transforma en enzima activa por la eliminación proteolítica de un fragmento de 42 aminoácidos, quedando con un peso molecular de aproximadamente 30.700 Da. El sitio activo de la quimosina, como el de otras aspartil-proteinasas, está situado en un profundo hueco entre dos dominios donde se encuentran los dos residuos de Asp catalíticos. La selectividad de sustrato de la quimosina está determinada por presencia de una zona específica con cargas negativas, que interacciona con las His que ocupan las posiciones 98, 100 y 102 en la κ -caseína (Walsh, 2004).

La quimosina tiene tres variantes genéticas, la variante A, con un resto de aspártico en la posición 286, y la B, que tiene en esa misma posición un resto de glicina y la variante C. La variante A es algo más activa que la B frente a la caseína kappa, posiblemente porque la carga del aspártico favorece su interacción con ella. En cambio, la variante B es algo más estable a pH 3,5 o inferior

(<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/enzimascoagul.html>).

El desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, junto con la demanda no siempre satisfecha de quimosina de calidad, han inducido a la producción de quimosina recombinante utilizando microorganismos en cuyo genoma se ha insertado el gen de la pro-quimosina bovina. La cadena polipeptídica es la misma que la de la quimosina bovina, pero la glicosilación es distinta. La primera quimosina recombinante se obtuvo en 1988 (Quimosina B) en la levadura *Kluyveromyces lactis*, con el nombre comercial de "Maxiren", de la empresa Gist-Brocades. Se sintetiza en forma de pro-quimosina, que se

activa tras el lisado de las células una vez detenida la fermentación (Walsh, 2004).

En la fabricación de quesos industriales se utilizan también proteinasas obtenidas de microorganismos en lugar del cuajo animal. Una de las más utilizadas es la proteinasa de *Rhizomucor miehei*, que es también una aspartil-proteinasa, muy glicosilada, razón por la que probablemente es particularmente termorresistente.

También se utiliza en la elaboración de quesos la proteinasa de *Cryphonectria parasitica*, que es muy termolábil, por lo que se destruye en la etapa de calentamiento de quesos como el Emmental. En quesos no calentados, puede dar problemas al fragmentar la caseína beta. Menos importante es la proteinasa de *Bacillus subtilis*.

3.1.6. Enzimas coagulantes de la leche de origen vegetal

Muchos vegetales contienen proteinasas capaces de coagular las caseínas (Tabla 3.1.3). Algunas de estas proteinasas se utilizan en la elaboración de quesos tradicionales, especialmente en Portugal y en el Mediterráneo, incluyendo el sur de España. Se destaca la obtenida de la flor de cardo (*Cynara cardunculus* L.), que se utiliza en la elaboración de los quesos extremeños con denominación de origen "Torta del Casar" y "La Serena", y en los portugueses "Serra da Estrela". También se utiliza en Canaria, en la elaboración del "Flor de Guía". La preparación enzimática se obtiene artesanalmente macerando los pistilos de la flor con agua. Las flores de *Cynara humilis* también contienen proteinasas, que son más semejantes a la pepsina que a la quimosina en cuanto a su actividad.

También se utiliza en la coagulación de la leche, y desde hace muchos siglos (está citada en el *Liber Animalium* de Aristóteles), la proteinasa del látex de la higuera (ficaína). Otras proteinasas coagulantes se encuentran en el lampazo (*Herculeum spondylum*) y en la llamada "hierba cuajadera", *Galum verum* (<http://www.fortunecity.com/littleitaly/siena/600/fisiclec>).

Tabla 3.1.3. Especies vegetales que contienen enzimas coagulantes de la leche.

<i>Cynara cardunculus, humilis y scolymus</i>	Sá & Barbosa 1972 Heimgartner <i>et al.</i> , 1990 Macedo <i>et al.</i> , 1993
<i>Centaurea calcitrapa</i>	Domingos <i>et al.</i> , 1992 Tavaria, 1997 Reis <i>et al.</i> , 2000
<i>Euphorbia amygdaloides</i>	Demir <i>et al.</i> , 2005
<i>Bromelia balansae</i>	Pardo <i>et al.</i> , 2001
<i>Silybum marianum</i>	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2005
<i>Cynara scolymus L</i>	Llorente <i>et al.</i> , 2004
<i>Ananas comosus</i>	Cattaneo <i>et al.</i> , 1994
<i>Calotropis porcera</i>	Ibama & Griffiths, 1987
<i>Benincasa cerifera</i>	Gupta & Eskin, 1977
<i>Carica papaya</i>	Cabezas <i>et al.</i> , 1981
<i>Withania coagulans</i>	Singh <i>et al.</i> , 1973
<i>Dieffembachia maculata</i>	Padmanabhan <i>et al.</i> , 1993

Uno de los criterios mas importantes a tener en cuenta a la hora de seleccionar una enzima coagulante es que la relación coagulación / proteólisis sea comparable con la de la quimosina (Dalglish, 1992), tal que posea una alta actividad coagulante sumada a una baja actividad proteásica con bajo contenido de péptidos amargos (Gallager *et al.*, 1994), que son uno de los factores limitantes en la aceptabilidad de un queso (Lemieux *et al.*, 1989). Una proteólisis excesiva puede originar geles débiles y pérdida de material durante el proceso de la coagulación (Fox & Stepaniak, 1993), además de otros problemas durante la maduración.

3.1.7. Mecanismo de la coagulación de la leche

La quimosina del cuajo bovino utilizado para la manufactura de quesos se caracteriza por tener una alta especificidad por la k-caseína y una baja actividad proteolítica general (Pires *et al.*, 1994). Esta enzima cliva específicamente el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la k-caseína, separando la región hidrofílica del extremo de esta molécula que se encuentra orientado hacia el exterior de la micela, de la región hidrofóbica. Este proceso se conoce como “depilado” de la micela de caseína. El fragmento mayor de la κ-caseína, que va desde el aminoácido 1 al 105, conocido como **para-κ-caseína**, queda asociado a la micela (región hidrofóbica). El fragmento menor sumamente

soluble, denominado **casein-macropéptido**, es liberado y permanece en solución en el lactosuero luego de la coagulación de las micelas (Visser, 1993).

3.1.8. Proceso de elaboración de un queso

La denominación de queso se aplica al producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o de la leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos coagulados por la acción física del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario, con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especies y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes (Código Alimentario Argentino). Tradicionalmente el queso se confeccionaba como una forma de conservar los nutrientes de la leche. En la actualidad existen miles de variedades de quesos, siendo productos característicos de las distintas regiones del mundo.

Como primer paso en la manufactura de un queso, la leche debe clarificarse y pasteurizarse para obtener un producto higiénico. La operación de homogeneización normalmente no se aplica a la leche para quesería, ya que rompe los glóbulos grasos aumentando el área superficial de la grasa donde se adsorben partículas de caseína, que resulta en una cuajada suave, débil y con rancidez por hidrólisis de la grasa.

El paso siguiente consiste en el agregado de cloruro de calcio para reemplazar el calcio perdido durante la pasteurización, que ayuda a coagular y reduce la cantidad de cuajo requerida para tal fin. El nitrato de potasio o sodio puede adicionarse a la leche para controlar los efectos indeseables del *Clostridium tyrobutyricum* en quesos como Edam, Gouda, y Suizo, aunque no es recomendado por su toxicidad.

Otros aditivos opcionales son: colorantes como annato (colorante natural producido a partir de las semillas de *Bixa orellana*, que contienen bixina, un carotenoide amarillo), beta-caroteno y pimentón; el peróxido de hidrógeno, que se utiliza a veces como una alternativa al tratamiento de pasteurización y

también pueden agregarse lipasas que contribuyen al sabor apropiado a través de la hidrólisis de la grasa.

El paso siguiente es la inoculación de la leche con un fermento, que durante la maduración dará a cada queso sus propiedades organolépticas características.

Posteriormente se realiza la coagulación, que es esencialmente la formación de un gel desestabilizado de las micelas de caseína formando un agregado y una red que parcialmente inmoviliza el agua y atrapa los glóbulos grasos en la matriz recientemente formada. Esto puede lograrse mediante el agregado de enzimas coagulantes, el tratamiento ácido o el tratamiento térmico calor-ácido. La masa de proteínas precipitadas se denomina **cuajada**.

Después de que el gel alcanza la firmeza deseada es cortado en pedazos pequeños con una lira para aumentar el área superficial y lograr que elimine el suero. Cuanto menor sea el tamaño de grano logrado, más duro será el queso. La humedad final depende del tiempo y temperatura de la fase de cocci3n.

Cuando las cuajadas han alcanzado la humedad y acidez deseada se separa el suero. El manejo de la cuajada de aquí en adelante es muy específico para cada variedad de queso. El salado puede lograrse a través de la aplicaci3n de salmuera (Gouda), salado de la superficie (Feta) o sal en la tina (Cheddar).

Salvo en el caso del queso fresco, la cuajada se madura a diferentes temperaturas y tiempos hasta que se logran las características de sabor, cuerpo y textura deseadas. Durante la maduraci3n se degrada la lactosa, proteínas y la grasa por parte de los agentes de maduraci3n, que pueden ser las bacterias y enzimas de la leche, el cultivo láctico, el cuajo, las lipasas, hongos y levaduras adicionados y contaminantes medioambientales. Así el contenido microbiológico de la cuajada, su composici3n bioquímica, la temperatura y humedad afectan el producto final. Esta última varía de semanas a años según la variedad del queso a obtener (<http://www.fortunecity.com/littleitaly/siena/600/quesos.htm>).

3.1.9. Obtención de hidrolizados de caseínas

Los hidrolizados proteicos se obtienen a partir de la degradación parcial o total de las proteínas como productos peptídicos de menor peso molecular o incluso aminoácidos. Esta hidrólisis puede ser catalizada por ácidos, bases o por enzimas proteolíticas (Adler-Nissen, 1986). La hidrólisis enzimática es superior porque puede llevarse a cabo bajo condiciones semejantes a las fisiológicas, produce hidrolizados conteniendo mezclas peptídicas bien definidas, evita la destrucción de los L-aminoácidos y la formación de sustancias tóxicas como la lisin-alanina (Lahl & Brown, 1994; Mahmoud, 1994; Pedersen, 1994).

La hidrólisis de proteínas alimentarias es llevada a cabo por numerosas razones: mejoramiento de las características nutricionales, retardo en el deterioro, modificación de diferentes propiedades funcionales, obtención de péptidos y aminoácidos, prevención de interacciones indeseadas, cambios de sabores y aromas y remoción de factores inhibitorios o tóxicos (Lahl & Brown, 1994; Mahmoud, 1994; Pedersen, 1994; Maehashi *et. al.*, 1999). Debido a que las proteínas son uno de los principales constituyentes de los alimentos, sus propiedades estructurales y funcionales determinan mayormente las características sensoriales de los mismos. La funcionalidad de los productos de hidrólisis proteica es, por lo tanto, de gran importancia tecnológica.

Durante la maduración de un queso, la proteólisis es uno de los más importantes eventos bioquímicos que ocurren. El tipo de agente coagulante, la acidificación microbiana y la acción de la plasmina (enzima proteolítica indígena de la leche) son factores que juegan un importante rol en la proteólisis durante la manufactura del queso y su maduración. El seguimiento de esta maduración puede testearse por distintos métodos que incluyen el fraccionamiento acuoso con ácido tricloroacético o ácido fosfotúngstico, la cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico y la electroforesis en geles de poliacrilamida con urea como agente desnaturizante (Sousa & Malcata, 1997). El seguimiento de la hidrólisis de las proteínas lácteas puede

llevarse a cabo por medio de técnicas electroforéticas de alta resolución (Schägger & Von Jagow, 1987) que permiten establecer la ruptura de las moléculas de caseína durante las etapas tempranas de la maduración y la comparación de patrones hidrolíticos entre distintos tipos de quesos o para distintas condiciones en un mismo queso (Creamer, 1991).

Péptidos con actividad biológica pueden estar ocultos o inactivos en la secuencia aminoacídica de las proteínas lácteas y ser liberados o activados in vivo durante la digestión gastrointestinal, o más aún, durante el procesamiento de los alimentos vía proteólisis enzimática específica. Las caseínas, tanto en la leche sin procesar como en los productos lácteos, son una fuente importante de los péptidos arriba mencionados y su importancia biológica, el impacto en la salud humana y en la manufactura de nuevos aditivos funcionales para los alimentos ha sido motivo de intensa investigación (Silva & Malcata, 2000).

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Preparación enzimática

El PER obtenido por precipitación del extracto crudo con cuatro volúmenes de etanol constituyó el material de partida para todos los ensayos relacionados con coagulación de la leche, hidrólisis de caseínas y confección de miniquesos. En el inciso 1.3.4 se describió la metodología utilizada para su obtención y las razones por las que fue seleccionado para este fin.

3.2.2. Actividad coagulante de proteínas de leche

Para evaluar la capacidad coagulante del PER se realizaron ensayos preliminares en tubos de vidrio; las mezclas de reacción contenían 500 μ l de una suspensión de leche en polvo al 10 % p/v en una solución de CaCl_2 10 mM a pH 6,0 y 100 μ l de PER. La temperatura de incubación fue de 37°C, midiéndose el tiempo en min que tarda en aparecer un coágulo macroscópico por observación directa a través del tubo. Se realizaron numerosas determinaciones previas hasta aproximar el valor del tiempo de coagulación, controlando la formación del coágulo por inclinación de los tubos. Luego de esta aproximación se realizaron cinco determinaciones finales con mayor exactitud, cuyos valores fueron promediados. Este procedimiento evita el error producido por la excesiva manipulación de los tubos, lográndose una menor dispersión en el grupo de datos a promediar. Se definió una unidad coagulante (UC) como la inversa del promedio de los tiempos de coagulación en las condiciones de reacción. El blanco de reacción se preparó reemplazando la preparación enzimática por una solución de CaCl_2 10 mM.

3.2.3. Efecto de la concentración del PER y de la temperatura de reacción

El protocolo de reacción empleado fue el utilizado por Vairo-Cavalli *et al.* (2005). Se preparó una solución de leche descremada al 12% (San Regim) en una solución de CaCl_2 10 mM a pH 6,5. El ensayo de coagulación se llevó a cabo mezclando 100 μ l de una dilución de extracto enzimático con 1 ml de

leche reconstituida, registrando el tiempo necesario para observar la formación del coágulo firme. Cada determinación se realizó por quintuplicado, promediando los resultados. Las temperaturas empleadas fueron 25, 35 y 45 °C. Para cada temperatura se utilizaron diferentes diluciones del PER (1/2, 1/4, 1/8, 1/12, 1/16 y 1/20) y PER sin diluir. Con estos datos se obtuvieron gráficos del tiempo de coagulación en función de la concentración del PER para cada temperatura de reacción.

3.2.4. Fuerza coagulante

Se empleó el protocolo descrito en 3.2.3, pero se hicieron ensayos variando los volúmenes de leche y PER sucesivamente hasta obtener la relación necesaria para coagular la leche en 40 min a 35°C. A partir de este dato se calculó la fuerza coagulante, mediante el uso de la fórmula $F = 2400 \times V / (t \times v)$, donde V es el volumen de leche (ml), v es el volumen de agente coagulante (ml) y t es el tiempo de coagulación en segundos (Alais, 1984).

3.2.5. Hidrólisis de caseínas

En el apartado 3.1.3 se describió la composición de la fracción caseínica de la leche y cómo interviene en el proceso de coagulación. La acción de una enzima proteolítica sobre las distintas caseínas será diferente de acuerdo a su especificidad de corte. En este ensayo se realizaron reacciones de hidrólisis de caseína bovina, deteniendo la reacción a diferentes tiempos. De esta manera se produce una secuencia de cortes que llevan a la degradación de las caseínas y, como consecuencia, la aparición de péptidos de distinto tamaño y composición.

El sustrato empleado fue una suspensión de caseína al 1,25 % en buffer Tris HCl 0,1 M de pH 8, conteniendo cisteína 20 mM. En cada ensayo se utilizaron 45 µl de enzima y 450 µl de sustrato y la reacción se llevó a cabo a 45 °C durante 5, 10, 30, 60, 90 y 180 min y se detuvo por el agregado de 500 µl de TCA al 5 %. La mezcla resultante se centrifugó durante 15 min a 8.500 rpm y los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en 450 µl del buffer de muestra utilizado en la electroforesis desnaturizante (Tabla 1.2.4).

Los hidrolizados fueron analizados por SDS-PAGE en geles de tricina para resolver la mezcla de péptidos obtenidos. Los perfiles electroforéticos fueron analizados por densitografía.

3.2.6. Electroforesis en geles de tricina (SDS-Tricina-PAGE)

Esta técnica electroforética permite una mejor resolución de péptidos de bajo peso molecular, resultando muy adecuada para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ion de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a concentraciones menores de acrilamida que en el caso del buffer Tris-glicina, utilizado en la técnica ideada por Laemmli (1970). De esta manera se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 y 20 kDa, sin la necesidad del uso de urea (Schägger & von Jagow, 1987). El gel espaciador permite un cierto grado de desapilamiento de las proteínas mayores de 30 kDa, garantizándose de esta manera un pasaje más suave al gel de separación, quedando así reducidos los efectos de una carga excesiva. Esto es de especial importancia cuando se siembran grandes cantidades de proteínas en los geles preparativos. La preparación de las muestras a sembrar se describió en el apartado anterior.

3.2.6.1. Preparación de los geles

Para la resolución de muestras en el rango 5-100 kDa se utilizó un sistema que contiene 10% de T¹ y 3% de C² para los geles de resolución y 4% de T y 3% de C para los geles de apilamiento. Para optimizar la separación de péptidos en el rango de 5 a 20 kDa se emplearon geles de tricina de alta resolución compuestos por un gel de apilamiento, un gel espaciador y un gel de resolución (Tablas 3.2.1 y 3.2.2).

¹ %T= (g acrilamida+ g bisacrilamida) x 100 / volumen total.

² %C= g bisacrilamida x 100 / (g acrilamida+ g bisacrilamida).

Tabla 3.2.1. Buffer del gel.

Tris	36,3 g
SDS	0,3 g
HCl 1M, c.s.p.	PH 8,45
H ₂ O c.s.p.	100 ml

Tabla 3.2.2. Composición del gel.

Reactivos	Gel de apilamiento 4%T y 3%C	Gel espaciador 10%T y 3%C	Gel de resolución 16%T y 6%C
Acril:Bis (48:1,5)	0,4 ml	2 ml	–
Acril:Bis (46,5:3)	–	–	3,3 ml
Buffer del gel	1,25 ml	3,3 ml	3,3 ml
H ₂ O	3,4 ml	4,7 ml	3,4 ml
PSA 10%	40 ml	40 ml	40 ml
TEMED	5 ml	5 ml	5 ml

3.2.6.2. Aplicación de muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron bajo buffer con jeringa Hamilton (10 a 20 μ l) y se utilizó una celda Miniprotean III (Bio-Rad) en cuyos reservorios anódico y catódico se colocaron los correspondientes sistemas buffer (Tablas 3.2.3 y 3.2.4, respectivamente).

Todas las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V / 70 mA) durante el apilamiento, aumentando progresivamente el voltaje cada 10 s al ingresar las proteínas al gel de separación hasta llegar a 100 V (90 mA), valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

Tabla 3.2.3. Buffer anódico.

Tris	2,42 g
HCl 1M, c.s.p.	pH 8,9
H ₂ O c.s.p.	100 ml

Tabla 3.2.4 Buffer catódico.

Tris 0,1 M	1,21 g
Tricina 0,1 M	1,79 g
SDS	0,10 g
H ₂ O c.s.p.	100 ml

La fijación y coloración del gel se realizó de acuerdo al protocolo detallado en 1.2.14.5.

3.2.7. Obtención de miniquesos

Se elaboraron quesos tipo Cheddar a escala de laboratorio, según la técnica de Shakeel-Ur-Rehman *et al.* (1998) modificada, empleando como coagulante el PER.

3.2.7.1. Manufactura de los quesos

Se obtuvieron dos lotes de quesos (A y B), por triplicado. El coagulante empleado en la confección de los quesos fue quimosina para el lote A y PER para el lote B.

3.2.7.2. Control de calidad de la leche

3.2.7.2.1. Acidez

El valor normal de acidez para la leche está comprendido en el rango 0,181 y 0,21 g de ácido láctico por 100 ml (16–18 grados Dornic). A medida que la leche va envejeciendo la acidez aumenta como consecuencia de la conversión de lactosa en ácido láctico provocada por el crecimiento de la flora normal. Por otra parte la acidez también aumenta cuando las condiciones de higiene y temperatura no son apropiadas, por lo que la determinación de la acidez de la leche se realiza para evaluar su estado de conservación y determinar si es apta para su consumo e industrialización.

Utilizando una pipeta aforada se tomaron 10 ml de la muestra y se depositaron en un erlenmeyer. Se agregaron 20 ml de agua destilada y 3 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador de pH, titulando la suspensión con NaOH 0,99 N hasta lograr el punto final (color rosado).

3.2.7.2.2. Prueba del alcohol

En un tubo de ensayo se colocaron 5 ml de la muestra homogénea y 5 ml de etanol de 72°. Se tapó el tubo, se mezcló suavemente por inversión 2 o 3 veces y se observó la aparición o no de un coágulo. Mediante esta prueba también se evalúa la acidez de la leche, ya que el etanol de 72° produce la coagulación de la leche cuando la acidez es igual o superior a 20 grados Dornic. Una prueba de alcohol positiva indica también poca estabilidad de la

leche al calor, lo cual es muy importante si el producto ha de ser pasteurizado o esterilizado. Esta prueba es también útil para la detección de calostro o de leches con alteraciones en el balance salino.

3.2.7.2.3. Prueba de la reductasa

Esta técnica, también denominada “prueba de reducción del azul de metileno” se emplea para estimar el contenido de bacterias de la leche, estableciendo una relación entre la población bacteriana presente en la muestra y el tiempo necesario para que el colorante azul de metileno sea reducido en la leche a su forma incolora.

En un tubo de ensayo se colocó 1 ml de la solución de azul de metileno; se agregaron 10 ml de muestra, se taparon los tubos y se mezcló el contenido. Se colocaron todos los tubos a baño de María a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 5 min, mezclándolos de nuevo e invirtiéndolos tres veces con el fin de redistribuir la crema; se volvieron a incubar a igual temperatura y se observaron a intervalos de media hora. Si el contenido microbiano de la leche es alto, se decolorará rápidamente, retomando su color blanco, Se considera que si la reducción ocurre a un tiempo superior a las 5 h, la leche se encuentra en condiciones de utilizarse.

3.2.7.3. Acondicionamiento de la leche para la obtención de miniquesos

Se colocó leche pasteurizada comercial en 4 tubos de centrifuga plásticos de boca ancha (100 ml de leche por tubo), manteniéndose los tubos a 33°C en baño de agua durante 20 min (maduración). No se utilizó fermento como se realiza en la confección normal de un queso, debido a que el mismo produciría un descenso de pH en el sistema que provocaría disminución en la capacidad catalítica de las proteasas cisteínicas del PER.

3.2.7.4. Agregado de cloruro de calcio

Luego de la maduración, se agregó a los tubos una solución de CaCl_2 1 M en una proporción de 25 μl por cada 100 ml de leche, para reponer el calcio perdido durante el proceso de pasteurización.

3.2.7.5. Coagulación

Se incorporó el coagulante a la leche en una relación de volúmenes de 1:75 para el PER y 1:150 para la quimosina, suficiente como para que coagule en 20 min. Los tubos se agitaron durante unos segundos para conseguir una distribución pareja del cuajo y luego se dejaron en reposo hasta producirse la coagulación.

3.2.7.6. Corte de la cuajada

Una vez que la cuajada (apartado 3.1.8) adquirió la consistencia apropiada se procedió a realizar las acciones mecánicas de corte y agitación. Estos procedimientos se efectúan para destruir la cohesión y la compacidad del coágulo y su contracción, que produce el acercamiento de las micelas. Con el corte se multiplica la superficie de exudación, favoreciendo la evacuación del suero. El coágulo dentro de los tubos se cortó manualmente con una espátula plástica. Las partículas de coágulo recién formadas en el suero se dejaron reposar durante 5 min y luego se agitaron suavemente durante 10 min con varilla de vidrio.

3.2.7.7. Cocción

La temperatura del sistema se aumentó desde 33°C hasta 42°C en un intervalo de 35 min. Se siguió agitando la mezcla coágulo / suero hasta que al apretar un grano entre los dedos no desprendió más suero y se presentó elástico sin romperse fácilmente. Luego se dejó en reposo durante unos 15 min para que la cuajada se depositara en el fondo.

La acción del calor permite disminuir el grado de hidratación de la cuajada favoreciendo la sinéresis (eliminación del suero o “desuerado”). La elevación de la temperatura debe ser progresiva, sobre todo al comienzo. Cuando el calentamiento es brusco, se observa la formación de una "costra" impermeable en la superficie de los granos, en tanto que la parte central permanece húmeda, deteniéndose el desuerado.

3.2.7.8. Extracción de la cuajada y moldeado de los miniquesos

El sistema se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y luego se centrifugó a 1700 *g* durante 60 min, para obtener un nivel final de humedad del 38–40%. Luego se separó el suero y los coágulos se mantuvieron en los tubos, que se colocaron en un baño de agua a 36 °C. Luego de 15 min se invirtieron los tubos para separar los coágulos (miniquesos).

3.2.7.9. Prensado y salazón

El prensado se realiza para continuar con el desuerado, centrifugando nuevamente a 1700*g* durante 20 min, pero invirtiendo la posición de los coágulos para obtener una superficie suave en ambas caras. Luego de la centrifugación, se drenó el suero remanente y los miniquesos fueron sumergidos en una solución salina (NaCl 20%, CaCl₂·2H₂O 0,05%) durante 30 min a temperatura ambiente.

3.2.7.10. Maduración

Luego del salado, los miniquesos fueron secados con papel tissue y colocados a madurar a 4 °C en heladera durante 1 mes. Durante la primera semana se invirtieron todos los días y luego día por medio. Terminado el período de maduración los quesos fueron lavados con agua y se dejaron secar.

3.2.8. Análisis sensorial

La apreciación de los quesos se produce fundamentalmente a través de la percepción sensorial. La tecnología moderna aporta procedimientos novedosos de analítica instrumental, pero los investigadores son conscientes de la necesidad de potenciar aquellos métodos analíticos basados en la apreciación sensorial, ya que en definitiva son los más adecuados para la valoración final de la calidad del producto. El análisis de los componentes químicos y de las propiedades físicas aporta información sobre la naturaleza del estímulo que percibe el consumidor, pero no sobre la sensación que éste experimenta al ingerirlo (Coste, 2002). Los parámetros usualmente evaluados

en este caso fueron: superficie, color, aroma, sabor, amargor, elasticidad manual, cohesividad manual y cohesividad bucal.

3.3. Resultados y Discusión

Como se mencionó anteriormente, el cuajo es un conjunto de endopeptidasas que integran los fermentos gástricos de los bovinos lactantes y ha sido tradicionalmente usado para producir la coagulación de la leche. Este efecto se debe principalmente a la acción de la quimosina, una proteasa aspártica. La obtención del cuajo a través del sacrificio de terneros está siendo minimizada gracias a la producción biotecnológica de quimosina recombinante, lo cual ha disminuido además el costo del producto. Sin embargo existen sectores de la población que por diversas razones se encuentran interesados en una alternativa natural diferente, por lo cual se ha intensificado la búsqueda de coagulantes de la leche de origen vegetal. Tradicionalmente, extractos acuosos de *Cynara cardunculus* han sido empleados en la manufactura de quesos de leche de oveja y cabra en diversas áreas rurales de Portugal y España (Cordeiro, 1992; Silva & Malcata, 2000). Varias fitopeptidasas son capaces de coagular la leche, pero resultan inapropiadas para la producción de quesos, debido a que su elevada actividad proteolítica produce la degradación del coágulo. En este trabajo se realizaron ensayos preliminares empleando un extracto proteolíticamente activo de *Bromelia hieronymi* para determinar si es posible su utilización en la manufactura de quesos.

3.3.1. Actividad coagulante de la leche

Las pruebas preliminares realizadas empleando el PER como coagulante de la leche (*cfr.* 3.2.2) mostraron resultados positivos. El tiempo de coagulación promedio obtenido fue de 25 s, o sea 2,4 unidades coagulantes.

En la figura 3.3.1 se graficaron tres curvas de coagulación a 25, 35 y 45°C en función de la dilución del PER. Se observa que los tiempos de coagulación se elevan linealmente con el aumento en la dilución del extracto. La curva correspondiente a 25°C posee un incremento considerablemente mayor de los tiempos de coagulación con la creciente dilución del PER, con respecto a lo que sucede a 35 y 45°C, por lo tanto, en el caso que este extracto resulte

apropiado en la elaboración de queso, no sería conveniente utilizarlo a una temperatura inferior a los 35°C, ya que incrementaría el tiempo necesario para la coagulación y por lo tanto el costo del producto.

Figura 3.3.1. Curvas de coagulación en función de la dilución del PER

3.3.2. Fuerza coagulante

Mediante la determinación del tiempo de coagulación de mezclas de diferentes cantidades de PER y leche, se encontró que la relación de volúmenes que forma coágulo en 40 minutos a 35°C es de 0,02 ml de PER y 2 ml de leche. Este dato se empleó para calcular la fuerza coagulante, que resultó ser 100 U (U: unidad arbitraria que expresa el volumen de leche coagulado por ml de agente coagulante, a 40°C), valor inferior al que muestra el cuajo líquido comercial (2000–5000 U) (Alais, 1984), pero comparable con el de otras preparaciones proteolíticas vegetales (Raheem *et al.*, 2007).

3.3.3. Hidrolizados de caseínas

Cuando se estudia un potencial sustituto del cuajo es particularmente importante evaluar los perfiles de degradación de las caseínas por los efectos que esto produce en el rendimiento, consistencia, sabor y aroma del producto final (Fox, 1989). Esto es muy importante para garantizar un buen balance en el corte de las proteínas de la cuajada (caseínas) para evitar la formación de atributos no deseados en el queso, tales como una baja viscosidad y la

generación de sabor amargo (Visser, 1993). El método electroforético de tricina SDS-PAGE (*cfr.* 3.2.6) permite visualizar en forma separada las distintas fracciones caseínicas y además logra una buena separación de los péptidos de bajo peso molecular. Empleando esta técnica la κ -caseína migra con la velocidad mayor, seguida de β , α_{s1} y α_{s2} caseínas (Pardo & Natalucci, 2002). La acción del PER sobre las distintas caseínas permitió obtener patrones de hidrólisis característicos de sus principales fracciones y perfiles de los diferentes productos peptídicos (Figura 3.3.2).

Figura 3.3.2. SDS-PAGE de los hidrolizados de caseína. Líneas 1 y 9, patrones de masa molecular; línea 2, blanco de caseína; líneas 3-8, hidrolizados detenidos a los 5, 10, 30, 60, 90 y 180 min.

El análisis de los correspondientes densitogramas permite visualizar que la cinética de degradación es diferente para las cuatro fracciones: κ desaparece a los 5 minutos, α_{s1} a los 10 minutos, α_{s2} a los 30 minutos y β a los 60 minutos (Figura 3.3.3).

Figura 3.3.3. Densitograma de las bandas de los hidrolizados de caseínas de la SDS-PAGE

La temprana y total degradación de la κ -caseína podría relacionarse con el tiempo de coagulación pequeño determinado para el PER, sugiriendo posiblemente una acción similar del PER con la quimosina, cuyo blanco de acción es el enlace peptídico Phe105—Met106 de la κ -caseína (Fox, 1989).

3.3.4. Control de calidad de la leche y capacidad de coagulación

La calidad de distintas leches comerciales se determinó según el protocolo descrito en 3.2.7.2 en cuanto a su capacidad para la formación de un buen coágulo, tomando como cuajo de referencia a la quimosina comercial (CHR Hansen), utilizándola en una relación con la leche de 1:100.

Tabla 3.3.3. Características de algunas leches comerciales

	Acidez (°Dornic)	Prueba del alcohol	Prueba de la reductasa	Tiempo de coagulación
Valor deseado	16 – 18	negativa	no menor a 5 horas	1–2 min
La Serenísima	19	Negativa	> 5 hs	> 2hs
La Cabaña	17	Negativa	> 5 hs	> 1hs
Sancor	17	Negativa	> 5 hs	2 min

Las leches comerciales fueron fluidas, enteras y pasteurizadas y se ensayaron en un tiempo no mayor a 5 días de su fecha de vencimiento. Los resultados de las pruebas se detallan en la Tabla 3.3.3. Todas presentaron valores normales para las pruebas del alcohol y de la reductasa. La acidez Dornic fue algo superior a lo deseado para la marca comercial La Serenísima. El factor determinante al momento de realizar la elección fue el valor del tiempo de coagulación, que fue de 2 min para la marca SanCor, pero muy elevado para el que las leches La Serenísima y la Cabaña, lo cual indicaría la presencia de sustancias inhibidoras de la coagulación durante su procesado, por lo que no resultarían útiles para la manufactura de los miniquesos.

3.3.5. Manufactura de los miniquesos

3.3.5.1. Características macroscópicas

Los miniquesos fueron elaborados según la técnica descrita en 3.2.7, en tres series de ensayos en donde se manufacturaron los lotes A y B, en distintos días. El diámetro promedio de los quesos fue de 3,5 cm, sin presentar diferencias significativas entre los 2 lotes respecto a ese parámetro. El tiempo de maduración fue de 4 semanas. Éste es un valor adecuado para ensayos con quesos de tamaño reducido, pero resultaría insuficiente en productos de tamaño normal, donde el proceso completo puede ser mayor a los 12 meses (<http://www.ams.usda.gov/spanish/cheesespan.htm>)

El peso promedio de los quesos del lote A fue de 15,78 g al comienzo de la manufactura, con una pérdida de agua de 6,16 g luego de 4 semanas de maduración, obteniéndose por tanto un rendimiento final del 61 %. El peso promedio de los quesos del lote B fue inicialmente de 14,93 g, eliminando

6,61 g de agua luego durante la maduración, obteniéndose por tanto un rendimiento final del 56 %.

En la figura 3.3.4 se observa una fotografía con los miniquesos elaborados.

Figura 3.3.4. Fotografías de los miniquesos manufacturados

3.2.5.2. Análisis sensorial

El análisis sensorial o evaluación sensorial es el análisis de los alimentos u otros materiales a través de los sentidos y resulta un auxiliar de suma importancia para el control y mejora de la calidad de los alimentos, ya que a diferencia del análisis físico-químico o microbiológico, que sólo dan una información parcial acerca de alguna de sus propiedades, el análisis sensorial permite obtener rápidamente información acerca de un aspecto de importancia capital: su grado de aceptación o rechazo por parte del consumidor (Anzaldúa-Morales, 1991).

Catar (evaluar, analizar) un queso consiste en examinarlo con el objeto de captar y valorar sus caracteres organolépticos, que son finalmente los que desempeñan un papel determinante en la decisión de compra del producto por el consumidor (<http://www.vet.unicen.edu.ar>).

La norma FIL 99 A:1997 para evaluación sensorial de productos lácteos establece que cada atributo se deberá evaluar separadamente y que la evaluación sensorial de los quesos deberá contemplar los siguientes aspectos: apariencia exterior e interior, consistencia/textura y sabor (<http://www.vet.unicen.edu.ar>).

Los miniquesos obtenidos a partir del PER fueron elaborados sin agregar ningún fermento adicional; sólo se trató de un producto a escala de laboratorio para poder observar si era posible o no la confección de quesos con el PER. Ambos aspectos impidieron su análisis por parte de un panel de degustación entrenado, el que finalmente estuvo a cargo de personal del laboratorio. Este análisis sensorial fue realizado luego de 4 semanas de maduración, y los resultados se encuentran detallados en la Tabla 3.3.4.

Tabla 3.3.4. Análisis sensorial de los miniquesos		
Parámetro	Queso tipo A	Queso tipo B
Superficie	Regular	Irregular
Color	Claro	Claro
Presencia de ojos	No	No
Aroma	Ácido-manteca	Ácido
Sabor	Salado	Salado-medio
Amargor	+/-	++
Elasticidad manual	Alta	Media
Cohesividad manual	Alta	Media-baja
Cohesividad bucal	Alta	Media-baja

Los quesos del lote A presentan mayor elasticidad y menor dureza que los del lote B, hecho que estaría relacionado con una elevada actividad proteolítica y una menor especificidad de corte del PER que la exhibida por la quimosina, lo que es frecuente cuando se utilizan proteasas vegetales como coagulantes de la leche (Park *et al.*, 2000).

3.4. Conclusiones

Una de las aplicaciones industriales de las enzimas proteolíticas es la manufactura de quesos. La demanda por fuentes alternativas al cuajo como coagulante de la leche para reemplazar la costosa y limitada fuente natural ha ido creciendo a lo largo de los años.

La variedad de zonas fitogeográficas existentes en nuestro país ha permitido el desarrollo de una importante flora autóctona, existiendo numerosos antecedentes sobre el aislamiento de proteasas de plantas pertenecientes a las familias Asclepiadaceae, Bromeliaceae, Asteraceae, Moraceae y Euphorbiaceae, algunas de las cuales con probada actividad coagulante de la leche (Vairo Cavalli *et al.*, 2005; Llorente *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2001; Bruno *et al.*, 2002).

En el primer capítulo se caracterizó un extracto parcialmente purificado elaborado a partir de frutos inmaduros de *Bromelia hieronymi*. Las siguientes características determinadas pueden resultar de conocimiento útil para emplear este extracto en la elaboración de quesos. Se observó que la preparación es termoestable, ya que su actividad caseinolítica prácticamente no se altera luego de ser incubada a 55 °C durante dos h (*cfr.* 1.3.7.6), lo cual mantendría las proteasas activas durante la etapa de coagulación de la leche en la manufactura de un queso. El rango de pH óptimo (7,3–10,7, *cfr.* 1.3.7.4) se encuentra alejado de los valores de pH en los que se produce la maduración de un queso (pH menor a 6). Este dato es importante ya que una proteólisis excesiva puede destruir el coágulo, en tanto que si esa reacción es limitada, influye en el desarrollo de las características organolépticas del producto final. Por otra parte, tampoco se eliminaría la proteólisis luego del salado, ya que la actividad caseinolítica residual en presencia de NaCl 2,5 M es de un 50% (*cfr.* 1.3.7.5).

Los ensayos de coagulación de la leche (*cfr.* 3.2.2) demandaron valores de tiempo pequeños (en promedio 25 s), lo que corresponde a 2,4 unidades coagulantes. Este hecho podría estar relacionado con la temprana degradación

de la κ -caseína (Figuras 3.3.2 y 3.3.3), ya que es la fracción de la caseína escindida específicamente por el cuajo bovino, siendo éste el hecho que desestabiliza las micelas provocando la coagulación. Los tiempos de coagulación se elevan linealmente con la disminución de la concentración enzimática (*cfr.* 3.2.3).

A partir del gráfico 3.3.1 se puede deducir que sería conveniente realizar la etapa de coagulación de la leche a una temperatura no menor de 35 °C, ya que temperaturas inferiores requerirían tiempos elevados de tratamiento, hecho poco recomendable en el caso de la producción industrial de quesos.

La fuerza coagulante es considerablemente inferior (10%) a la del cuajo bovino, hecho común entre los coagulantes vegetales. Por otra parte, si se considera que con un solo fruto (aproximadamente 5g) de esta especie autóctona se pueden preparar 50 ml de PER, que servirían para coagular 5.000 ml de leche a 35 °C en 40 min, se puede considerar que es una buena alternativa a la utilización del cuajo tradicional, tanto para aprovechar la utilización regional de un recurso natural como así también para obtener un producto de características sensoriales diferentes.

Por último, como trabajo preliminar y con la finalidad de evaluar si era posible o no utilizar el PER en la industria quesera, se elaboraron miniquesos utilizando la leche que mostró tener las mejores características (SanCor). Los quesos elaborados con PER tuvieron un aspecto más elástico y blando que los confeccionados con quimosina, hecho debido probablemente a la presencia de una mayor y más inespecífica proteólisis, como se ha podido demostrar en otros casos en donde proteasas vegetales han sido utilizadas para este propósito (Park *et al.*, 2000). A pesar de presentar un sabor levemente amargo en la prueba sensorial, este no es lo suficientemente elevado como para desechar estos quesos. Esto alienta la posibilidad de realizar estudios posteriores del extracto y elaborar quesos de tamaño normal, utilizando además fermentos adecuados que le permitan desarrollar al producto final características organolépticas más aceptables.

Referencias bibliográficas

- Adler-Nissen, J., (1986). "Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins". Elsevier Applied Science Publishers.
- Alais, C.. "Science du lait: principes des techniques laitières". 4th Ed. SEPAIC, Paris.
- Anzaldúa-Morales, (1991). En <http://www.vet.unicen.edu.ar/>. Sitio visitado en febrero de 2007.
- Cabezas, L., Esteban, M.A. & Marcos, A. (1981). "Agar gel diffusion of *Cynara humilis* (L.) proteinases and other enzymes". *Alimentaria*. **128**: 17-22.
- Calvo, M. "Bioquímica de los alimentos" <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/programasbio.html>. Sitio visitado 15/10/2006.
- Cattaneo, T.M.P., Nigro, F., Messina, G. & Giangiacomo, R., (1994). "Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase". *Milchwissenschaft*. **49**: 269-72.
- Cheftel J.C. y Cheftel H. (1976). "Introducción a la bioquímica y tecnología de alimentos". Vol I y II. Editorial Acribia. Págs. 43-63.
- Código Alimentario Argentino (Decreto N° 111, 12.1.76 art. 605).
- Conforti, P.A. & Lupano, C. E., (2004). "Functional properties of biscuits with whey protein concentrate and honey". *International Journal of Food Science and Technology*. **39** (7):745
- Cordeiro, M., Jakob, E., Puhán, Z. Pais, M.S. & Brodelius P.E. (1992). "Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus*: a comparison to chymosin". *Milchwissenschaft*. **47**: 683-7.
- Corradi, P., del Río, J.A., Eleicegui, G. y Zorraquín, T. (2005). "Industria Láctea, Alimentos argentinos II". Asociación argentina de consorcios regionales de experimentación agrícola AACREA. 97-110
- Coste, E.B. (2002) "Evaluación Sensorial De Quesos", Jornadas Regionales de Actualización en el Sector Lácteo y Porcino. Octubre de 2002, Tandil, Argentina.
- Creamer, L. K. (1991). "Electrophoresis of cheese". Ch. 4 in Monograph on Chemical Methods for Evaluating Proteolysis in Cheese Maturation. *Int. Dairy Fed. Bull.* **261**:14- 26.
- Dalgleish, D.G., (1992) "The enzymatic coagulation of milk". In: Advanced Dairy Chemistry I: Proteins (P.F. Fox, ed.), pp.: 579-619. Elsevier Applied Science. Elsevier Science Publishers Ltd. England
- Demir, Y., Alayli, A., Yildirim, S. & Demir, N. (2005). "Identification of protease from *Euphorbia amygdaloides* latex and its use in cheese production". *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. **35**(4): 291-99.
- Domingos, A., Clemente, A. & Pais M.S. (1992). "Studies on proteases with milk clotting from *Centaurea calcitrapa*". *Meddelingen van de faculteit landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*. **57**: 1909-10.
- Fennema, O. "Química de los Alimentos", (1992). Págs. 889-927.
- Fox, P.F. (1989). "Proteolysis during cheesemanufacture and ripening". *Journal of Dairy Science*. **72**:1379-1400.
- Fox, P.F. & Stepaniak, L. (1993) "Enzymes in Cheese Technology". *International Dairy Journal* **3**:509- 530
- Gallagher J., Kanekanian A.D. y Evans P. (1994). "Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps." *Int. J. food Sci. Technol.*, **29**:279-285.
- Grasselli, M., Navarro, A.A., Fernández, H.M., Miranda, M.V., Camperi, S.A. & Cascone, O.,(1997). "¿Qué hacer con el suero del queso?". *Ciencia Hoy*. 43(8)
- Gupta, C.B. & Eskin, N.A.M. (1977). "Potential use of vegetable rennet in the production of cheese". *Food technology*. **31**: 62-4.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Silva Figueiredo, A.C. & Pais, M.S. (1990). "Purification and partial characterization of milk clotting proteases

- from flowers of *Cynara cardunculus*" . *Phytochemistry*. **29**: 1405-10.
<http://www.ams.usda.gov/spanish/cheese-span.htm>. Home and Garden Bulletin No. 193; Agricultural Marketing Service. Sitio web visitado en marzo de 2007.
- Ibama, E. & Griffiths, M.W. (1987). "Estudios on a milk-coagulating enzyme, Calotropain, obtained from sodom apple (*Calotropis procera*)" .*J. of Food and Agriculture*. 1: 157-62.
- Ikonen, T. & Ojala, M. (1995). "Effects of milk protein genotypes on milk renneting properties assuming alternative models" . IDF Seminar "Implications of Genetic Polymorphism of Milk Proteins on Production and Processing of Milk" . 28. - 29.3.1995. Zürich, Switzerland. Summary 2p.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" , *Nature* **227**: 680-5.
- Lahl, W.J. & S.D. Brown (1994) "Enzymatic production of protein hydrolyzates for food use", *Food Technol.* **48**: 68-71
- Lemieux L. y Amiot J. (1989). "Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates" . *J. Chromatogr.*, **73**:189-206.
- Llorente B.E., Brutti, C.B. & Caffini N.O. (2004). "Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.)" . *J. of Agric. and Food Chem.* **52** (26): 8182-9.
- Macdermid, P.W. & Stannard, S.R. (2006). "A whey-supplemented, high-protein diet versus a high-carbohydrate diet: effects on endurance cycling performance" . *Int J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* **16**(1):65-77.
- Macedo, A., Malcata, F.X. & Oliveira, J.C. (1993). "The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *J. of Dairy Science.* **76**: 1725-39.
- Mc Mahon, D.J. & Mc Manus, W.R. (1998). "Rethinking casein micelle structure using electron microscopy" . *J. Dairy Sci.* **81**: 2985-2993.
- Maehashi, K., Matsuzaki, M., Yamamoto, Y. & Udaka, S. (1999). "Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties" . *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**(3): 555-9.
- Mahmoud, M.I. (1994) "Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products", *Food Technol.* **48**: 89-95
- Marshall K. (2004). "Therapeutic applications of whey protein" . Review. *Altern Med Rev.* **9**(2):136-56.
- Mao, I.L., Buttazzoni, L.G. & Aleandri, R. (1992). "Effects of polymorphic milk protein genes on milk yield and composition traits in Holstein cattle" . *Acta Agric. Scand.*, Sect. A, Animal Sci. **42**:1-7.
- Mercier, J-C. & Vilotte, J-L. (1993) "Structure and function of milk protein genes" . *J. Dairy Sci.* **76**:3079-98.
- Padmanabhan, S., Chitre, A. & Shastri, N.V. (1993). "Milk clotting protease isolated from *Dieffembachia maculata*" . *Die Nahrung.* **37**: 99-101.
- Pardo, M.F., López, L.M.I., Caffini, N.O. & Natalucci, C.L. (2001). "Properties of a Milk Clotting Protease Isolated from Fruits of *Bromelia balansae* Mez" . *Biol Chem.* **382**(5):871-4.
- Pardo, M. & Natalucci, C.L. (2002). "Electrophoretic análisis (Tricina-SDS-PAGE) of bovine caseins" . *Acta Farmacéutica Bonaerense.* **21**:57-60.
- Park, Y.W., Van Hekken, D.L., Tunick, M.H. & Holsinger, V.H. (2000) "Rheological characteristics of young Monterey Jack goat milk cheese" , Proc. VII Int. Conf. on Goats. Tours, France, Vol II: 601.
- Pedersen, B. (1994). Removing Bitterness from Protein Hydrolysates. *Food Technol.* **48**: 96-98.
- Pires, E., Faro, C., Macedo, I., Esteves, C. Morgado, J., Verissimo, P., Pereira, D. & Gomes, D. (1994). "Flor do cardo versus

- quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Química Alimentar*. **54**: 66-68.
- Raheem, D., Suri, N. & Saris P.E., (2007). "The characterization and application of *Calotropis procera*, a coagulant in Nigerian Wara cheese". *International Journal of Food Science & Technology*. **42**(2): 220-3.
- Reis, P.M., Lourenço, P.L., Domingos, A., Clemente, A.F., Pais, M.S. & Malcata, F.X. (2000). "Applicability of extracts from *Centaurea* in ripening of bovine cheese". *Internatinal Dairy J.* **10** (2000): 775-80.
- Sá, F.V. & Barbosa, M. (1972). "Cheese making with a vegetable rennet from cardoon (*Cynara cardunculus*)". *J. of Dairy Reserch*. **39**: 335-43.
- SAGPyA (2003): "Apuntes Agroecónómicos - FAUBA. SAGPyA. 2003.
<http://www.agro.uba.ar/apuntes/index.htm>. Sitio vicitado octubre de 2006.
- Shägger & Von Jagow. "trcine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". *Anal. Biochem*. **166**: 368-79. 1987
- Shäkeel-Ur-Rehman, P., P.L.H. McSweeney & P.F. Fox (1998) "Protocol for the manufacture of miniature cheeses", *Lait* **78**: 607-20
- Silva, S.V. & Malcata, F.X., (2000). "Comparative catalytic activity of two plant proteinases upon caprine caseins in solution." *Food Chemistry*. **71**:207-14.
- Singh, J. Chandler, H., Bhalerao, V.R. & Dastur, N.N. (1973). "Studies on vegetable rennet from *Withania coagulans*". *J. of Food Science and Technology*. **10**: 16-19.
- Sousa, M.J. & Malcata, F.X., (1997). "Ripening of ovine milk cheeses: effects of plant rennet, pasteurization, and addition of starter on lipolysis". *Food Chemistry*. **59**(3):427-432
- Tavaria, F.K., Sousa, M.J., Domingos A., Malcata, F.X., Brodelius, P., Clemente, A. & Pais, M.S., (1997). "Degradations of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*". *J. of Agriculture and Food Chem*. **45**: 37-60.
- Taverna, M. (2002). "La calidad: ¿por qué y para qué?". En: Manual de referencia para el logro de leche de calidad. INTA Rafaela, 1° Edición, 7-13.
- Vairo Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N. & Natalucci, C. (2005). "Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate". *J. of Dairy Research*, **72**(3): 271-5.
- Visser, S. (1993). "Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview". *Journal of Dairy Science*. **76**:329-350.
- Walsh, G. (2004). *Proteins Biochemistry and Biotecnology*. Ed: John Wiley & Sons, LTD.pp.:420-435.