

Endopeptidasas de *Bromelia balansae* Mez y su Aplicación en la Modificación de Proteínas Alimentarias

Marcelo Fabián Pardo



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE),
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata.



Handwritten signature and number: 101063

Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas

Directora: Claudia L. Natalucci

Año 2004

DONACION.....
A.....
Fecha 07.04.05
Inv. #..... Inv..... 57389

*A la memoria de mis padres,
Raúl y Celinda*

Agradecimientos

A los doctores Claudia Natalucci y Néstor Caffini, por haberme dado la oportunidad de ingresar al sistema científico y dirigirme durante estos años, otorgándome su apoyo constante en lo científico, pero principalmente en lo personal.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA) y a la Universidad de La Plata por haberme otorgado las becas que me permitieron la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas por la formación científica brindada durante mis años de estudio.

Al doctor Aníbal Amat por su ayuda en la obtención de las muestras vegetales y su colaboración ofrecida durante este periodo.

A la Srta. María Fernández Tayeldin, a la Bioquímica Mariela Bruno y a los Sres. Matías Fingerman y Julio Mercerat por su colaboración durante distintos periodos de este trabajo.

A mis amigos que me apoyaron durante estos años.

A todos mis compañeros del LIPROVE por su camaradería y colaboración.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. EL USO DE ENZIMAS EN LA ANTIGÜEDAD	1
1.2. LAS ENZIMAS Y SU RELACION CON EL DESARROLLO DE LA BIOQUIMICA	1
1.3. ENZIMAS PROTEOLITICAS	3
1.3.1. Peptidasas: Nomenclatura y Clasificación	3
1.3.1.1. <i>El sistema EC de clasificación de peptidasas</i>	5
1.3.1.2. <i>El sistema MEROPS de clasificación de peptidasas</i>	10
1.3.2. Otras Bases de Datos y Sitios Relacionados	13
1.3.2.1. <i>Swiss-Prot y TrEMBL</i>	13
1.3.2.2. <i>PROSITE</i>	14
1.3.2.3. <i>ENZYME</i>	14
1.3.2.4. <i>ExPASy Molecular Biology Server</i>	15
1.3.2.5. <i>NCBI-BLAST</i>	16
1.4. MECANISMO CATALITICO DE LAS PEPTIDASAS CISTEINICAS	18
1.5. LA FAMILIA DE LAS BROMELIACEAS	20
1.5.1. Descripción Botánica de la Familia	21
1.5.2. Subfamilias	22
1.5.3. Descripción del Género y de la Especie	24
1.5.4. Especies de <i>Bromelia</i> que Crecen en Argentina	25
1.6. PROTEASAS PRESENTES EN ABUNDANCIA, SIN FUNCIÓN APARENTE	25
1.7. ENDOPEPTIDASAS DE <i>BROMELIACEAE</i>	30
1.7.1. Endopeptidasas de las Especies Argentinas de <i>Bromelia</i>	30
1.7.1.1. <i>Balansaina</i>	30
1.7.1.2. <i>Hieronymaina</i>	30
1.7.1.3. <i>Lacinosaina</i>	31
1.7.1.4. <i>Serraina</i>	31
1.7.2. Otras Proteasas de Frutos de <i>Bromeliaceae</i>	31
1.7.2.1. <i>Endopeptidasas de Ananas comosus L.</i>	31
1.7.2.1.1. <i>Bromelaina de tallo</i>	32
1.7.2.1.2. <i>Bromelaina de fruto</i>	33
1.7.2.1.3. <i>Ananaina</i>	33

1.7.2.1.4. <i>Comosaina</i>	34
1.7.2.2. <i>Otras endopeptidasas de Bromeliaceae pertenecientes al género Bromelia</i>	35
1.7.2.2.1. <i>Pingüinaina</i>	35
1.7.2.2.2. <i>Hemisfericina, karatasina, palmerina y silvestrisina</i>	36
1. 8. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	39
1. 8.1. Obtención de Hidrolizados Proteicos	41
1.8.2. Utilización de Hidrolizados de Proteínas de Soja	43
1.8.3. La Coagulación de la Leche y sus Productos de Hidrólisis en el Proceso de Elaboración de Quesos	44
1.8.4. Hidrólisis de las Proteínas del Suero para el Aprovechamiento de Desechos Industriales	46
1.8.5. Uso de Proteasas en la Obtención de Formulaciones Hipoalérgicas	47
2. OBJETIVOS	49
2.1. OBJETIVOS GENERALES	49
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL MATERIAL VEGETAL	50
3.1.1. Descripción de la Especie	50
3.1.2. Localización y Características de la Zona de Muestreo	50
3.1.3. Tratamiento y Clasificación de los Frutos	51
3.1.4. Determinación del Color Superficial	51
3.2. OBTENCIÓN DE LAS PREPARACIONES CRUDAS	53
3.2.1. Técnica General de Extracción	53
3.2.2. Optimización de las Condiciones de Extracción	53
3.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PARCIALMENTE PURIFICADOS	54
3.3.1. Optimización de la Precipitación de la Enzima Empleando Solventes Orgánicos	54

3.3.2. Obtención de Extractivos Parcialmente Purificados por Precipitación con Solventes Orgánicos	54
3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNAS E HIDRATOS DE CARBONO.	55
3.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	56
3.5.1. Sustratos Proteicos	56
3.5.1.1. Caseína	56
3.5.1.2. Azocaseína	57
3.5.2. Sustratos Sintéticos	58
3.5.2.1. <i>N-a-carbobenzoxi-p-nitrofenil Ésteres de Aminoácidos</i>	58
3.5.3. Ensayo de Actividad Carboxipeptidásica A y B y de Actividad Inhibitoria de Carboxipeptidasa A	58
3.5.4. Hidrólisis de N-CBZ-Ala-p-nitrofenilésteres	59
3.5.5. Conservación a Bajas Temperaturas	59
3.5.5.1. <i>Efecto de la congelación-descongelación</i>	60
3.5.5.2. <i>Efecto del tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas</i>	60
3.5.6. Efecto de la Liofilización Sobre la Actividad Proteolítica	60
3.5.7. Efecto de Modificadores de la Actividad	61
3.5.7.1. <i>Determinación de la concentración óptima de activador</i>	61
3.5.7.2. <i>Efecto de inhibidores específicos de grupo sobre la actividad enzimática</i>	61
3.5.7.3. <i>Efecto de la cisteína sobre la capacidad inhibitoria de PMSF y HgCl₂</i>	62
3.5.8. Efecto del pH Sobre la Actividad Proteolítica	62
3.5.9. Efecto de la Fuerza Iónica Sobre la Actividad Proteolítica	62
3.5.10. Estabilidad Térmica	62
3.6. ELECTROFORESIS	62
3.6.1. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida Desnaturalizantes con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE según Laemmli, 1970, con Modificaciones)	63
3.6.1.1. <i>Tratamiento de las muestras</i>	63
3.6.1.2. <i>Preparación de los geles</i>	64

3.6.1.3. <i>Aplicación de las muestras</i>	65
3.6.1.4. <i>Condiciones de corrida</i>	65
3.6.1.5. <i>Fijación, coloración y decoloración</i>	65
3.6.2. Electroforesis Desnaturalizante en Gradiente de Poliacrilamida	66
3.6.2.1. <i>Preparación de las muestras</i>	66
3.6.2.2. <i>Preparación de los geles</i>	66
3.6.2.3. <i>Aplicación de las muestras</i>	67
3.6.2.4. <i>Condiciones de corrida</i>	67
3.6.2.5. <i>Fijación, coloración y revelado</i>	67
3.6.3. Electroforesis en Geles con Tricina Desnaturalizantes y Reductores (SDS-Tricina-PAGE)	67
3.6.3.1. <i>Preparación de las muestras</i>	68
3.6.3.2. <i>Preparación de los geles</i>	68
3.6.3.3. <i>Aplicación de las muestras</i>	68
3.6.3.4. <i>Condiciones de corrida</i>	69
3.6.3.5. <i>Fijación, coloración y decoloración</i>	69
3.6.4. Electroforesis en Geles con Tricina de Alta Resolución (SDS- Tricina-PAGE, AR)	70
3.6.4.1. <i>Preparación de las muestras</i>	70
3.6.4.2. <i>Preparación de los geles</i>	70
3.6.4.3. <i>Aplicación de las muestras</i>	71
3.6.4.4. <i>Condiciones de corrida</i>	71
3.6.4.5. <i>Fijación, coloración y decoloración</i>	71
3.6.5. Electroforesis en Condiciones Desnaturalizantes con Urea (Urea-PAGE)	72
3.6.5.1. <i>Preparación de las muestras</i>	72
3.6.5.2. <i>Preparación de los geles</i>	72
3.6.5.3. <i>Aplicación de las muestras</i>	73
3.6.5.4. <i>Condiciones de corrida</i>	73
3.6.5.5. <i>Fijación, coloración y decoloración</i>	73
3.6.6. Electroforesis en Gradiente de pH: Isoelectroenfoco	74
3.6.6.1. <i>Tratamiento de las muestras</i>	74
3.6.6.2. <i>Preparación de los geles</i>	74
3.6.6.3. <i>Aplicación de las muestras</i>	75
3.6.6.4. <i>Condiciones de corrida</i>	75
3.6.6.5. <i>Fijación, coloración y decoloración</i>	76
3.6.6.6. <i>Estimación de los puntos isoeléctricos</i>	76

3.6.7. Otros Sistemas de Detección de Proteínas y Enzimas no Citadas Precedentemente	77
3.6.7.1. <i>Tinción de proteínas con plata en geles de poliacrilamida</i>	77
3.6.7.1.1. <i>Preparación de los geles: fijación</i>	77
3.6.7.1.2. <i>Lavado y pretratamiento de los geles</i>	78
3.6.7.1.3. <i>Tratamiento con plata</i>	78
3.6.7.1.4. <i>Revelado</i>	79
3.6.7.2. <i>Tinción de glicoproteínas en geles de poliacrilamida</i>	79
3.6.7.2.1. <i>Fijación</i>	79
3.6.7.2.2. <i>Lavado y pretratamiento de los geles</i>	79
3.6.7.2.3. <i>Tratamiento con solución de Schiff</i>	80
3.6.7.2.4. <i>Decoloración y revelado de los geles</i>	80
3.6.7.3. <i>Tinción de glicoproteínas en geles de PAA con ácido periódico y tratamiento con plata</i>	80
3.6.7.3.1. <i>Preparación de los geles: fijación</i>	80
3.6.7.3.2. <i>Lavado y pretratamiento de los geles</i>	81
3.6.7.3.3. <i>Tratamiento con solución de plata</i>	81
3.6.7.3.4. <i>Lavado y revelado de los geles</i>	81
3.6.7.4. <i>Detección de la actividad proteolítica (zimograma)</i>	82
3.6.7.4.1. <i>Preparación de las placas agarosa-caseína</i>	82
3.6.7.4.2. <i>Incubación</i>	82
3.6.7.4.3. <i>Fijación y coloración</i>	82
3.6.8. Tratamiento Analítico de Datos por Densitografía	83
3.6.8.1. <i>Secado y almacenamiento de geles</i>	83
3.6.8.2. <i>Captura y procesamiento preliminar de los datos</i>	83
3.6.8.3. <i>Análisis de los datos por densitografía</i>	84
3.7. HIDRÓLISIS CONTROLADA DE SUSTRATOS PROTEICOS	85
3.7.1. Determinación del Grado de Hidrólisis de Proteínas de Soja	85
3.7.1.1. <i>Preparación de los concentrados de soja</i>	85
3.7.1.2. <i>Seguimiento de la hidrólisis</i>	86
3.7.1.3. <i>Pretratamiento de las muestras de hidrolizados parciales para electroforesis</i>	86
3.7.1.4. <i>Tratamiento de las muestras de hidrolizados parciales para electroforesis</i>	87

3.7.1.5. <i>Desarrollo de la electroforesis y análisis de los datos</i>	87
3.7.2. Determinación del Grado de Hidrólisis de Caseínas Bovinas	87
3.7.2.1. <i>Seguimiento de la hidrólisis</i>	87
3.7.2.2. <i>Pretratamiento de las muestras de hidrolizados parciales para electroforesis</i>	88
3.7.2.3. <i>Desarrollo de la electroforesis y análisis de los datos</i>	88
3.7.3. Hidrólisis Parcial de Proteínas de Leche realizadas en Tubo	88
3.7.3.1. <i>Preparación de los sustratos</i>	88
3.7.3.1.1. <i>Leche reconstituida</i>	89
3.7.3.1.2. <i>Caseínas totales</i>	89
3.7.3.1.3. <i>Fracción β-caseínica</i>	89
3.7.3.1.4. <i>Obtención de la fracción sérica</i>	89
3.7.3.1.5. <i>Fracción rica en betalactoglobulina</i>	90
3.7.3.2. <i>Desarrollo de las hidrólisis</i>	90
3.7.3.3. <i>Pretratamiento de las muestras</i>	90
3.7.3.4. <i>Desarrollo de la electroforesis y análisis de los datos</i>	91
3.8. ACTIVIDAD COAGULANTE SOBRE PROTEINAS DE LECHE	91
3.8.1. <i>Preparación del Sustrato</i>	91
3.8.2. <i>Desarrollo de la Coagulación</i>	91
3.8.3. <i>Análisis Electroforético de los Coágulos</i>	91
3.8.4. <i>Variación de la Actividad Coagulante con la Relación Enzima-Sustrato</i>	92
3.8.5. <i>Variación de la Actividad Coagulante con la Concentración de Calcio</i>	92
3.8.6. <i>Variación de la Actividad Coagulante con la Temperatura</i>	92
3.9. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	92
3.10. ESPECTROMETRIA DE MASAS	93
3.11. DETERMINACION DE LA SECUENCIA N-TERMINAL	93
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95

PARTE I: ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE DISTINTOS PARAMETROS DURANTE EL DESARROLLO DE LOS FRUTOS	95
4.1. PARAMETROS MACROSCOPICOS	95
4.1.1 Clasificación de los Frutos en Base a su Color Superficial	95
4.2. RELACION ENTRE EL GRADO DE MADUREZ Y EL CONTENIDO PROTEICO	97
4.3. ANALISIS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS	98
4.3.1. Contenido en Proteínas, Hidratos de Carbono y Actividad Caseinolítica	98
4.3.2. Ensayo de Actividad Carboxipeptidásica	99
PARTE II: OBTENCION Y CARACTERIZACION DE EXTRACTOS PARCIALMENTE PURIFICADOS	100
4.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PARCIALMENTE PURIFICADOS	100
4.5. CARACTERIZACION DE BALANSAINA DE FRUTOS MADUROS E INMADUROS	104
4.5.1. Electroforesis Desnaturalizante	104
4.5.2. Puntos Isoeléctricos de las Fracciones Activas	106
4.5.3. Efecto del Almacenamiento a Bajas Temperaturas	107
4.5.4. Efecto de la Liofilización	107
4.5.5. Efecto de Modificadores de la Actividad	108
4.5.5.1. <i>Efecto de la concentración de cisteína sobre la actividad enzimática</i>	108
4.5.5.2. <i>Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática</i>	109
4.5.6. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica	111
4.5.7. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la Actividad Proteolítica	111
4.5.8. Estabilidad Térmica	112
PARTE III: PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE BALANSAINA I	114
4.6. PURIFICACION CROMATOGRAFICA DE LA ENZIMA	114
4.6.1. Cromatografía de Intercambio Aniónico de Balansaina	114
4.6.2. Recromatografía de la Fracción IV	115

4.6.3. Tabla de Purificación	116
4.7. CARACTERIZACION DE BALANSAINA I	116
4.7.1. Análisis de la Pureza y Determinación de PM de Balansaina I por SDS-PAGE	116
4.7.2. Análisis de la Pureza y Determinación del pI de Balansaina I por IEF	119
4.7.3. Ensayo de la Actividad Esterolítica con sustratos Sintéticos	120
4.7.4. Efecto del pH Sobre la Actividad Proteolítica	120
4.7.5. Efecto de Activadores e Inhibidores	121
4.7.6. Detección de Glicoproteínas en Geles de Poliacrilamida	122
4.7.7. Espectrometría de Masas	122
4.7.8. Determinación de la Secuencia N-terminal	123
PARTE IV: APLICACIONES DE BALANSAINA	128
4.8. HIDROLISIS CONTROLADA DE PROTEINAS DE SOJA	128
4.8.1. Determinación del Grado de Hidrólisis de Proteínas de Soja	128
4.8.2. Análisis Electroforético de los Péptidos Obtenidos	129
4.9. HIDROLISIS CONTROLADA DE PROTEINAS LACTEAS	131
4.9.1. Determinación del Grado de Hidrólisis de Caseínas Bovinas y Análisis por SDS-PAGE de los Péptidos Obtenidos	131
4.9.2. Hidrólisis de Proteínas Lácteas: Selección del Método Electroforético más Adecuado para el Análisis de las Proteínas Lácteas y sus Hidrolizados	133
4.9.2.1. Análisis por SDS-PAGE	133
4.9.2.2. Análisis por Urea-PAGE y SDS-Tricina-PAGE	134
4.9.3. Comparación de los Productos de Hidrólisis Obtenidos con Diferentes Endopeptidasas	138
4.9.3.1. Comportamiento individual de cada enzima	139
4.9.3.2. Análisis de la degradación de cada una de las fracciones caseínicas	140
4.9.3.3. Análisis de los productos de hidrólisis de β -CN pura por extractos de balansaina	142

4.9.3.4. <i>Análisis de los productos de hidrólisis de β-Lactoglobulina</i>	143
4.10. ACTIVIDAD COAGULANTE DE BALANSAINA SOBRE LECHE BOVINA	144
5. CONCLUSIONES	148
5.1. OBTENCION DE BALANSAINA	148
5.2. PURIFICACION DE BALANSAINA	150
5.3. APLICACIONES DE BALANSAINA	151
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	154

1. INTRODUCCION

1.1. EL USO DE ENZIMAS EN LA ANTIGÜEDAD

El hombre ha recurrido al uso de enzimas en el procesamiento de materias primas de origen animal y vegetal desde tiempos inmemoriales. Procesos tradicionales, como la producción de bebidas alcohólicas y de pastas fermentadas con levadura pueden observarse en murales egipcios antiguos. Los primeros utensilios de panificación fueron encontrados hace 5000 años en Jericó (Canaan), una de las ciudades más antiguas del mundo. Otros procesos más recientes incluyen la preservación de alimentos por fermentación o la transformación de la leche en la elaboración de quesos (Reisner, 1981). En la zona correspondiente al actual Irak, en los valles del Tigris y del Eufrates, hay datos muy antiguos respecto al ordeño y posterior elaboración de quesos (Dianda, 2002).



Fig. 1. Cosecha y triturado de uvas para la fabricación de vino.

1.2. LAS ENZIMAS Y SU RELACION CON EL DESARROLLO DE LA BIOQUIMICA

Gran parte de la historia de la bioquímica es la historia de la investigación enzimática. Los primeros experimentos sobre catálisis *in vitro* se realizaron en 1783 cuando un monje y naturista italiano, Lazzaro Spallanzani, observó que la carne podía ser digerida por jugos gástricos extraídos de halcones. En 1814, Kirchoff descubrió que la cebada contenía una sustancia que era capaz de transformar la pasta de almidón en azúcar. Más tarde, en 1833, Payen y Persoz

descubrieron el principio activo de esta sacarificación, denominándolo diastasa (del griego: separación), un término aún utilizado en la industria cervecera (Uhlig, 1998).

Por entonces se creía que el proceso de fermentación era un conjunto de reacciones espontáneas, hasta que en 1857 el químico francés Louis Pasteur comprobó que la fermentación sólo ocurría en presencia de células vivas. Sin embargo, el químico alemán Eduard Buchner (Laidler & Cornish-Bowden, 1997; Lehninger *et al.*, 2000) descubrió en 1897 que un extracto de levaduras libre de células también podía producir la fermentación alcohólica. En aquel tiempo se le llamó *zymase* al extracto libre de células, pese a que el término de “fermentos” o “enzimas” ya había sido postulado por Wilhelm Kühne en 1867 (Montes Horcasitas & Magaña Plaza, 2002). Posteriormente, fueron aisladas sustancias de carácter enzimático a partir de numerosas especies vegetales. Un ejemplo de esto fue la observación de que el extracto de trigo era capaz de transformar el almidón en disacáridos y dextrinas.

Tras el descubrimiento de Buchner los científicos asumieron que, en general, las fermentaciones y las reacciones vitales eran producidas por enzimas. El primer libro que resumía el “maravilloso mecanismo” de las enzimas conocido hasta ese momento y que describía la historia de su descubrimiento fue escrito por Green en 1901, y es aún leído con interés hoy en día. Sin embargo, todos los intentos de aislar e identificar su naturaleza química habían fracasado hasta ese momento.

En 1926, el bioquímico estadounidense James B. Sumner consiguió aislar y cristalizar la ureasa, comprobando que dichos cristales se hallaban constituidos por proteínas. Sin embargo, no fue hasta cuatro años más tarde cuando sus colegas John Howard Northrop y Moses Kunitz aislaron y cristalizaron la pepsina y la tripsina del jugo duodenal, que la naturaleza proteica de las enzimas quedara establecida (Lehninger *et al.*, 2000).

Por su parte la deducción de la secuencia de aminoácidos de la ribonucleasa, una enzima descubierta en 1938 por el bacteriólogo estadounidense René Jules Dubos y aislada en 1946 por el químico estadounidense Moses Kunitz, se logró recién en 1960, época en la cual comenzaron a dilucidarse las primeras estructuras enzimáticas (Montes Horcasitas & Magaña Plaza, 2002). Actualmente la mayor parte del conocimiento de la estructura primaria de proteínas se obtiene por secuenciamiento de sus ácidos nucleicos.

1.3. ENZIMAS PROTEOLITICAS

Se encuentra más allá de todo cuestionamiento que los resultados de las búsquedas de enzimas proteolíticas o peptidasas han beneficiado a la humanidad de diferentes formas, y no hay duda de que contribuirá aún más en el futuro. La enzimología ha experimentado grandes avances al igual que sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, de detergentes, panadería y papelera, entre otras. Una de las más claras indicaciones al respecto radica en las enormes ventas anuales de la industria farmacéutica a causa de la investigación de las diferentes aplicaciones de las peptidasas en el campo de la salud humana (Barret, 1999).

En la actualidad, se pueden reconocer hasta 600 tipos distintos de peptidasas, 200 de las cuales se expresan en mamíferos. El número aumenta día a día. Esto ha llevado a la necesidad de contar con un sistema adecuado para su clasificación y nomenclatura (Barret, 1999).

1.3.1. Peptidasas: Nomenclatura y Clasificación

El término proteasa en referencia a las enzimas proteolíticas apareció durante el siglo XIX y fue utilizado en general para definir a todas las hidrolasas que degradaban proteínas. A mediados de 1930 surgió la necesidad de distinguir distintos tipos de actividad proteásica llamando "proteinasas" a aquellas enzimas que actuaban preferentemente sobre proteínas y "peptidasas" a aquellas que lo hacían sobre oligopéptidos. La capacidad de algunas enzimas de actuar con preferencia sobre sustratos peptídicos de bajo peso molecular se clarificó mucho después, cuando comenzaron a sintetizarse los primeros sustratos sintéticos con y sin grupos bloqueantes.

Fue entonces cuando comenzó a utilizarse el término "peptidasa", forma recomendada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, 1984) para toda enzima que degrada enlaces peptídicos, en un sentido menos restrictivo que el utilizado anteriormente y extendiéndolo para formar los nuevos términos "exo-peptidasa" y "endo-peptidasa" para referirse a enzimas que actúan en los extremos o en el interior de la cadena peptídica, respectivamente. Para aquellas enzimas que actúan con preferencia sobre sustratos peptídicos (como por ejemplo oligopéptidos o péptidos pequeños) los mejores términos son "exo-peptidasa" si la enzima requiere grupos terminales libres, u "oligo-peptidasa" si la especificidad de sustrato es

dependiente del tamaño de la molécula. Los términos “proteasa” y “enzima proteolítica” son sinónimos de peptidasa (Barret, 2001).

Para referirse a la especificidad de una peptidasa es conveniente utilizar un modelo conceptual ideado por Schechter y Berger (1967). En este modelo se consideran los residuos de aminoácido del sustrato (P) que se unen a subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser clivado hacia el N-terminal como 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 que “acomodan” los residuos del sustrato se numeran como S1, S3, S3' y S1', S2', S3', respectivamente (Figura 1.1).

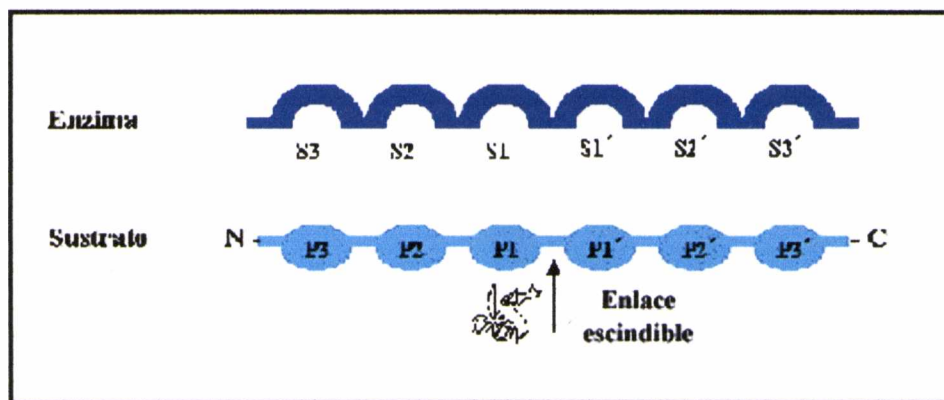


Fig. 1.1. Nomenclatura de Schechter y Berger para la especificidad de una peptidasa.

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, 2001).

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) y las que no forman complejos enzima-sustrato covalentes (peptidasas aspárticas y metalopeptidasas). De todas formas, el proceso de escisión de la unión peptídica es similar en todos los casos. Los grupos específicos que llevan a cabo las distintas etapas de la proteólisis son diferentes en las cuatro clases de proteasas mencionadas, pero el resultado neto es el mismo. Las peptidasas cisteínicas, serínicas y treonínicas son catalíticamente diferentes a las aspárticas y a las metalopeptidasas en que el nucleófilo del sitio catalítico de las primeras es parte de un aminoácido (cisteína, serina o treonina,

respectivamente), mientras que en los últimos dos grupos es una molécula de agua activada. Estos grupos contribuyen a los dos sistemas actuales de nomenclatura y clasificación de peptidasas, el sistema EC y el sistema MEROPS, que se describen a continuación.

1.3.1.1. El sistema EC de clasificación de peptidasas

A finales de la década del '50 se hizo evidente que la nomenclatura utilizada para nombrar a las enzimas, en un período donde su número aumentaba rápidamente, se hallaba fuera de control. La nomenclatura de las enzimas asignadas de forma individual por los distintos investigadores probó estar muy lejos de ser el mecanismo ideal, ya que en la mayoría de los casos la misma enzima recibía diferentes nombres, mientras que un mismo nombre era utilizado para designar diferentes enzimas.

En vista de esta difícil situación, durante el tercer Congreso Internacional de Bioquímica en Bruselas en agosto de 1955, la Asamblea General de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) decidió, junto con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) formar una Comisión Internacional de Enzimas, establecida finalmente en 1956.

El organismo internacional actual encargado de la clasificación y nomenclatura de todas las enzimas es el NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Su comité de Nomenclatura es el sucesor de la Comisión de Enzimas (CE) y en su sexta edición el listado de enzimas contiene más de 3.540 entradas. El índice numérico que se le asigna a las enzimas aún se designa como EC.

En el sistema EC todas las enzimas son divididas en 6 clases: (1) oxidorreductasas, (2) transferasas, (3) hidrolasas, (4) liasas, (5) isomerasas y (6) ligasas. Estas clases están relacionadas con la reacción que catalizan, excepto en el caso de las peptidasas –en el que ha sido necesario tener un tratamiento diferencial respecto al resto de las enzimas– pues la reacción catalizada no resulta ser una manera satisfactoria de clasificación, ya que para todas ellas la reacción catalizada es la misma: la hidrólisis de un enlace peptídico. Aunque la especificidad de la reacción difiere tanto para las exo- como para las endopeptidasas, es muy difícil de determinar y describir en términos sencillos cómo utilizarla como base de una clasificación. El valor de la clasificación de las peptidasas en base a su tipo catalítico fue rápidamente reconocido y por tanto introducido dentro de una lista EC en 1972. También se consideró que era útil

para los científicos que trabajasen en peptidasas considerar a diferentes proteínas como diferentes peptidasas, aún cuando expresasen idéntica o similar actividad peptidásica. La decisión de no clasificar a las peptidasas solamente sobre la base de la reacción que cataliza ha creado la necesidad de un sistema especial tanto para clasificarlas como para nombrarlas.

En esta lista, las hidrolasas de enlaces peptídicos, las peptidasas, forman la subclase 3.4., la cual contiene trece diferentes sub-subclases, como muestra la Tabla 1.1. Dentro de ellas hay dos grandes grupos: las exopeptidasas (3.4.11-19) y las endopeptidasas (3.4.21-24 juntas con 3.4.99). Las exopeptidasas actúan sólo en los extremos de las cadenas peptídicas. Aquéllas que actúan sobre los extremos amino liberan un residuo de aminoácido simple (aminopeptidasas, 3.4.11), o un dipéptido o tripéptido (dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas, 3.4.14). Aquéllas que actúan sobre extremos carboxilo liberan un residuo simple (carboxipeptidasas, 3.4.16-18) o un dipéptido (peptidil-dipeptidasas, 3.4.15). En base a sus grupos catalíticos las carboxipeptidasas a su vez se clasifican en carboxipeptidasas serínicas (3.4.16), metalocarboxipeptidasas (3.4.17) y carboxipeptidasas cisteínicas (3.4.18). Otras exopeptidasas son específicas para dipéptidos (dipeptidasas, 3.4.13), o remueven residuos terminales que son substituidos, ciclados o que están asociados a uniones isopeptídicas (omega peptidasas, 3.4.19).

Sub-subclase	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 3.4.35	Endopeptidasas treonínicas (1)
EC 3.4.99	Endopeptidasas de tipo desconocido (0)

Tabla 1.1. Sistema EC de clasificación de peptidasas. El número encerrado entre paréntesis indica el número de entradas registradas hasta la fecha de la consulta (URL: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>)

Las endopeptidasas clivan enlaces internos de las cadenas polipeptídicas. En la lista EC, las endopeptidasas se dividen en sub-subclases sobre la base de su mecanismo catalítico, y la especificidad es utilizada sólo para individualizar una determinada enzima dentro de los grupos.

Las enzimas de las sub-subclases 3.4.21 (endopeptidasas serínicas) poseen un residuo de serina involucrado en el proceso catalítico, las de la 3.4.22 (endopeptidasas cisteínicas) poseen un grupo cisteína en su centro activo, las de la 3.4.23 dependen de un residuo ácido aspártico (o comúnmente de dos) para su actividad catalítica (endopeptidasas aspárticas) y las de la 3.4.24 utilizan un ion metálico (con frecuencia, pero no siempre, Zn^{+2}) en su mecanismo catalítico (metaloendopeptidasas). Recientemente se ha creado la sub-subclase 3.4.25 para las endopeptidasas treonínicas. La clasificación inicial de una endopeptidasa dentro de un tipo catalítico determinado depende de los resultados de los test de inhibidores específicos de grupo.

El valor de la lista EC para las peptidasas se basa en que provee una terminología estándar para varios tipos de actividad peptidásica y especialmente en la asignación de un único número de identificación y de un nombre recomendado para cada peptidasa. La importancia del sistema se basa entonces en el área de la nomenclatura más que en la de la clasificación. La mayor falencia del sistema EC radica en que no tiene en cuenta la existencia de grupos estructurales que reflejan las relaciones evolutivas de sus integrantes (Barret, 2001).

La entrada EC para una determinada peptidasa contiene el “número EC”, el “nombre recomendado”, una descripción de la “reacción”, y una lista de “otros nombres” que han sido usados anteriormente. Existe también el apartado “comentarios”, el cual provee un breve resumen de lo que se conoce respecto a la enzima (incluyendo el número de la familia en el sistema MEROPS), enlaces (“links”) a otras bases de datos, y una sección “referencias”, con títulos y números de páginas.

En función del importante rol que la lista EC juega en la terminología de las peptidasas, es importante que toda nueva molécula sea integrada a la lista ni bien haya sido caracterizada con suficiente detalle. Para que una nueva peptidasa pueda incluirse en el listado, debe demostrar su individualidad respecto a las peptidasas ya existentes. Algunos parámetros tenidos en cuenta para ello incluyen el tipo de reacción, su especificidad, el tipo catalítico al que pertenece, si son o no codificadas por genes separados en el mismo organismo o si son expresadas en distintos tipos celulares.

La propuesta para la adición de una nueva peptidasa al listado debe incluir al menos una referencia a una publicación en la que debe describirse con detalle las técnicas de aislamiento y purificación a homogeneidad utilizadas, como ser el uso de la electroforesis en gel, del isoelectroenfoque (demostrando la presencia de una sola banda proteica), un único pico cromatográfico o un único pico al espectro de masas, relacionados inequívocamente con la presencia de actividad enzimática.

El mecanismo catalítico es revelado usualmente empleando inhibidores específicos de clase, cuyos resultados deben ser inequívocos, descartando todo dato de inhibición parcial que pueda confundir la toma de una decisión al respecto, ya que por lo general las desviaciones de los resultados esperados pueden deberse a falta de homogeneidad de la enzima.

Aunque el conocimiento de la secuencia de aminoácidos no es un requerimiento formal, es claro que reviste un gran valor para poder discriminar con mayor efectividad la supuesta nueva enzima del resto de las de la lista. Si se

conoce la secuencia polipeptídica de la peptidasa, podrá incluirla 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. Si la proteína aun no ha sido clonada o secuenciada por completo, pero ha sido purificada a homogeneidad y se poseen datos acerca de algunas de sus microsecuencias internas o de su fragmento N-terminal, puede ser suficiente como para asignarle un sitio tentativo dentro de alguna de las familias.

Uno de los elementos más importantes para una peptidasa (forme parte de la lista o no) es el nombre recomendado para la misma. El nombre debe ser lo suficientemente descriptivo como para que la proteína pueda ser fácilmente recordada y no deje espacio para confusiones. De todas formas, hay que ser cuidadosos en el momento de otorgar nombres demasiado descriptivos (como por ejemplo “cisteín-proteinasa de *Drosophila melanogaster*”) ya que la misma enzima podría encontrarse en otra especie. Por lo general se tiende a utilizar nombres cortos ya que facilitan la búsqueda y el indexado de la enzima en las bases de datos.

La mayor parte de los nombres de las exopeptidasas de la lista EC se basan en el tipo de actividad aminopeptidasa, dipeptidasa, etc. determinado por un descriptor de especificidad (por ejemplo, leucil aminopeptidasa) o un identificador serial (por ejemplo, carboxipeptidasa A). La mayor parte de las endopeptidasas poseen nombres compuestos por una sola palabra, como por ejemplo tripsina, pepsina, o acrosina. La existencia de similitudes biológicas permiten a veces establecer una serie de nombres con una raíz común, como en el caso de las catepsinas, aunque resulta poco común para una endopeptidasa el poder asignarle un nombre base lo suficientemente descriptivo. De todas formas, términos como “glutamil-endopeptidasa” pueden modificarse mas tarde por la adición de calificativos adecuados (por ejemplo, glutamil-endopeptidasa II) en caso de encontrar otras enzimas con especificidad parecida.

Muchos nombres de peptidasas cisteínicas terminan en el sufijo “-aína”, una convención que por lo general se estimula a seguir. De forma similar, la terminación “-epsina” es comúnmente utilizada para definir a las endopeptidasas aspárticas y la terminación “-lisina” funciona bien para metalo-endopeptidasas. En cambio, la terminación “-asa” sólo se recomienda para la construcción de nombres derivados del sustrato de la enzima (por ejemplo, colagenasa), pero sólo en los casos en que exista una gran especificidad o una función biológica primaria.

Es importante crear un nombre que sea de uso sencillo, tanto en escritura en un teclado de computadora como en su pronunciación. Un nombre compuesto

por una sola palabra es generalmente la mejor opción y, si su secuencia de letras es única, funcionará muy bien en una búsqueda por computadora. Por ello es importante asegurarse de que el nombre elegido no se encuentre actualmente en uso, de forma que es de vital importancia verificarlo mediante una rigurosa búsqueda a través de las bases de datos.

Cuando la descripción del aislamiento y la especificidad de la nueva peptidasa ha sido aceptada para su publicación en una publicación periódica con referato y la secuencia ha sido depositada, es tiempo para proponer una entrada EC, la cual puede realizarse en el sitio Web de ExPASy (URL: <http://www.expasy.ch/>).

1.3.1.2. El sistema MEROPS de clasificación de peptidasas

Como puede verse en la Tabla 1.1, el mayor número de peptidasas corresponde a las endopeptidasas (204 sobre un total de 281), las que están distribuidas en sólo 5 sub-subclases, lo que inevitablemente coloca dentro del mismo grupo a muy diferentes tipos de peptidasas.

En 1992, N. D. Rawlings y A.J. Barret comenzaron a desarrollar una nueva forma de clasificación de las peptidasas diseñado para 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 1.2. El nombre MEROPS no posee una mayor significación que la asociada al nombre del ave¹ cuyo comportamiento social hizo que se adoptara el nombre de “clan”, pero que ahora constituye una conveniente identificación para referirse al sistema de familias de peptidasas.

Los tres niveles de la clasificación MEROPS se muestran en la Tabla 1.2., donde también se explica el significado de los términos “clan”, “familia” y “peptidasa”. Las claves utilizadas 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

¹ *Merops apiaster*, Orden *Coraciiformes*, familia *Meropidae*; es el “come abejas” europeo, un pájaro de porte regular (25-30 cm) que se alimenta de insectos que atrapa al vuelo.

dos clanes que contienen peptidasas de más de un tipo (C, S y T). El identificador de un clan se completa con una segunda letra mayúscula, asignada secuencialmente (por ejemplo, CD), y el identificador para una familia es completado con un número (por ejemplo, C14). El identificador MEROPS para cada peptidasa individual comienza con el identificador de familia y se completa con un número decimal (por ejemplo, C14.001). Todos los identificadores son estables, siendo cambiados sólo bajo circunstancias especiales, y jamás son reutilizados.

Nivel	Descripción	Tipos catalíticos
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

Tabla 1.2. Los tres niveles de la clasificación MEROPS.

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>).

Hasta el momento de la propuesta de Rawlings y Barret no existía una forma efectiva para nombrar una familia de peptidasas sin caer en la imprecisión. Uno de los usos más útiles de MEROPS es que proporciona un identificador que puede utilizarse de una forma concisa y sin ambigüedades para referirse tanto a una familia como a un clan de peptidasas.

Como ya se ha dicho, las peptidasas cisteínicas son aquellas en las que el nucleófilo es un grupo sulfhidrilo de un residuo cisteína (Cys), existiendo cinco clanes bien diferenciados (CA, CB, CC, CD y CE) y uno (CX) que incluye a las peptidasas cuyo mecanismo es aún desconocido (Tabla 1.3). En la mencionada tabla se incluyeron también las familias de peptidasas cisteínicas que fueron reunidas en el clan PA, que se denomina así pues contiene familias de peptidasas cisteínicas y también serínicas que poseerían un ancestro común.

Clan	Familia	Enzima representativa
CA	C1	Papaína
	C2	Calpaína
	C6	HC-proteinasa del virus de la corrosión del tabaco
	C7	Endopeptidasa p29 del virus del tizón del castaño
	C8	Endopeptidasa p48 del virus del tizón del castaño
	C9	Endopeptidasa nsP2 del virus Sindbis
	C10	Streptopaina
	C12	Peptidasa deubiquitinante Yuh1
	C16	Endopeptidasa del virus de la hepatitis de ratón
	C19	Isopeptidasa T
	C21	Endopeptidasa del virus del mosaico amarillo del nabo
	C23	Endopeptidasa del carlavirus abrasador del arándano
	C27	Endopeptidasa del virus de la rubéola
	C28	L proteinasa del virus de la enfermedad pie-y-boca
	C29	Endopeptidasa 2 tipo papaína del coronavirus de la hepatitis de ratón
	C31	α -Endopeptidasa del arterivirus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
C32	α -Endopeptidasa del virus PCP de la arteritis equina	
C36	Endopeptidasa tipo papaína del furovirus de la necrosis amarilla de las nervaduras de remolacha	
CD	C11	Clostripaina
	C13	Legumaina
	C14	Caspasa 1
	C25	Gingipaina R
CE	C5	Endopeptidasa de adenovirus
CX	C15	Piroglutamil-peptidasa I
	C26	γ -Glutamil hidrolasa
	C33	Endopeptidasa Nsp2 del arterivirus equino
	C40	Dipeptidil-peptidasa VI
	C41	Cistein proteinasa de la hepatitis E
PA	C3	Picornaina 3C del virus de la poliomielitis
	C4	Endopeptidasa NIa del virus de la corrosión del tabaco
	C24	Endopeptidasa del calicivirus felino
	C30	Endopeptidasa tipo picornaina 3C del coronavirus de la hepatitis de ratón
	C37	Peptidasa procesadora del virus Southampton

Tabla 1.3. Clanes y familias de peptidasas cisteínicas (tomado de Barrett, 2001). El clan PA incluye a las peptidasas cisteínicas del ex clan CB junto a las peptidasas serínicas del ex clan SA

La primer peptidasa cisteínica reconocida como tal fue la papaína, con la cual se creó el clan CA. Actualmente se han determinado las estructuras cristalinas de papaína y otras peptidasas relacionadas de la familia C1, en las cuales los residuos catalíticos se identificaron como Cys, His y Asn, en ese orden de secuencia. Un cuarto residuo (Gln) que precede a la Cys catalítica es también esencial para la actividad y forma parte del “hueco oxianiónico”. En la tabla 1.3 se indican los clanes de peptidasas cisteínicas que han sido incluidas en los mismos, junto a la enzima representativa.

Más de la mitad de las familias de peptidasas cisteínicas pertenecen al clan CA. Casi todas las peptidasas cisteínicas de origen vegetal pertenecen a la familia C1, cuya enzima representativa es la papaína.

1.3.2. Otras Bases de Datos y Sitios Relacionados

1.3.2.1. *Swiss-Prot* y *TrEMBL*

Swiss-Prot (URL: <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>) es una base de datos en línea para la búsqueda de secuencias polipeptídicas, la cual provee acceso a gran cantidad de información, suministra un mínimo nivel de redundancia en las búsquedas y un alto nivel de integración con otras bases de datos. La última versión de agosto de 2003 (41.21), proporciona más de 133.312 entradas de secuencias, involucrando una cantidad total de 49.198.011 aminoácidos incluidos en 108.272 referencias.

Swiss-Prot fue creada por Amos Bairoch en 1986, en el Departamento de Bioquímica Médica de la Universidad de Ginebra y desde 1987 ha formado parte de los esfuerzos colaborativos del EMBL (European Molecular Biology Laboratory). Actualmente, es mantenida por el EMBL y el SIB (Swiss Institute of Bioinformatics), a cuyo equipo pertenece Bairoch, que es quien asume la principal responsabilidad respecto al contenido científico y el formato de esta base de datos. Las actividades del EMBL son desarrolladas por el EBI (European Bioinformatics Institute).

La mayor parte de las secuencias proteicas contenidas en esta base de datos proviene de bases de datos públicas de secuencias de nucleótidos. La base de datos posee valor académico y se ha convertido en un estándar dentro de la comunidad científica mundial.

Swiss-Prot se encuentra acompañado por TrEMBL, una base de datos asociada, la cual contiene las traducciones de todas las secuencias codificantes presentes en la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank Nucleotide Sequence Database, la cual constituye la principal fuente de secuencias de nucleótidos en Europa. También contiene varias secuencias de proteínas extraídas de literatura o enviadas recientemente que aún no han sido incluidas en Swiss-Prot.

1.3.2.2. PROSITE

PROSITE (URL: <http://us.expasy.org/prosite/>) es una base de datos para la identificación de familias de proteínas y sus dominios. Está compuesta por sitios de significancia biológica, patrones y perfiles que ayudan a la identificar a qué familia (si es que existe) pertenece una nueva secuencia proteica. La versión actual de agosto de 2003 (18.5) contiene un total de 1210 entradas de documentación. Cada una de estas entradas está acompañada de documentación acerca de la estructura y función de la proteína en cuestión.

PROSITE se basa en el hecho de que, mientras existe un gran número de proteínas diferentes, la mayor parte de ellas puede ser agrupada en un limitado número de familias sobre la base de la similaridad entre sus secuencias. Las proteínas o sus dominios proteicos pertenecientes a una familia en particular comparten en general atributos funcionales que derivan de un antecesor común.

Cuando se estudian las secuencias proteicas de una familia se ha demostrado que existen algunas regiones que permanecen mejor conservadas que el resto durante el transcurso de la evolución. Estas regiones son por lo general importantes para el funcionamiento de la proteína o para el mantenimiento de su estructura tridimensional. Mediante el análisis de las propiedades variables y constantes de estos grupos de secuencias similares, es posible asignar una marca (“signature”) a un dominio o familia proteica, la cual distingue a los miembros de esa familia del resto de proteínas no relacionadas. Es suficiente una de estas “huellas dactilares” para identificar a una proteína en particular. De forma similar, esta marca puede utilizarse para asignar una nueva proteína dentro de una familia dada y poder formular entonces hipótesis concretas acerca de su función.

1.3.2.3. ENZYME

ENZYME (URL: <http://us.expasy.org/enzyme/>) constituye un sitio de información referente a la nomenclatura de las enzimas. Está basado

principalmente en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la IUBMB y en él se describen cada uno de los distintos tipos de enzimas caracterizadas por la Enzyme Commission, las cuales poseen:

- Un número EC característico
- Un nombre Recomendado
- Nombres alternativos (si los hubiere)
- Información sobre su actividad catalítica y cofactores (si los tuviere)
- Enlaces hacia bases de datos de secuencias proteicas, como Swiss-Prot (si los tuviere).
- Enlaces hacia documentos relacionados con enfermedades humanas generadas por deficiencias en la enzimas (si los hubiere).

1.3.2.4. ExPASy Molecular Biology Server

ExPASy (Expert Protein Analysis System) (URL: <http://www.expasy.org/>) es un servidor perteneciente al SIB, dedicado al análisis de secuencias y de estructuras de proteínas así como también del análisis de patrones de 2-D PAGE.

Las bases de datos a las que se pueden acceder desde este sitio son numerosas: desde las más conocidas, como Swiss-Prot (Fig. 1.2) y TrEMBL, PROSITE y ENZYME, hasta las más específicas, como SWISS-2DPAGE (análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones) , SWISS-MODEL-3DIMAGE (imágenes en 3 dimensiones de proteínas y otras macromoléculas biológicas), SWISS- MODEL Repository (generador automático de modelos proteicos) y SeqAnalRef (referencias bibliográficas sobre análisis de secuencias), entre otras.

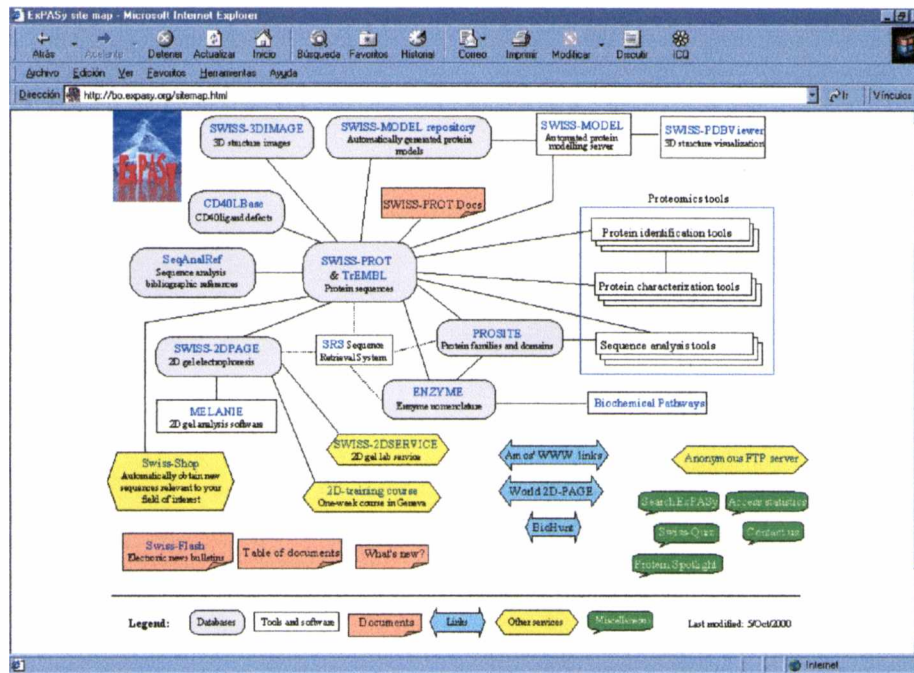


Figura 1.2. Esquema de la organización del sitio Swiss-Prot.

1.3.2.5. NCBI-BLAST

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) es un grupo de investigación multidisciplinario compuesto por analistas de computación, biólogos moleculares, matemáticos, bioquímicos y físicos dedicados a la búsqueda de temas relacionados con la biología molecular aplicada y al estudio de problemas biomédicos a nivel molecular (organización genómica, análisis de patrones de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos, desarrollo de nuevos algoritmos para la búsqueda de similitudes entre secuencias y predicciones moleculares de estructura) utilizando métodos matemáticos por computadora. Este grupo es responsable de la base de datos de ADN GenBank, así como de la distribución y mantenimiento de una variedad de bases de datos utilizadas por la comunidad médica y científica, como ser OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), MMDB (Molecular Modeling Database), UniGene (Unique Human Gene Sequence Collection) y, CGAP (Cancer Genome Anatomy Project), entre otras.

Las búsquedas en NCBI proveen a sus usuarios el acceso integral a datos de secuencia, mapeo, taxonomía y estructura. La literatura científica es accesible a través de PubMed y MEDLINE, una interfase de búsqueda a través de la Web que

proporciona acceso a aproximadamente 11 millones de citas de trabajos científicos en MEDLINE.

BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) es un conjunto de programas para la búsqueda de similitud de secuencias desarrollado por NCBI para explorar todas las bases de datos de secuencias disponibles, independientemente de que la secuencia provenga de una proteína o de una porción de ADN. Estos programas tienen la particularidad de ser bastante rápidos en la búsqueda (pueden ejecutar una búsqueda dentro de una base de datos DNA en menos de 15 segundos), sin pérdida de sensibilidad en la forma en que establecen las relaciones entre las secuencias. Los resultados hallados por la búsqueda poseen una interpretación estadística, haciendo que los mismos puedan distinguirse fácilmente de resultados al azar. Otra particularidad es que estos programas utilizan un conjunto de algoritmos eurísticos que buscan tanto alineamientos locales como globales y por tanto son capaces de detectar relaciones a través de secuencias que solo comparten una región de similitud (Altschul *et al.* 1990). Todas las bases de datos del NCBI y sus herramientas de software están disponibles a través de internet.

1.4. MECANISMO CATALITICO DE LAS PEPTIDASAS CISTEINICAS

El mecanismo catalítico de las peptidasas cisteínicas es similar al de las peptidasas serínicas ya que también en este caso se forma un intermediario covalente (Fig 1.3).

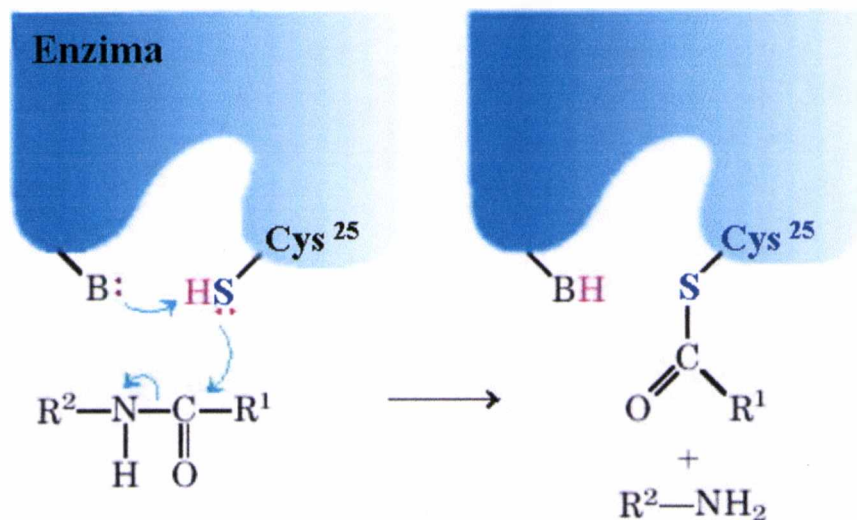


Fig 1.3. Catálisis ácido-base y catálisis covalente en papaina

Se toma como proteasa tipo la papaina. El primer paso de la catálisis involucra al átomo de azufre del residuo Cys²⁵ de la enzima y el residuo de His¹⁵⁹ hace las veces de base aceptora de hidrógeno. Se produce entonces la acilación de la proteasa y la liberación del péptido correspondiente al extremo amino del sustrato. La necesidad de la presencia de la Cys²⁵ en su forma libre se encuentra demostrada pues su modificación química destruye por completo la actividad enzimática.

Un esquema del mecanismo completo de la reacción se muestra en la Fig 1.4, en la cual se incluyen los dos grupos imino de los residuos Gln¹⁹ y Cys²⁵ de la enzima, los que actúan como “hueco oxianiónico” de forma similar a

Introducción 19

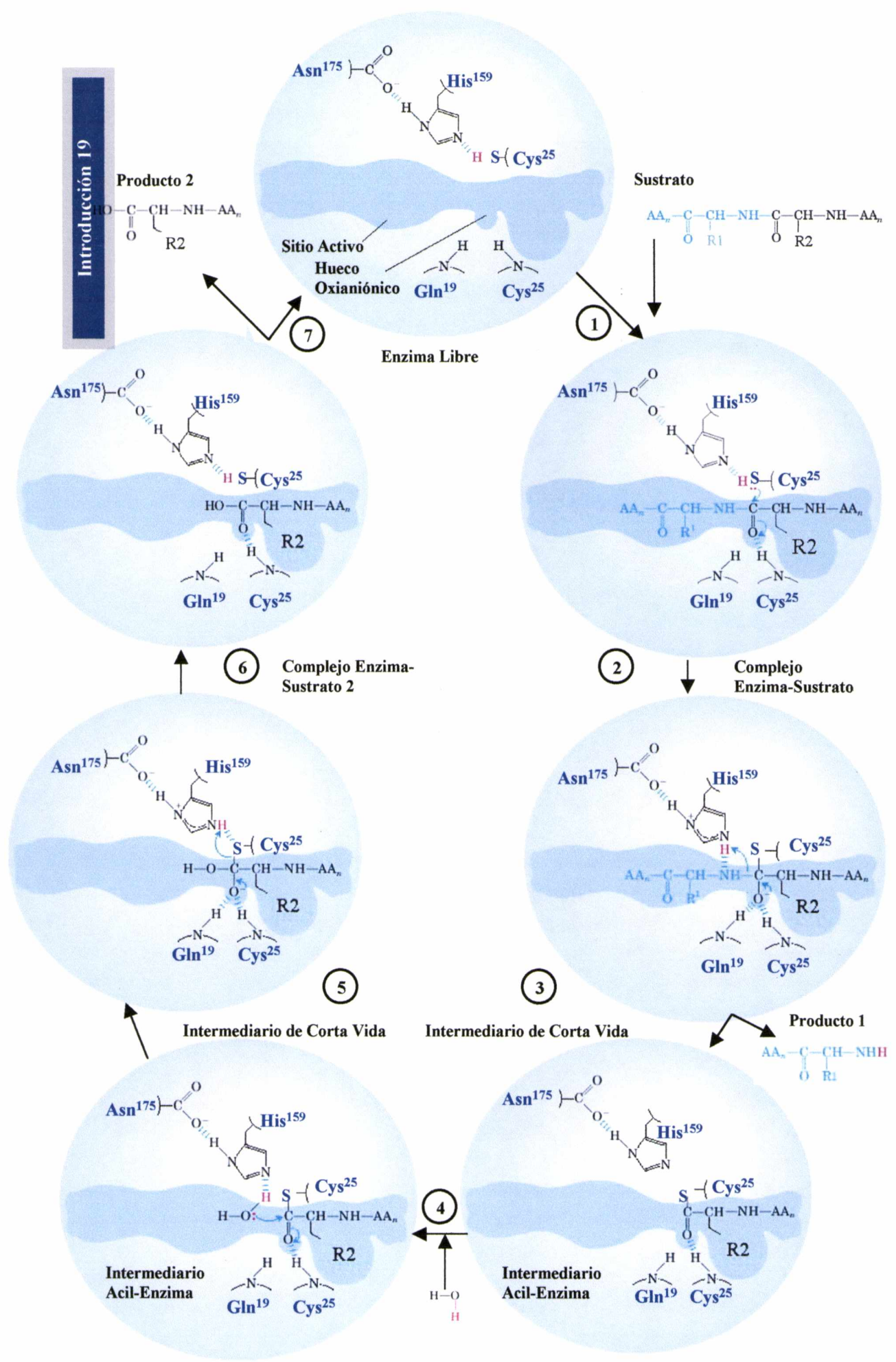


Fig. 1.4. Etapas del clivaje hidrolítico de un enlace peptídico catalizado por papaina

las peptidasas serínicas (Dunn *et al.*, 1994). Por su parte, la tríada catalítica está constituida por los residuos Cys²⁵, His¹⁵⁹ y Asn¹⁷⁵.

El sustrato (un polipéptido o una proteína) se une al sitio activo. La reacción consiste de dos fases. En la fase de acilación (pasos 1 a 3) ocurre la formación de un intermediario acil-enzima y el primer clivaje del enlace peptídico. En la fase de desacilación (pasos 4 a 7) se regenera la enzima libre. En ambas fases, el oxígeno carbonílico del sustrato adquiere una carga negativa en el intermediario tetraédrico. La carga es estabilizada por puentes de hidrógeno entre los átomos de hidrógeno de los grupos imino de la Gln¹⁹ y de la Cys²⁵. La desacilación es esencialmente un proceso inverso a la acilación, con una molécula de H₂O en reemplazo del componente aminoácido del sustrato. Los residuos de His y Asn participan de la tríada catalítica, provocando una catálisis básica en los pasos 2 y 5 y una catálisis ácida en los pasos 3 y 7.

1.5. LA FAMILIA DE LAS BROMELIACEAS

Pocas familias en el reino vegetal superan a la familia de las *Bromeliaceae* en su variedad de formas, tamaños y colores del follaje y de sus flores. La familia *Bromeliaceae* pertenece al Orden *Bromeliales*, Clase *Liliopsida* (Monocotiledóneas, que comprenden una cuarta parte de las plantas con flores), Filo *Magnoliophyta*, Reino *Plantae*.

Las plantas pertenecientes a esta familia se agrupan en 51 géneros con alrededor de 1.110 especies originarias de las regiones tropicales a templadas de América, ocupando una región que abarca desde el suroeste de los Estados Unidos (estado de Virginia) hasta las regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica, el Caribe y Sudamérica (Brasil, Chile, Argentina). Algunos pocos géneros son de origen africano, tal como la especie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr., hallada al oeste de este continente. Pueden encontrarse tanto al nivel del mar como a alturas mayores a los 4000 m, en una gran variedad de regiones y climas. Poseen características diversas en su forma, patrones típicos de hojas e inflorescencias y brácteas llamativas y coloreadas. Especies pertenecientes a un mismo género frecuentemente difieren bastante en apariencia. Son plantas sumamente vistosas o raras, muy buscadas por los aficionados por su uso ornamental.

Las primeras especies de *Bromeliaceae* aparecieron en las selvas tropicales y luego en regiones más frescas y secas. Muchas variedades naturales crecen a menudo aisladas sobre ramas de árboles, pero también pueden hacerlo

sobre la tierra. Las primeras plantas de la familia *Bromeliaceae* fueron llevadas a Europa por coleccionistas y botánicos hace más de 400 años, luego de los primeros viajes de Colón al Nuevo Mundo. Existen registros del siglo XVIII acerca del cultivo de varias especies, todas ellas ornamentales (*Guzmania lingulata* L. Mez, *Aechmea fasciata* Lindl. y *Vriesea splendens* Brongn.). Muchos botánicos de Bélgica, Holanda, Alemania y Francia han desempeñado un papel decisivo en el cultivo de estas plantas en Europa. Los cultivadores belgas y holandeses han desarrollado más recientemente nuevas especies gracias al uso de la fertilización cruzada intensiva. Muchas de estas especies tropicales pueden ahora crecer en condiciones más benévolas, permitiendo que en diferentes regiones del planeta se pueda disfrutar de la belleza de estas plantas. Los miembros más conocidos de esta familia son el ananá (*Ananas comosus* L.) y el “musgo español” (*Tillandsia usneoides* L.).

1.5.1. Descripción Botánica de la Familia

Son plantas herbáceas o suculentas, perennes, terrestres o epífitas, frecuentemente acaules. Dentro de un mismo género pueden existir especies saxícolas, terrestres y epífitas (Dimitri, 1978).

Las especies *saxícolas* se adhieren por sí mismas a las rocas buscando agua y minerales por introducción de sus raíces en fisuras y grietas. Las especies *terrestres* pueden desarrollarse tanto en regiones secas y soleadas como en húmedas y boscosas. En algunas especies las bases de las hojas forman pequeñas cámaras que pueden servir de refugio a pequeños insectos, cuyos desechos son aprovechados por la planta como fertilizante natural. Las especies *epífitas* son capaces de unirse a otras especies (árboles por lo general) por medio de estructuras radiculares especiales, las cuales tienden a endurecerse luego del crecimiento de la planta, convirtiéndose en zarcillos que permiten a la planta asirse a distintos soportes. Estas especies poseen la capacidad de absorber humedad y nutrientes del medio ambiente.

La mayor parte de estas plantas son capaces de crecer en muy variadas condiciones. De hecho, tanto las especies epífitas como las terrestres pueden prosperar aún si se las fuerza a crecer en sitios muy distintos a los acostumbrados. Esta propiedad es la que permite a muchas especies epífitas de bromeliáceas poder desarrollarse en macetas, convirtiéndolas en excelentes plantas ornamentales de interior (Black & Dehgan, 2003). Poseen hojas arrosetadas, coriáceas, lineales o lanceoladas, envainadoras en la base, con el borde entero o

armado de aguijones (Dimitri, 1978). En muchas especies las hojas superiores cambian su coloración cuando la planta desarrolla las flores (Black & Dehgan, 2003). Sus flores son actinomorfas, hermafroditas, compuestas por tres sépalos, tres pétalos y seis estambres y se presentan en capítulos o espigas terminales (Dimitri, 1978). Son por lo general pequeñas pero muy vistosas en color. La porción de la inflorescencia que frecuentemente queda expuesta a la vista presenta brácteas brillantes que sobresalen por debajo de cada flor. Las brácteas por lo general permanecen en la inflorescencia durante la maduración del fruto (Black & Dehgan, 2003). El ovario puede ser súpero, semisúpero o ínfero, trilocular, con los lóculos pauci- o plurióvulados, de estilo simple o trifido. El fruto constituye una cápsula o baya, formando en algunos géneros sincarpios carnosos. Las semillas son pequeñas, lisas, a menudo con alas o apéndices (Dimitri, 1978).

La combinación lograda entre las coloridas brácteas y el contraste con el color de los frutos, los cuales permanecen en la planta por meses, agrega un importante factor estético a las especies de esta familia. Es común que estas plantas florezcan una sola vez, pero pueden reproducirse vegetativamente por hijuelos que se alimentan de la planta madre hasta que forman sus propias raíces y de este modo pueden sobrevivir como plantas independientes. Las plantas madres suelen sobrevivir hasta dos generaciones, luego de las cuales mueren. Algunas veces los hijuelos se producen por largos brotes en el tope de la inflorescencia de la planta madre.

1.5.2. Subfamilias

La Familia *Bromeliaceae* se divide en tres subfamilias: *Pitcairnioideae*, *Bromelioideae* y *Tillandsioideae* (Luther & Sieff, 1991).

Los miembros de la subfamilia *Pitcairnioideae* son las bromeliáceas más ancestrales, que evolucionaron a partir de las gramíneas. Son principalmente plantas terrestres con fuertes espinas en los bordes de sus hojas y frutos, conteniendo semillas no aladas. Suelen crecer en suelos pedregosos y se encuentran desprovistas de estructuras capaces de atrapar el agua, dependiendo esencialmente de su sistema de raíces para la absorción de agua y nutrientes. Los principales géneros de esta subfamilia que pueden ser cultivados son: *Dyckia*, *Hechtia*, *Pitcarnia* y *Puya* (Black & Dehgan, 2003).

La subfamilia *Tillandsioideae* contiene la menor cantidad de géneros pero el mayor número de especies. Es la más evolucionada, pues sus integrantes poseen adaptaciones especiales que les permiten la supervivencia en condiciones

muy secas (xerófitas). La mayoría son epífitas y pueden ser cultivadas con éxito. Las plantas de este grupo poseen márgenes de hoja suaves o enteros, sin espinas. Sus frutos contienen semillas aladas, plumosas, que tienden a ser dispersadas por las corrientes de aire. Algunas especies producen flores con fragancia. Las especies pertenecientes a los géneros *Guzmania*, *Tillandsia* y *Vriesea* son las más comúnmente cultivadas dentro de esta subfamilia (Black & Dehgan, 2003).

Bromelioideae, la tercer subfamilia, posee la mayor cantidad de géneros (con un número discreto de especies) capaces de ser cultivados en jardines o utilizados como plantas de interior. La subfamilia engloba alrededor de treinta géneros con un amplio rango de formas y el mayor número de especies cultivables. Los géneros de esta subfamilia son principalmente epífitas, con hojas bordeadas por espinas, y su follaje posee marcas y patrones atractivos a la vista, con sus hojas habitualmente dispuestas en rosetas que pueden actuar como reservorio de agua. Sus semillas son por lo general distribuidas por pájaros y animales que consumen frutos carnosos. *Aechmea*, *Billbergia*, *Cryptanthus*, *Neoregelia* y *Nidularium* son los géneros más populares de esta subfamilia (Black & Dehgan, 2003).

La Tabla 1.5. muestra la distribución de los géneros de *Bromeliaceae* en las tres subfamilias que la integran.

Subfamilia	Género
<i>Pitcairnioideae</i>	<i>Ayensua, Brewcaria, Brocchinia, Connellia, Cottendorfia, Deuterocohnia, Dyckia, Encholirium, Fosterella, Hechtia, Lindmania, Navia, Pepinia, Pitcairnia, Puya, Steyerbromelia</i>
<i>Tillandsioideae</i>	<i>Alcantarea, Catopsis, Glomeropitcairnia, Guzmania, Mezobromelia, Racinaea, Tillandsia, Vriesea, Werauhia</i>
<i>Bromelioideae</i>	<i>Acanthostachys, Aechmea, Ananas, Androlepis, Araeococcus, Billbergia, Bromelia, Canistropsis, Canistrum, Cryptanthus, Deinacanthon, Disteganthus, Edmundoa, Fascicularia, Fernseea, Greigia, Hohenbergia, Hohenbergiopsis, Lymania, Neoglaziovia, Neoregelia, Nidularium, Ochagavia, Orthophytum, Portea, Pseudaechmea, Pseudananas, Quesnelia, Ronnbergia, Ursulaea, Wittrockia</i>

Tabla 1.5. Subfamilias y géneros de Bromeliaceae. Tomada del sitio Sunshine Coast Bromeliad Society (URL <http://www.sunshinecoastbromeliadsociety.com/>)

Existen diversas bases de datos *on-line* con información variada sobre las bromeliáceas, como se muestra en la tabla 1.6.

Sitio	URL
Bromeliad Encyclopedia Florida Council of Bromeliad Societies (FCBS)	http://www.fcbs.org/
Bromeliad Society International	http://www.bsi.org/
Bromeliads Online	http://www.bromeliads.co.nz/index.html
Florida Council of Bromeliad Societies Bromeliad Natural Hybrids Database	http://fcbs.org/cgi-bin/dbman/db.cgi?db=hybrids&uid=default
FCBS Bromeliad Photo Index Database	http://fcbs.org/cgi-bin/dbman/db.cgi?db=photo&uid=default
FCBS Bromeliad Species Database	http://fcbs.org/cgi-bin/dbman/db.cgi?db=species&uid=default
Missouri Botanical Garden	http://www.mobot.org/
The Sunshine Coast Bromeliad Society	http://www.sunshinecoastbromeliadsociety.com/

Tabla 1.6. Sitios relacionados con la familia *Bromeliaceae*.

1.5.3. Descripción del Género y de la Especie

El género *Bromelia* se caracteriza por poseer flores actinomorfas, hermafroditas. El cáliz está compuesto de 3 sépalos casi libres o connados en la base. Posee 3 pétalos, convolutados, desprovistos de escamas basales internas, connados en la base, y 6 estambres con sus filamentos unidos a los pétalos. El ovario es infero, trilocular, con los lóculos plurióvulados; el estilo es trigono y presenta 3 estigmas. Las plantas son acaules, de hojas coriáceas, armadas de fuertes aguijones en el margen y las flores están dispuestas en inflorescencias contraídas o paniculadas en la extremidad de un escapo alargado. Los frutos son bayas, formando una infrutescencia o un sincarpio carnoso. Existen alrededor de 10 especies originarias de América tropical (Dimitri, 1978).

1.5.4. Especies de *Bromelia* que Crecen en Argentina



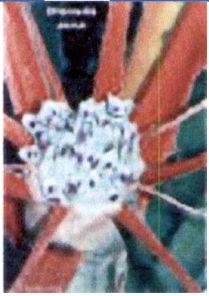

Especie	Descripción de la especie	
<i>Bromelia balansae</i> Mez.		Descrita en Materiales y Métodos (Cfr. 3.1.1)
<i>Bromelia hyeronimi</i> Mez		Planta acaule, estolonífera. Hojas lineales, largas, glaucas, armadas de fuertes agujones, largamente acuminadas. Flores de 4-6 cm de largo, solitarias en las axilas de pequeñas brácteas, formando amplias panojas terminales, con las ramificaciones rojas; pétalos lila. Fruto fusiforme, amarillo, de unos 5 cm de largo. América tropical y norte de Argentina. Se multiplica por hijuelos. Con sus frutos se elaboran bebidas, utilizándose la planta para cercos vivos (Dimitri, 1978).
<i>Bromelia Serra</i> Griseb.		“Chaguar”, “caraguatá”. Planta acaule, provista de largos estolones cilindricos. Hojas lineales, aplanadas, de 1-1,50 metros de largo, armadas de fuertes agujones marginales, terminadas apicalmente en una punta punzante. Flores de 4,5 cm de largo, subsésiles, dispuestas en inflorescencias capituliformes contraídas, de 10-15 cm de largo, en la extremidad de escapo protegido por brácteas foliáceas rojas; sépalos blancos, pétalos azules. Frutos carnosos, unidos entre sí, formando un sincarpio carnoso. Sudamérica tropical, norte de Argentina. Textil y de frutos comestibles (Dimitri, 1978).
<i>Bromelia laciniosa</i> Mart.		Planta perenne, estolonífera, con un porte superior al medio metro. Las hojas externas pueden superar los 2 m de largo y son fuertemente armadas; las internas poseen agujones menos consistentes. La infrutescencia, que presenta abundantes exudaciones gomosas, es cilíndrico-alargada, constituida por numerosas bayas anaranjadas, triloculares y pluriseminadas (Buttazzoni <i>et al.</i> , 1984).

Tabla 1.7. Especies argentinas de *Bromelia*.

1.6. PROTEASAS PRESENTES EN ABUNDANCIA, SIN FUNCION APARENTE

Todas las especies vegetales recambian sus proteínas en el transcurso de su desarrollo. Dentro de las distintas clases de proteínas se encuentran las peptidasas, cuya actividad en extractos vegetales es normalmente baja, resultando con frecuencia difíciles de detectar. En algunos pocos casos existen especies vegetales que poseen una extremadamente elevada actividad peptidásica en algunos de sus

tejidos o en el látex. En estos casos, las peptidasas llegan a formar parte de más del 50% de las proteínas totales y del 10% del material fresco.

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, desde el momento mismo de la germinación de las semillas. Existen, sin embargo, algunas familias (algunas Bromeliáceas, otras Monocotiledóneas y algunas Dicotiledóneas) en las que esta clase de enzimas son producidas en cantidades que exceden con creces (hasta dos órdenes de magnitud) el potencial necesario para tal recambio; a este tipo de proteasas se las ha denominado "proteasas no indispensables" o "proteasas secundarias", en analogía con los metabolitos secundarios de las plantas ” (Dalling, 1986).

La papaya (*Carica papaya* L.) es una especie con gran cantidad de peptidasas fuertemente activas, particularmente en el látex, (Kimmel & Smith, 1971). Las enzimas que contiene, entre las cuales papaina y quimopapaina son mayoritarias, son producidas comercialmente a gran escala a partir de látex fresco o desecado y utilizadas en una gran cantidad de procesos industriales. El látex de otras *Caricaceae* es igualmente rico en peptidasas (Jaziri *et al.*, 1994; Walraevens *et al.*, 1993). Entre otras familias productoras de látex que contienen proteasas se encuentran las *Euphorbiaceae* (Lynn & Clevette-Radford, 1987; Lynn & Clevette-Radford, 1988), *Moraceae* (López *et al.*, 1993; Perelló *et al.*, 2000; Sgarbieri *et al.*, 1964), *Asclepiadaceae* (Arribére *et al.*, 1999; Brockbank & Lynn, 1979; Obregón *et al.*, 2001, Pal & Sinha, 1980; Priolo *et al.*, 2003; Sequeiros *et al.*, 2003; Trejo *et al.*, 2001) y *Apocynaceae* (Jaffé, 1943). Debe aclararse que también existen especies con látex en el cual no se detecta actividad proteolítica.

La función del látex en el vegetal es aún desconocida (Biesboer & Mahlberg, 1978), aunque algunas teorías hablan sobre su participación en la coagulación o en la degradación de proteínas en el transcurso del desarrollo de los laticíferos. Debido a que gran parte de los componentes del látex resultan tóxicos para muchas especies incluyendo a los humanos, podría pensarse que sus proteasas actúan protegiendo contra parásitos y otros agentes patógenos externos.

Existe poca información respecto a la hipótesis referida a la función de las peptidasas en la defensa de la planta. La bromelina produce daño en la piel, generando dermatosis en los trabajadores que cultivan ananá, hasta llegar a una completa obliteración de las huellas digitales. Los extractos de algunas especies de *Agavaceae* son marcadamente irritantes sobre la piel humana, sugiriéndose que sus peptidasas son responsables de esta acción.

Las hojas de *Bromeliaceae* son ricas en cristales de oxalato de calcio, que se encuentra bajo la forma de afiladas agujas, las cuales pueden producir pequeñas pero dolorosas heridas en piel que permitirían el paso de proteasas al tejido del organismo invasor. La combinación de estos dos factores puede constituir una defensa efectiva frente a ciertos herbívoros (Dalling, 1986). Walter y Khanna (1972) demostraron la presencia de una endopeptidasa en hojas de *Dieffenbachia* sp. y sugirieron que la enzima podría actuar en combinación con las afiladas agujas del oxalato de calcio de las hojas.

Respecto a las peptidasas presentes en frutos, la familia *Bromeliaceae* es conocida desde hace tiempo por su alta actividad proteolítica. Los frutos maduros de *Bromelia pingüin* parecen ser una de las fuentes más ricas de peptidasas en existencia (Toro-Goyco *et al.*, 1968). Los frutos de *Caricaceae* suelen contener grandes cantidades de látex rico en peptidasas: aún cuando el flujo del látex se reduce durante la maduración en los frutos de *Carica* y *Pileus*, el látex aún presente mantiene una alta actividad específica en peptidasas (Skelton, 1969). La pulpa del fruto de *Carica papaya* contiene una menor actividad peptidásica que el látex y la misma disminuye a medida que el fruto madura. En frutos de *Jarilla chocola*, en cambio, el contenido por gramo de peptidasa aumenta a medida que el fruto madura (Tookey & Gentry, 1969). Las posibles funciones que las peptidasas pueden cumplir en los frutos de las especies antes descritas se encuentra aún en discusión. La maduración del fruto puede considerarse, de alguna manera, como un proceso de senescencia. El recambio de proteínas es importante durante la maduración del fruto. Las enzimas inicialmente presentes en el fruto inmaduro van siendo reemplazadas gradualmente a medida que nuevas proteínas son sintetizadas, y las peptidasas juegan un rol importante en estos procesos. De todas formas, la mayoría de los frutos poseen una actividad peptidásica relativamente baja, la cual es más que suficiente para los requerimientos intrínsecos de la maduración del fruto (Adams & Rinne, 1981). Considerado de esta manera, la gran cantidad de peptidasas contenidas en los frutos de las especies citadas en la tabla 1.8, serían proteínas “prescindibles”.

En la búsqueda de una función determinada para estas proteínas, es importante considerar la función de la pulpa de la fruta de frutos carnosos como un todo. Los frutos maduros están desarrollados para atraer animales que dispersen las semillas hacia sitios donde éstas puedan germinar y crecer y al mismo tiempo para alejar a las semillas de animales y parásitos que podrían desecharlas. Como se mencionó anteriormente, las peptidasas presentes en látex o en órganos vegetativos podrían funcionar como arma defensiva contra ciertos

parásitos o patógenos. De la misma forma podrían funcionar las peptidasas de fruto, aunque existen otras hipótesis a considerar. Algunas peptidasas podrían servir para atraer una determinada clase de herbívoros útiles para la planta, como ser aquellos capaces de dispersar las semillas. Los frutos de *Cucumis melo*, por ejemplo, son devorados por antílopes y ganado doméstico en el desierto de Kalhari, las semillas de plantas salvajes de ananá son dispersadas por pecaríes, mientras que los frutos de *Carica papaya* son devorados, y probablemente sus semillas dispersadas, por perros y caballos en Puerto Rico. Una gran cantidad de grandes mamíferos parecen servir como agentes dispersantes para muchos frutos ricos en peptidasas. Janzen y Martin (1982) han postulado que estos frutos carnosos se han desarrollado para ser devorados por grandes herbívoros del neotrópico, ya extintos hace 10.000 años atrás. Teniendo esto en cuenta, sería entonces concebible que la alta actividad peptidásica presente en algunos de estos frutos formara parte de un conjunto determinado de características que las plantas ofrecían a esta megafauna ya extinta para hacer los frutos altamente atractivos.

Por su parte también en las semillas existen enzimas proteolíticas que -del mismo modo que en frutos- juegan un rol central en los mecanismos fisiológicos y bioquímicos del crecimiento. Entre ellas hasta el momento se han aislado principalmente proteasas cisteínicas (Michaud *et al.*, 1994). Aunque en principio estas enzimas han sido estudiadas en semillas de leguminosas (Boylan & Sussex, 1987) se han identificado también en especies de diverso origen taxonómico como el tomate (Michaud *et al.*, 1994) y las habas (Rotari *et al.*, 1997)

En la tabla 1.8 se muestran las características de algunas peptidasas presentes en frutos.

Especie y familia	Nombre y Número EC	Número ^a	Tipo ^b	PM (kDa)	pH Óptimo ^c	pI	%pr	Abundancia ^d mg/ml ^e	Referencia
<i>Ananas comosus</i> (Bromeliaceae)	Bromelaina de fruto, EC: 3.4.22.4	3	Cis, G/NG	31	8	5	50	ca. 2	Cooreman. <i>et al.</i> (1976); Murachi (1970); Murachi (1976)
<i>Bromelia pinguin</i> (Bromeliaceae)	Pingüinaína, EC: 3.4.99.18	2	Cis	-	4 y 7 ^{f,g}	5 y 6			Messing (1960); Messing <i>et al.</i> (1960)
<i>Bromelia hemisphaerica</i> (Bromeliaceae)	Hemisphaericina, EC: -	1	Cis G	19	3-4 ^f	6,5	50	ca. 13	Toro-Goyco <i>et al.</i> (1968)
<i>Actinidia chinensis</i> (Actinidiaceae)	Actinidina, EC: 3.4.22.14	3	Cis	8	-	-	-	-	Agundis <i>et al.</i> (1977)
<i>Cucumis melo</i> (Cucurbitaceae)	Cucumisina, EC: 3.4.21.25	3	Cis	26	4 ^h	3	50	0,5-2	Arcus (1959); Brocklehurst <i>et al.</i> (1981)
<i>Benincasa cerifera</i> (Cucurbitaceae)	Sin denominación, EC: -	-	Ser G	50	10	8	15	ca. 1	Kaneda & Tominaga (1975)
<i>Solanum eleagnifolium</i> (Solanaceae)	Solanaina, EC: 3.4.99.21	-	Ser	50	9	8	5	ca. 1	Kaneda & Tominaga (1977)
		-	No Cisteinica	-	8,5 ^g	-	-	ca. 8	Greenberg & Winnick (1940)

Tabla 1.8. Peptidasas abundantes en frutos vegetales. ^a Número de peptidasas resueltas por cromatografía, ^b Cis: cisteinica, Ser: serinica, Met: metalo, G: glicosilada, NG: no glicosilada, ^c sustrato: caseína, ^d Abundancia de peptidasas en el % total de proteínas, estimado por factores de purificación, ^e mg de peptidasa por ml de jugo, ^f determinado con albúmina como sustrato, ^g determinado con hemoglobina como sustrato, ^h determinado con gelatina como sustrato

1.7. ENDOPEPTIDASAS DE *BROMELIACEAE*

1.7.1. Endopeptidasas de las Especies Argentinas de *Bromelia*

Las únicas proteasas sudamericanas del género *Bromelia* estudiadas hasta el momento son las que se encuentran en los frutos de las especies que crecen en Argentina: *B. balansae* Mez (balansaina), *B. hieronymi* Mez (hieronymaina), *B. laciniosa* Mart. (lacinosaina) y *B. serra* Griseb. (serraina), todas estudiadas en el LIPROVE.

1.7.1.1. *Balansaina*

A partir de frutos maduros de *B. balansae*, Bongiorno de Pfirter & Buttazzoni de Cozzarin (1976) obtuvieron una preparación enzimática parcialmente purificada, compuesta por seis fracciones proteicas, con máxima actividad a pH 7,25 (caseína) y 7,46 (benzoil-argininamida), a la que denominaron “balansaina”. Utilizando frutos semimaduros, Natalucci *et al.* (1988) obtuvieron una preparación activa dentro de un mayor rango de pH (6,0 – 9,5), de baja estabilidad térmica, que se resuelve en tres fracciones proteolíticamente activas por cromatografía de intercambio iónico, una de ellas de $pI > 8,0$. El estudio de esta especie se ha profundizado en el presente trabajo, lográndose el aislamiento de la principal fracción proteolítica (Pardo *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2001).

1.7.1.2. *Hieronymaina*

Buttazzoni de Cozzarin y Bongiorno de Pfirter (1980) obtuvieron una preparación proteolíticamente activa a partir de bayas de *B. hieronymi*, con máxima actividad a pH 6,3 y 7,8 (caseína) y 6,6 (benzoil-argininamida). Posteriormente Natalucci *et al.* (1985) comparan la actividad del jugo de frutos inmaduros y de un polvo acetónico y separan tres fracciones activas por cromatografía de intercambio iónico. Priolo *et al.* (1991) obtienen una preparación que muestra un perfil de pH más alcalino (7,2 a 10,0) y una buena estabilidad térmica, consiguiendo separar cuatro componentes proteolíticamente activos, de masas moleculares entre 26,2 y 28,6. Más recientemente Bruno *et al.* (2002, 2003) logran aislar la fracción principal a la que denominan

“hieronymaína I” (pI > 9,3, peso molecular 24 kDa, pH óptimo 8,5-9,5), cuya secuencia N-terminal exhibe un 64 % de identidad con bromelaína de tallo y de macrodontaína.

1.7.1.3. Lacinosáina

Por expresión de frutos de *B. laciniosa* Mart. y posterior fraccionamiento con acetona Buttazzoni de Cozzarin y Bongiorno de Pfrter (1980) obtienen una preparación proteolíticamente activa con máxima actividad a pH 6,3 y 7,8 (caseína) y 6,6 (benzoil-argininamida). Buttazzoni *et al.* (1984) obtienen dos preparaciones proteolíticamente activas por trituración de frutos verdes y frutos maduros en presencia de acetona, siendo la actividad enzimática mayor en el segundo caso. Empleando cromatografía de exclusión molecular obtienen una fracción activa, que eluye en la zona correspondiente a 15-20 kDa y que se resuelve por intercambio iónico en tres fracciones activas (Priolo *et al.*, 1986).

1.7.1.4. Serraína

Por trituración de frutos semimaduros de *B. serra* Griseb. en presencia de acetona se obtuvo una preparación enzimática con máxima actividad en el rango de pH 6,0 a 7,8 y con moderada estabilidad térmica. Mediante cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico se lograron separar dos fracciones activas, una de ellas de pI > 8,0 (Caffini *et al.*, 1988).

1.7.2. Otras Proteasas de Frutos de *Bromeliaceae*

1.7.2.1. Endopeptidasas de *Ananas comosus* L.

Durante varias décadas de informes contradictorios acerca del número exacto de componentes proteolíticos del ananá, Rowan *et al.* (1990 a), denominan “bromelaína de tallo” a la principal endopeptidasa del tallo de ananá y “bromelaína de fruto” a la principal endopeptidasa del fruto. Adicionalmente dos endopeptidasas menores (ananaína y comosaína) fueron separadas de tallo de ananá (Rowan *et al.*, 1988, 1990 a). En las tablas 1.9, 1.10, 1.11 y 1.12 se resumen las principales características de estas enzimas.

1.7.2.1.1. *Bromelaina de tallo*

Bromelaina de tallo	
EC ID	3.4.22.32
MEROPS ID	Peptidasa C01.005
Clan y Familia	Clan CA, familia C1
Especie vegetal	<i>Ananas comosus</i> L.
Características generales	Constituye el 90% del material proteolíticamente activo de extractos de tallos de ananá (Rowan <i>et al.</i> , 1988); la enzima es inmunológicamente distinta respecto a bromelaina de fruto (Rowan <i>et al.</i> , 1990 a) como a ananaina (Rowan <i>et al.</i> , 1988).
Sustratos de preferencia	Arg-Arg (Rowan <i>et al.</i> , 1988; Napper <i>et al.</i> , 1994).
Aditivos	Para lograr la máxima actividad requiere de agentes reductores tales como ditioneitol o cisteína (Barret <i>et al.</i> , 1998).
Estructura molecular	Una única cadena polipeptídica glicosilada de 24,5 kDa (Harrach <i>et al.</i> , 1995), conteniendo 7 residuos Cys (Napper <i>et al.</i> , 1994; Harrach <i>et al.</i> , 1995) y por lo tanto 3 puentes disulfuro (Barret <i>et al.</i> , 1998).
pI	9,55
pH óptimo	Es activa en un rango amplio de pH, aunque preferentemente neutro (Rowan & Buttle, 1994). A pH 2,0 existe en una conformación poco plegada comparada con la conformación a pH neutro. A pH 0,8 exhibe conformación globular, sugiriendo la existencia de un intermediario parcialmente plegado a bajos valores de pH (Haq <i>et al.</i> , 2002).
Secuencia aminoacídica	Deducida por Ritonja <i>et al.</i> (1989). Su N-terminal es diferente al de las otras endopeptidasas del ananá (Napper <i>et al.</i> , 1994).
Inhibidores	Inhibición débil por E-64 y carencia de inhibición por cistatina de pollo, lo que la diferencia de la mayoría de las peptidasas de la familia C1 (Ritonja <i>et al.</i> , 1989). Inhibición competitiva por "Bromelain Inhibitor-VI" específico (Hatano <i>et al.</i> , 1996).
Datos adicionales	Actividad digestiva, útil en el tratamiento de dispepsias; antiinflamatoria; antiagregante plaquetario y como adyuvante para vacunación (Engwerda <i>et al.</i> , 2001 a,b).

Tabla 1.9. Bromelaina de tallo

1.7.2.1.2. Bromelaina de fruto

Bromelaina de fruto	
EC ID	3.4.22.33
MEROPS ID	Peptidasa C01.028
Especie vegetal	<i>Ananas comosus</i> L.
Clan y Familia	Clan CA, familia C1
Características generales	Constituye el 30-40% de las proteínas totales del fruto y representa casi el 90% del material proteolíticamente activo (Murachi, 1970).
Sustratos de preferencia	Bz-Phe-Val-Arg-NHMec, que es pobremente hidrolizado por bromelaina de tallo (Rowan <i>et al.</i> , 1990a). Z-Arg-Arg-NHMec es un sustrato lentamente hidrolizado por bromelaina de fruto (Rowan <i>et al.</i> , 1990a).
Aditivos	Para lograr la máxima actividad requiere de agentes reductores tales como ditioneitol o cisteína (Barret <i>et al.</i> , 1998).
Estructura molecular	Cadena polipeptídica simple de 25 kDa (Rowan <i>et al.</i> , 1990 a).
PI	4,6 (Ota <i>et al.</i> , 1985).
pH óptimo	Amplio rango de pH óptimo frente a sustratos proteicos y sintéticos (Rowan & Buttle, 1994).
Secuencia aminoacídica	Similar a la de bromelina de tallo (Yamada <i>et al.</i> , 1976), aunque inmunológicamente diferente tanto de ésta como de ananaina. (Rowan <i>et al.</i> , 1990a).
Inhibidores	Débilmente inhibida por cistatina de pollo. Inhibición reversible frente a cloruro mercúrico (Rotwan <i>et al.</i> , 1990 a).
Datos adicionales	Revisiones completas sobre la enzima han sido desarrollados por Toro-Goyco <i>et al.</i> (1968), Ota <i>et al.</i> (1985) y Rowan y Buttle (1994).

Tabla 1.10. Bromelaina de fruto

1.7.2.1.3. Ananaina

Ananaina	
EC ID	3.4.22.31
MEROPS ID	Peptidasa C01.026
Especie vegetal	<i>Ananas comosus</i> L.

Clan y Familia	Clan CA, familia C1
Características generales	Comprende el 5% de las proteínas totales del extracto de tallo de ananá (Rowan <i>et al.</i> , 1988; Napper <i>et al.</i> , 1994).
Sustratos de preferencia	Buena actividad frente a Z-Phe-Arg-NHMec (Barret <i>et al.</i> , 1998).
Aditivos	Para lograr la máxima actividad requiere de agentes reductores tales como ditiotreitól o cisteína (Barret <i>et al.</i> , 1998).
Estructura molecular	Formada por una cadena proteica simple no glicosilada de 23,5 kDa (Rowan <i>et al.</i> , 1988; Napper <i>et al.</i> , 1994; Harrach <i>et al.</i> , 1995), contiene siete residuos de Cys (Napper <i>et al.</i> , 1994).
PI	pI > 10 (Rowan <i>et al.</i> , 1988; Harrach <i>et al.</i> , 1995).
PH óptimo	Cercano a la neutralidad, tanto con sustratos sintéticos como proteicos (Rowan & Buttle, 1994).
Secuencia aminoacídica	Claramente diferente a las otras endopeptidasas de ananá (Rowan & Buttle, 1994). Su estructura primaria incluye una secuencia inserta entre los residuos 170 y 174 no presente en bromelaina de tallo o papaina y una serie de aminoácidos adyacentes al residuo His ¹⁵⁷ , lo cual probablemente contribuye a las diferencias en especificidad de sustrato e inhibidor respecto a estas enzimas (Lee <i>et al.</i> , 1997).
Inhibidores	El comportamiento de la enzima frente a los inhibidores es similar al de la papaina, ya que es eficientemente inhibida tanto por cistatina de pollo como por E-64 (Rowan <i>et al.</i> , 1988).
Datos adicionales	Revisiones completas sobre la enzima han sido desarrollados por Naper <i>et al.</i> (1994) y Rowan y Buttle (1994). Ha sido utilizado, al igual que comosaina, como agente desbridante de heridas.

Tabla 1.11. Ananáina

1.7.2.1.4. Comosaina

Comosaina	
EC ID	No posee
MEROPS ID	Peptidasa C01.027
Especie vegetal	<i>Ananas comosus</i> L.
Clan y Familia	Clan CA, familia C1
Características generales	Es la endopeptidasa menos abundante del extracto de tallo de ananá y representa menos del 1% de las proteínas totales (Napper <i>et al.</i> , 1994).
Sustratos de preferencia	Buena actividad sobre Z-Arg-Arg-NHMec, que es un pobre sustrato

	para ananáina (Rowan <i>et al.</i> , 1990 a). Muestra preferencia por residuos polares tanto en P1 como en P1'.
Aditivos	Para lograr la máxima actividad requiere de agentes reductores tales como ditioneitol o cisteína (Barret <i>et al.</i> , 1998).
Estructura molecular	Glicoproteína de de cadena polipeptídica simple de PM 24,5 kDa conteniendo 7 residuos de Cys con una composición similar en carbohidratos a la bromelaina de tallo.
PI	> 10 (Barret <i>et al.</i> , 1998).
pH óptimo	No indicado.
Secuencia aminoacídica	Diferente en su composición aminoacídica a la bromelaina de tallo (Napper <i>et al.</i> , 1994). Datos de la secuencia N-terminal demuestran que comosaina es distinta de las otras endopeptidasas de ananá (Napper <i>et al.</i> , 1994; Rowan & Buttle, 1994).
Inhibidores	Es inhibida por E-64 (Napper <i>et al.</i> , 1994).
Datos adicionales	Su actividad proteolítica es muy elevada y ha sido utilizada, tal como ananáina, como agente desbridante de heridas (Rowan <i>et al.</i> , 1990b).

Tabla 1.12. Comosaina

1.7.2.2. Otras endopeptidasas de Bromeliaceae pertenecientes al género *Bromelia*

1.7.2.2.1. *Pingüinaina*

Pingüinaina	
EC ID, MEROPS ID	"Delete entry" en Expasy, sin datos en MEROPS, anteriormente 3.4.99.18
Especie vegetal	<i>Bromelia pingüin</i> L.
Características generales	Aislada partir de frutos de <i>Bromelia pingüin</i> L., planta tropical muy abundante en las Antillas, por Asenjo y Fernández (1942).
Sustratos de preferencia	La especificidad frente a sustratos sintéticos es mayor con dipéptidos en los que el átomo de N es aportado por un aminoácido aromático.
Aditivos	Sin datos.
Estructura molecular	Glicoproteína de masa molecular 26 kDa (SDS-PAGE) (Rowan <i>et al.</i> , 1990a). Posee 5 grupos sulfhidrido por molécula, 4 de los cuales están involucrados en puentes disulfuro (Toro-Goyco <i>et al.</i> , 1980). El contenido en hidratos de carbono es similar al de bromelaina de tallo (1,7 a 1,9 % de su peso total).

PI	6,5.
PH optimo	Messing <i>et al</i> obtuvieron en 1960 dos picos de pH óptimo (pH 5,5 y 7,6). En 1968, Toro Goyco <i>et al.</i> logran purificar la enzima, que muestra un pH óptimo ácido (pH 3,8-4,3).
Secuencia aminoacídica	Sin datos.
Inhibidores	Difiere de bromelaina de fruto en que es inhibida por cistatina de pollo (Expasy).
Datos adicionales	Temperatura óptima de 65 °C y estable a la desnaturalización térmica (Toro Goyco <i>et al.</i> , 1968). Extractos metanólicos del fruto han demostrado poseer actividad antifúngica (Camacho-Hernández <i>et al.</i> , 2002).

Tabla 1.13. Pingüinaina

1.7.2.2.2. *Hemisfericina, karatasina, palmerina y silvestrisina*

Hemisfericina	
Especie vegetal	<i>B. hemispherica</i> Lam
Características generales	Glicoproteína, con glucosamina en su estructura (0,28 %) y un contenido total de azúcares del 5,6 % (León-Alcalá <i>et al.</i> , 1989). Enzima polimórfica, formada por 9 especies moleculares que difieren en carga (Inei-Shizukawa <i>et al.</i> , 1976). Poco soluble en medio acuoso, muy soluble en urea a alta concentración (Ríos-Mercadillo <i>et al.</i> , 1978).
Sustratos de preferencia	Actividad proteolítica sobre caseína superior a la de pingüinaina y bromelaina y similar a karatasina, palmerina y silvestrisina (Cruz <i>et al.</i> , 1974). La enzima inmovilizada con Sepharosa 6B muestra igual perfil de pH que la enzima libre, siendo mayor su actividad esterolitica a pH 7,0 (Ríos-Mercadillo <i>et al.</i> , 1978). Cinética con N-benzoil-L-arginato de etilo (BAE) muy similar a la de palmerina (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Aditivos	Los derivados mercuriales necesitan de cisteína para su completa reactivación (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Estructura molecular	Pesos moleculares entre 22,5 y 24,8 kDa, determinados en base a la concentración de grupos tiol (Cruz <i>et al.</i> , 1974). Agundis <i>et al.</i> (1977) y Ochoa <i>et al.</i> (1987) demostraron que la enzima estaría formada por la asociación de 2 subunidades que se mantendrían unidas por puentes disulfuro y fuerzas electrostáticas.
PI	Constituida por 9 componentes activos por isoelectroenfoque cuyos puntos isoeléctricos varían entre 3,1 y 8,9 (Garduño <i>et al.</i> , 1974;

	León-Alcalá <i>et al.</i> , 1989).
PH óptimo	El pH óptimo es 8,0 frente a un sustrato proteolítico (caseína) y 7,0 frente a sustratos esterolíticos como el BAE (Inei-Shizukawa <i>et al.</i> , 1976). La inmovilización de la enzima en geles de agarosa no disminuye su actividad esterásica cuando es utilizado este ultimo sustrato (Ríos-Mercadillo <i>et al.</i> , 1978).
Secuencia aminoacídica	León-Alcalá <i>et al.</i> (1989) determinaron la composición en aminoácidos, hallando una gran semejanza entre hemisfericina y karatasina. El análisis de aminoácidos demostró que la enzima posee Val como aminoácido N-terminal y Ser como C-terminal (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Inhibidores	Inhibida reversiblemente por cloruro mercurico (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Datos adicionales	Preparación enzimática homogénea con un solo componente activo por cromatografía en gel (Garduño <i>et al.</i> , 1974).

Tabla 1.14. Hemisfericina

Karatasina	
Especie vegetal	<i>Bromelia plumieri</i> (karatas)
Características generales	Glicoproteína, con glucosamina en su estructura (0,9 %) y un contenido total de azúcares del 11,2 % (León-Alcalá <i>et al.</i> , 1989).
Sustratos de preferencia	Actividad proteolítica sobre caseína superior a la de pingüinaina y bromelaina y similar a hemisfericina, palmerina y silvestrisina (Cruz <i>et al.</i> , 1974).
Aditivos	Los derivados mercuriales necesitan de cisteína para su completa reactivación (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Estructura molecular	Pesos moleculares entre 22,5 y 24,8 kDa, determinados en base a la concentración de grupos tiol (Cruz <i>et al.</i> , 1974). Montes <i>et al.</i> (1990) demostraron que la enzima estaría formada por la asociación de 2 subunidades, que se mantendrían unidas por puentes disulfuro y fuerzas electrostáticas.
PI	De 7 a 11 componentes activos por isoelectroenfoque cuyos puntos isoelectrónicos varían entre 3,1 y 8,9 (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
PH óptimo	La mayor parte de los ensayos de actividad fueron determinados utilizando Azocoll como sustrato, a pH 6,5 (Montes <i>et al.</i> , 1990).
Secuencia aminoacídica	La secuencia amino terminal posee alto contenido en lisina y arginina y muestra analogía con papaina y bromelina de tallo (Montes <i>et al.</i> , 1990). León-Alcalá <i>et al.</i> (1989) determinaron la composición en

	aminoácidos, hallando una gran semejanza entre hemisfericina y karatasina.
Inhibidores	Inhibida reversiblemente por cloruro mercurico (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Datos adicionales	Preparación enzimática homogénea con un solo componente activo por cromatografía en gel (Garduño <i>et al.</i> , 1974).

Tabla 1.15. Karatasina

Palmerina	
Especie vegetal	<i>Bromelia palmeri</i> Mez
Características generales	Glicoproteína, con glucosamina en su estructura (0,1 %) y un contenido total de azúcares del 12 % (León-Alcalá <i>et al.</i> , 1989).
Sustratos de preferencia	Actividad proteolítica sobre caseína superior a la de pingüinaina y bromelaina y similar a hemisfericina, karatasina y silvestrisina (Cruz <i>et al.</i> , 1974). Cinética con BAE muy similar a la de hemisfericina (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Aditivos	Los derivados mercuriales necesitan de cisteína para su completa reactivación (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Estructura molecular	Pesos moleculares entre 22,5 y 24,8 kDa, determinados en base a la concentración de grupos tiol (Cruz <i>et al.</i> , 1974). Tres formas moleculares aisladas por CM y 6 por DEAE-celulosa. La enzima posee alto contenido en treonina, isoleucina, cisteína, metionina e histidina.
PI	Presenta 7 componentes activos por isoelectroenfoque cuyos puntos isoeléctricos se encuentran entre 3,55 y 8,60 (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Secuencia aminoacídica	Composición en aminoácidos determinada por León-Alcalá <i>et al.</i> (1989).
Inhibidores	Inhibida reversiblemente por cloruro mercurico (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Datos adicionales	Preparación enzimática homogénea con un solo componente activo por cromatografía en gel (Garduño <i>et al.</i> , 1974).

Tabla 1.16. Palmerina

Silvestrisina	
Especie vegetal	<i>Bromelia sylvestris</i> Willd. ex Sims
Características generales	Glicoproteína, con glucosamina en su estructura (0,42 %) y un

	contenido total de azúcares del 6,3 % (León-Alcalá <i>et al.</i> , 1989).
Sustratos de preferencia	Actividad proteolítica sobre caseína superior a la de pingüinina y bromelaina y similar a hemisfericina, karatasina, y palmerina (Cruz <i>et al.</i> , 1974).
Aditivos	Los derivados mercuriales necesitan de cisteína para su completa reactivación (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Estructura molecular	Pesos moleculares entre 22,5 y 24,8 kDa, determinados en base a la concentración de grupos tiol (Cruz <i>et al.</i> , 1974)
PI	De 7 a 11 componentes activos por isoelectroenfoque cuyos puntos isoelectrónicos varían entre 3,1 y 8,9 (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Secuencia aminoacídica	Composición en aminoácidos determinada por León-Alcalá <i>et al.</i> (1989).
Inhibidores	Inhibida reversiblemente por cloruro mercurico (Garduño <i>et al.</i> , 1974).
Datos adicionales	Preparación enzimática homogénea con un solo componente activo por cromatografía en gel (Garduño <i>et al.</i> , 1974).

Tabla 1.17. Silvestrisina

1. 8. APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS

En términos económicos, las enzimas proteolíticas representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial, a pesar de que el número de proteasas de aplicación industrial no supera la docena, incluidas tanto las de origen vegetal (papaina, ficina, bromelina) como las de origen animal (pancreatina, pepsina, quimosina) o microbiano (alcalasa, neutrasa, proteasas fúngicas) (Mantell *et al.*, 1985). La tabla 1.18 muestra algunos procesos utilizados en la manufactura de alimentos en los cuales las aminopeptidasas tienen aplicaciones específicas (Uhlig, 1998).

Producto o Proceso	Enzimas	Uso
Cerveza	Papaína, bromelina	Para solubilizar las proteínas de grano, para estabilizar la bebida y evitar formación de turbidez por enfriamiento (Buttazonni & Caffini, 1982; Sicard, 1982).
Tiernización de carnes	Papaína, bromelina, ficina	Para la separación parcial de tejido conectivo (Buttazonni & Caffini, 1982; Bernholdt, 1982).
Pan	Proteasas fúngicas, papaína, bromelina	Para incrementar la elasticidad del gluten y mejorar la manipulación de la masa. (Sicard, 1982).
Cueros	Pancreatina (animal), papaína, bromelina.	Para remover la lana, el pelo y los pigmentos, para suavizar la piel. (Buttazonni & Caffini, 1982; Sicard, 1982).
Detergentes	Proteasas microbianas	Se emplean para remover manchas proteicas y se asocian a lipasas y amilasas. (Whitaker, 1982).

Tabla 1.18. Aplicaciones de las proteasas en diferentes procesos tecnológicos

Las proteínas de origen vegetal y animal son de gran importancia tanto para la nutrición humana como para la animal. Se utilizan además como fertilizantes orgánicos en los cultivos y como componentes necesarios de medios de cultivo para distintos procesos fermentativos industriales (Uhlig, 1998).

La modificación de las proteínas contenidas en alimentos es una antigua técnica utilizada por la humanidad para mejorar el sabor y la estabilidad durante el almacenamiento de los recursos proteicos disponibles. A través de los siglos, distintas sociedades han desarrollado varios procesos hidrolíticos para obtener diferentes tipos de alimentos con características culturales propias.

Las proteínas presentes en los componentes de los alimentos son generalmente modificadas utilizando métodos físicos como el calentamiento o la homogeneización. Los cambios inducidos en las proteínas nativas sirven para mejorar su digestibilidad o su estabilidad en el almacenamiento (Uhlig, 1998).

Para muchas ramas de la tecnología alimenticia, es importante poder modificar las propiedades físicas y químicas de las proteínas. Esto puede realizarse por métodos físicos como los ya descritos, por métodos químicos o

por métodos biológicos, como los procesos enzimáticos. Algunos de estos procesos tradicionales están basados en la actividad de enzimas presentes en las materias primas incluyendo aquellos producidos por los microorganismos presentes en el producto original. La actividad enzimática en los alimentos no procesados como las frutas, los vegetales o los productos a base de cereales, dependen del clima y por tanto se encuentran sujetos a variaciones estacionales. Para poder lograr cambios específicos en sus proteínas, se suelen utilizar preparaciones comerciales de enzimas proteolíticas. Estas preparaciones enzimáticas son usualmente utilizadas para producir muchos alimentos en los cuales las proteasas pueden reemplazar con éxito productos químicos que produzcan la hidrólisis proteica pero que son potencialmente tóxicos o con riesgo carcinogénico (Uhlig, 1998).

En el caso de las plantas superiores, el número de especies investigadas en cuanto a su contenido en enzimas proteolíticas está muy lejos de representar siquiera el uno por mil de las especies conocidas (López, 1995). En lo que se refiere a la Argentina, la variedad de zonas fitogeográficas existentes ha generado una importante flora autóctona, a la que debe sumarse un buen número de especies introducidas por cultivo. Sin embargo existen pocos antecedentes sobre el aislamiento de fitoproteasas provenientes de plantas que crecen en el país, a excepción de los estudios realizados en el LIPROVE sobre algunas especies de *Asclepiadaceae* (Arribére *et al.*, 1998; Arribére *et al.*, 1999; Cortadi *et al.*, 1999; Obregón *et al.*, 2001; Priolo *et al.*, 2000; Priolo *et al.*, 2001; Trejo *et al.*, 2001; Vairo Cavalli *et al.*, 2001; Barberis *et al.*, 2002; Sequeiros *et al.*, 2003; Vairo Cavalli *et al.*, 2003), *Asteraceae* (Llorente *et al.*, 1997; Llorente *et al.*, 1999), *Bromeliaceae* (Priolo *et al.*, 1991; Natalucci *et al.*, 1996; López *et al.*, 2000; López *et al.*, 2001; Pardo *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2001; Bruno *et al.*, 2002; Bruno *et al.*, 2003) y *Moraceae* (López *et al.*, 1993; Perelló *et al.*, 2000).

1.8.1. Obtención de Hidrolizados Proteicos

En principio, toda proteasa está capacitada para hidrolizar cualquier sustrato proteico, aunque el grado de hidrólisis alcanzado y el tipo de productos obtenidos no sean los mismos prácticamente en ningún caso. La elección de una u otra clase de proteasa dependerá entonces de su modo de acción y de la posibilidad de que se adapte a las condiciones particulares del proceso en el que

se intente aplicarla (pH, temperatura, fuerza iónica, presencia de otras sustancias, características del medio) (Natalucci *et al.*, 1996).

Los hidrolizados proteicos se obtienen a partir de una degradación parcial o total de las proteínas obteniéndose como productos péptidos de menor peso molecular o incluso aminoácidos. Esta degradación (hidrólisis) puede ser catalizada por ácidos, bases o por enzimas proteolíticas (Adler-Nissen, 1986).

La hidrólisis enzimática es muy superior a la obtenida por métodos químicos porque puede llevarse a cabo bajo condiciones biológicas de reacción (pudiendo mantener, si se desea, la calidad nutricional de los aminoácidos), 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 parcial de las proteínas cambia sus propiedades químicas, físicas, biológicas e inmunológicas. La hidrólisis de proteínas alimentarias es llevada a cabo actualmente por numerosas 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 (Lahl & Brown, 1994; Mahmoud, 1994; Pedersen, 1994). 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 (Bartholomai & Pilosof, 2000). Es por ello que la funcionalidad de los productos de hidrólisis proteica, en muchos casos polipéptidos, es de gran importancia tecnológica, existiendo un gran interés por conocer los mecanismos implicados en la funcionalidad de las mismas, para de esta forma, poder modificar y extender su rango de aplicabilidad.

En algunas aplicaciones, sólo se busca maximizar la cantidad de un determinado producto de digestión, debiendo optimizarse por tanto su rendimiento al valor máximo. En otras aplicaciones es la velocidad de digestión, medida con precisión, el dato clave del experimento (Hubbard & Beynon, 2001).

Los hidrolizados proteicos pueden ser útiles para diversos usos terapéuticos (como los caseín-fosfopéptidos que son estimuladores de la absorción intestinal, la secuencia "opioide" de la β -caseína en la estimulación de la movilidad gastrointestinal, de la actividad antidiarreica y de los procesos

de secreción, etc). Otra de las características de los hidrolizados es su alta absorción a nivel gastrointestinal en relación a la proteína completa, por lo que pueden utilizarse en dietas para pacientes con mala función gastrointestinal por reducción del área de absorción o por una capacidad digestiva reducida (fibrosis quística y pancreatitis), personas mayores, en nutrición deportiva y para el control de peso (Frøkjær, 1994; Steinke *et al.* , 1992).

Una característica funcional de los hidrolizados proteicos es su elevada solubilidad en condiciones ácidas, incluso durante tratamientos térmicos como la pasteurización. Otra propiedad es la de formar soluciones con una muy baja viscosidad, incluso a altas concentraciones. Estas dos propiedades, sumadas al actual desarrollo tecnológico que ha hecho posible la producción de hidrolizados con una buena palatabilidad, convierten a los hidrolizados proteicos en fuentes potenciales para el enriquecimiento de bebidas ligeras y jugos (Asakura *et al.*, 1997).

1.8.2. Utilización de Hidrolizados de Proteínas de Soja

El cultivo intensivo de la soja se inició a nivel comercial alrededor de 1960. Este grano proporciona un aceite comestible de excelente calidad y el subproducto de la fabricación del aceite, una pasta desgrasada, constituye un magnífico alimento para el ganado y las aves de corral. El aceite de soja se ha convertido en un importante aceite comestible para la alimentación humana; sin embargo, la proteína de soja no ha sido un componente tradicional de la dieta occidental. En los últimos años, la soja ha comenzado a incluirse en la dieta de distintas culturas, básicamente como componente de las fórmulas para lactantes, carnes procesadas extendidas, productos de panificación y productos de tipo lácteo (Erdman & Fordyce, 1989).

La hasta ahora relativamente baja participación de la soja en la dieta humana tiende a incrementarse debido al incuestionable perfil nutricional de esta leguminosa, a su bajo costo, elevada disponibilidad, excelentes propiedades funcionales en los sistemas alimenticios y el constante desarrollo de nuevos productos a base de soja.

El término "proteínas de soja" es utilizado en sentido genérico para referirse al grupo de productos de soja que se consumen en forma más o menos generalizada. Estos productos incluyen harinas, concentrados, aislados, tofu y leche. En el mundo occidental, solamente algunos productos de soja como el tofu y los helados a base de soja se consumen en forma directa, mientras que la

mayor parte de la proteína se integra como ingrediente en sistemas mixtos de alimentos en forma de harina, concentrado o aislado.

El perfil de aminoácidos de las proteínas de soja es bastante completo. La comparación de diversos productos de soja con los patrones recomendados por la Comisión de Alimentos y Nutrición o por la Organización para la Agricultura y la Alimentación, muestra que estos productos tienen un contenido adecuado de aminoácidos esenciales como histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, tirosina, treonina, triptófano y valina. La concentración de lisina es particularmente elevada, y su abundancia en esta leguminosa de bajo precio hace de la soja una fuente de proteína de primer orden a nivel mundial. La lisina es muy escasa en la mayoría de las fuentes básicas de proteína vegetal que se consumen en áreas donde hay desnutrición proteica. La complementación de la alimentación en base a cereales como el arroz, el trigo o el maíz con soja mejora notablemente el valor nutricional de las proteínas ingeridas.

Las alergias a las proteínas contenidas en los alimentos se manifiestan principalmente en lactantes y niños pequeños. Se ha estimado que entre 0,3 y 0,7 % de los infantes en los Estados Unidos son sensibles a la proteína de la leche de vaca. La intolerancia ya sea a la lactosa o directamente a las proteínas pueden provocar diarrea, vómito, náuseas y pérdida de peso. De los que presentan alergia a la proteína de la leche de vaca, un 25% son también alérgicos a los preparados de soja. Sin embargo, los productos a base de soja ofrecen la ventaja de carecer de lactosa y tener una proteína menos alérgica. Se han utilizado con relativo éxito fórmulas de soja libre de lactosa y sin leche de vaca como alimentación alterna, no solamente por su relativa hipoadalergenicidad, sino por su bajo costo (Brady *et al.*, 1986).

1.8.3. La Coagulación de la Leche y sus Productos de Hidrólisis en el Proceso de Elaboración de Quesos

La proteólisis es uno de los más importantes eventos bioquímicos producidos durante la maduración del queso. Los productos de proteólisis comprenden un amplio rango, desde grandes cadenas polipeptídicas y pequeños péptidos hasta aminoácidos libres. El tipo de agente coagulante, la acidificación microbiana y la acción de la plasmina (el principal sistema proteolítico 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 monitorearse por distintos métodos que incluyen: fraccionamiento

acuoso, con ácido tricloroacético o ácido fosfotúngstico, cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico y electroforesis en geles de poliacrilamida con urea como agente desnaturizante (Sousa & Malcata, 1997).

La función principal de una enzima coagulante es iniciar el proceso de coagulación del queso en la leche a la cual ha sido agregada. Este proceso incluye el rápido y altamente específico clivaje del caseinmacropéptido (CMP), parte de las moléculas de κ -caseína (κ -CN) localizadas en la periferia de las micelas caseínicas. En su forma intacta, estas micelas se encuentran en la leche formando una dispersión coloidal, estabilizadas por repulsión estérica y electrostática (carga neta negativa de las CMP y en parte de κ -CN). Cuando esta barrera repulsiva es eliminada por proteólisis y liberación de la porción CMP de las κ -CN, las micelas se inestabilizan y entonces, a una temperatura apropiada (ca. 30 °C) la leche comienza a coagular bajo la influencia de iones Ca^{+2} del medio (Visser, 1993).

Para producir quesos se usa tradicionalmente el cuajo obtenido del estómago de rumiantes lactantes, que contiene principalmente quimosina y pepsina, responsables de la hidrólisis específica del enlace $\text{Phe}_{105}\text{-Met}_{106}$ de la κ -caseína bovina. Debido a la escasez y al alto costo del cuajo obtenido de terneros lactantes, al incremento mundial del consumo de quesos y, en algunos países, a principios religiosos y culturales, se ha intensificado, en los últimos años, la búsqueda de nuevos coagulantes de la leche. En la península ibérica se utilizan proteasas aspárticas de origen vegetal en la producción de quesos con características organolépticas particulares (Tavaria *et al.*, 1997; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Silva & Malcata 1999), alguna de las cuales han sido clonadas (Faro *et al.*, 1999).

Varias peptidasas de plantas son capaces de coagular la leche, aunque la mayoría son inapropiadas para la producción de quesos debido a su elevada actividad proteolítica, que produce la degradación del coágulo. Así, Gupta & Eskin (1977) estudiaron la actividad coagulante de la leche de extractos parcialmente purificados de *Benincasa cerifera*. A su vez, Yamaguchi *et al.* (1982) detectaron alta actividad proteolítica en jengibre, espárrago y en frutos tales como higo, kiwi y ananá. También se han estudiado en este sentido las peptidasas presentes en hojas de *Calotropis procera* (Aword & Nakai, 1986; Aword & Muller, 1987), en semillas de *Oryza sativa* (Asakura *et al.*, 1997), en tallos de *Dieffenbachia maculata* (Padmanabhan *et al.*, 1997), en semillas, hojas y flores de *Onopordum turcicum* (Tamer, 1993) y en flores de *Centaurea*

calcitrapa (Tavaria *et al.*, 1997) y de *Cynara cardunculus* (Heimgartner *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1993; Verissimo *et al.*, 1998).

Uno de los criterios más 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 (Gallagher *et al.*, 1994), los cuales 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.

El seguimiento de la hidrólisis 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).

1.8.4. Hidrólisis de las Proteínas del Suero para el Aprovechamiento de Desechos Industriales

Luego de obtenerse el queso queda un residuo líquido, denominado suero, un efluente industrial rico en proteínas (6 g por litro). La cantidad de suero residual es 5 a 10 veces mayor que la de queso producido. Se calcula que se produce un total de 110 millones de toneladas anuales de suero de queso en todo el mundo, esto equivale a 660.000 toneladas anuales de proteínas, lo cual justifica el interés que despiertan. No existen referencias sobre la cantidad de suero que se produce en nuestro país, pero este valor debe ser elevado, ya que somos importantes productores de queso (Graselli, 1997).

Las proteínas de suero de leche poseen excelentes propiedades funcionales y un muy alto valor nutritivo debido a su excepcional contenido en aminoácidos azufrados, lisina y triptofano. Durante varios años estas proteínas no se destinaron para el consumo humano y fueron utilizadas como alimento para cerdos o desechadas (Maubois *et al.*, 1988).

La aplicación de enzimas proteolíticas al lactosuero con el propósito de recuperar proteínas para su uso en alimentación humana no cuenta con muchos

antecedentes, a diferencia de lo que ha ocurrido en el tratamiento de proteínas de desecho de la soja (López *et al.*, 1998).

1.8.5. Uso de Proteasas en la Obtención de Formulaciones Hipoalérgicas.

Cuando un hidrolizado se utiliza como base para un alimento en una determinada población, se considera que provocará en la misma un determinado beneficio clínico. Los alimentos basados en hidrolizados proteicos con elevado grado de hidrólisis, por ejemplo, son útiles para el control de varios tipos de alergias alimenticias (Cordle, 1994).

Las alergias alimenticias son provocadas por una respuesta inmunológica anormal a componentes alimenticios, en general proteínas. El mecanismo mejor conocido es la hipersensibilidad mediada por inmunoglobulina E (IgE). 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).

La leche vacuna contiene las primeras proteínas extrañas introducidas en la dieta, por lo que la alergia (mecanismo mediado por IgE) y la intolerancia (sin mecanismo inmunológico comprobado) a esta, son más frecuentes en la primera infancia. En general los síntomas aparecen al iniciar la lactancia artificial e incluyen alteraciones gastrointestinales, cutáneas y respiratorias. En general tienen buen pronóstico y la recuperación se produce en un 80% de los casos. Las reacciones de alergia o intolerancia a las proteínas de la leche de vaca (A/I PLV) eran una patología rara hasta 1950. A partir de la siguiente década se empezó a observar un incremento de éstas, probablemente asociado con un aumento de la exposición a las proteínas extrañas procedentes de la leche de vaca por el descenso en la lactancia materna producido en los países desarrollados. Las fórmulas altamente hidrolizadas aparecieron durante la posguerra y son utilizadas como alimento sustitutivo en la A/I PLV del lactante. En el campo de la prevención primaria su mal sabor, elevado costo y aporte nutritivo a largo plazo han sido factores que han hecho disminuir su uso. A finales de los años 80 se introdujo una fórmula alternativa más orientada a la intervención preventiva, de menor costo y mejor sabor: las fórmulas parcialmente hidrolizadas, denominadas también hipoalérgicas (Benot López, 2000).

El objetivo fundamental del manejo de las alergias e intolerancias a la leche vacuna es evitar la ingesta de proteínas de leche de vaca y la consecuente sustitución por proteínas menos alergénicas o por un formulado proteico. Las características de una fórmula alternativa ideal son: a) no reactividad cruzada entre las proteínas de la leche de vaca y las de la fórmula alternativa, b) ausencia completa de proteínas lácteas intactas, c) no alergenicidad (ausencia de anticuerpos IgE), d) antigenicidad normal (anticuerpos IgG) y e) ser nutricionalmente adecuada, de bajo costo y sabor agradable. Para ello las proteínas de la leche son modificadas según un mecanismo de hidrólisis enzimática múltiple. Pueden utilizarse productos extensamente hidrolizados derivados de proteínas lácteas (caseína, suero o ambos), fórmulas con diferentes fuentes de proteínas como la soja o fórmulas elementales con aminoácidos sintéticos, entre otras (Lozano de la Torre & Lorente Toledano, 1999).

Los alérgenos más importantes en leche vacuna son las caseínas, la β -lactoglobulina, y la α -lactalbúmina. Las proteínas de suero de leche y las caseínas poseen ventajas nutricionales en su uso para fórmulas de infantes ya que son proteínas completas. La hidrólisis de estas proteínas producen la ruptura de enlaces a péptidos menores y con ello la desaparición de epitopes para IgE, dando lugar a un producto de alto valor nutricional e hipoalergénico. Una hidrólisis extensiva no es recomendable, ya que en estos casos existe una disminución en la calidad del sabor debido a la presencia de pépticos y aminoácidos amargos. Debido a esto, se suelen utilizar hidrolizados parciales para la creación de una fórmula efectiva y que al mismo tiempo carezcan de alergenicidad para el infante. De todas formas, es frecuentemente necesario incluir procesos post-hidrólisis, como la eliminación de las proteasas utilizadas, y los remanentes de alto PM por ultrafiltración (Businco *et al.*, 1993).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

Aislar, purificar y caracterizar proteasas presentes en los frutos de *Bromelia balansae* Mez (*Bromeliaceae*) que luego podrán ser ensayadas sobre proteínas de uso en alimentación humana con el objeto de mejorar sus propiedades funcionales por hidrólisis parcial.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

2.2.1. Obtener preparaciones enzimáticas crudas de *Bromelia balansae* Mez y determinar las condiciones óptimas para su conservación.

2.2.2. Establecer la relación entre el grado de madurez de los frutos de *Bromelia balansae* Mez y su actividad proteolítica, contenido de proteínas y de azúcares.

2.2.3. Caracterizar las preparaciones crudas en cuanto al efecto del pH, la temperatura, la fuerza iónica y el agregado de activadores e inhibidores, así como ensayar la actividad proteolítica frente a diferentes sustratos naturales y sintéticos.

2.2.4. Purificar y caracterizar desde el punto de vista bioquímico la principal fracción enzimática obtenida de los frutos de *Bromelia balansae* Mez.

2.2.5. Obtener hidrolizados parciales de diferentes proteínas; conocer el grado de hidrólisis obtenido y el perfil hidrolítico de sus productos por electroforesis y compararlos con los obtenidos empleando otras proteasas aisladas en nuestro laboratorio.

2.2.6. Efectuar un estudio preliminar de las propiedades coagulantes de los extractos de *Bromelia balansae* Mez.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. OBTENCION Y TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL MATERIAL VEGETAL

3.1.1. Descripción de la Especie

Bromelia balansae Mez. (*Bromeliaceae*) es una planta acaule, estolonífera, con hojas de alrededor de 1 m de largo, armadas en el borde y en el ápice de fuertes aguijones (Figura 3.1). Sus flores son actinomorfas, hermafroditas, subsésiles, de unos 4 cm de largo. El cáliz esta compuesto de tres sépalos y la corola por tres pétalos convolutados, connados en la base. El androceo esta compuesto por seis estambres cuyos filamentos se hallan unidos a los pétalos. El gineceo es ínfero, presenta ovario trilocular con lóculos plurióvulados, estilo trígono y tres estigmas. Los frutos son bayas triloculadas y pluriseminadas dispuestas en una infrutescencia paniculada.

La especie, denominada vulgarmente *caraguatá*, es originaria de la región tropical y subtropical de Sudamérica y se multiplica por hijuelos. Se trata de una planta textil cuyos frutos son comidos por aborígenes y algunos animales. El nombre del género se instituyó en honor al botánico sueco O. Bromel (Castellanos, 1945; Dimitri, 1978).



Fig. 3.1. *Bromelia balansae* Mez. (n. v.: “caraguatá”).

3.1.2. Localización y Características de la Zona de Muestreo

El material estudiado provino de la Provincia de Misiones (en la proximidad de Posadas, ruta 105, Km 28 a 33, entre los departamentos de San José y Fachinal). Las plantas fueron halladas en suelos pedregosos con basalto

aflorante, asociadas a isletas de *Astronium balansae* (“urunday”), *Cereus* sp. y *Opuntia* sp. La recolección fue llevada a cabo durante el periodo 1997-2000 en los meses de febrero, marzo y abril por el Dr. Aníbal Amat, de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

3.1.3. Tratamiento y Clasificación de los Frutos

El material vegetal empleado en este trabajo consistió en frutos de *Bromelia balansae* Mez en diferentes estadios de desarrollo. Las bayas fueron separadas de las infrutescencias. Cada infrutescencia se limpió cuidadosamente con agua destilada y guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la obtención del extractivo enzimático.

3.1.4. Determinación del Color Superficial.

El desarrollo del color superficial de los frutos varía paulatinamente durante el proceso de maduración y es un parámetro visual que está relacionado con el contenido en pigmentos.

Para disponer de un sistema universal para la definición de un color, la International Commission on Illumination (ICI) adoptó un conjunto de parámetros (sistema ICI) que hacen posible definir el color en términos absolutos. Estos parámetros (**L**, **a** y **b**), obtenidos por mediciones instrumentales, proveen un método muy preciso para la evaluación y contralor de sistemas coloreados que permite correlacionar resultados obtenidos en distintos laboratorios (X-Rite, 2002):

L: permite obtener una estimación del brillo y varía entre 0 (negro opaco) y 100 (blanco luminoso).

a: indica el equilibrio entre el verde(valor negativo) y el rojo (valor positivo).

b: indica el equilibrio entre el azul (valor negativo) y el amarillo (valor positivo)

La Figura 3.2 es un diagrama que presenta en forma tridimensional cada uno de los parámetros señalados mientras que la Figura 3.3 nos permite observar una representación similar en color.

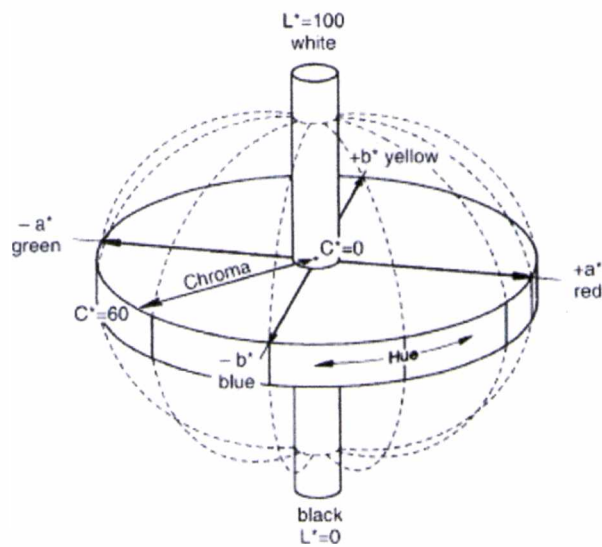


Fig. 3.2. Representación de los parámetros de color. El valor de L está representado en el centro del eje. Los ejes a y b se representan en el plano horizontal

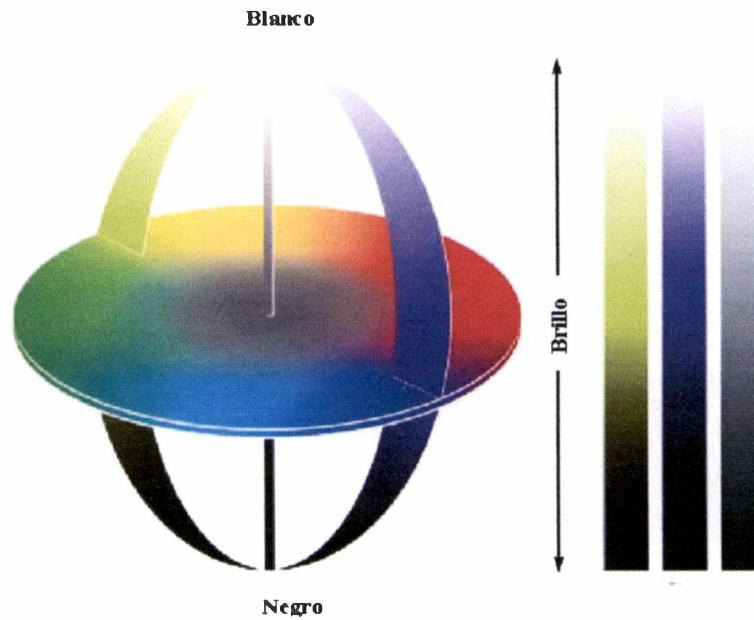


Fig. 3.3. Sistema tridimensional de color, representando el brillo.

En el presente trabajo, con el fin de disponer de parámetros objetivos para seleccionar los frutos en diferente estadio de madurez, se realizaron las determinaciones colorimétricas de los mismos.

El color superficial de cada fruto fue medido empleando un colorímetro de superficie Cromameter Minolta (modelo CR 300), en tres zonas diferentes de su superficie, apoyando el sensor de forma que no entre luz. Se realizaron tres determinaciones en cada zona y se promediaron los valores obtenidos.

Luego de efectuar las medidas de color, los frutos fueron procesados tal como se indica en 3.2.1, realizándose a continuación el isoelectroenfoco de cada muestra para poder comparar el grado de madurez con los patrones polipeptídicos obtenidos.

3.2. OBTENCION DE LAS PREPARACIONES CRUDAS

3.2.1. Técnica General de Extracción

Para proceder a la extracción de las proteasas, los frutos fueron descongelados, lavados bajo un chorro de agua corriente con la ayuda de un cepillo suave, enjuagados dos veces con agua destilada y pesados una vez secos.

Para cada uno de los estadios se procesaron 50 g de frutos cortados en pequeños trozos y desprovistos de semillas, homogeneizándolos en presencia de 250 ml de solución fría de buffer fosfatos 0,1 M conteniendo protectores de la actividad enzimática (EDTA, cisteína) en baño de hielo-agua para prevenir la proteólisis. Se utilizó homogeneizador en baño de hielo, triturando 10 veces, cada 10 segundos, con intervalos de 20 segundos, minimizando de este modo la formación de espuma.

La suspensión así obtenida se filtró por malla gruesa en frío para eliminar restos groseros y se centrifugó a 10.000 g durante 30 min a 4°C. El precipitado fue desechado y el sobrenadante sometido a una nueva filtración por malla fina para eliminar restos de insolubles en su superficie, obteniéndose finalmente un extracto crudo al que se le determinaron proteínas, actividad caseinolítica y azúcares totales.

Se midió el volumen final y el pH antes de congelar y, periódicamente, luego de congelado.

Los extractos crudos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso.

3.2.2. Optimización de las Condiciones de Extracción

Se ensayaron distintas condiciones de extracción variando el pH inicial del buffer protector (buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,0; 7,0 y 8,0) en ausencia de cisteína y en presencia de dos concentraciones diferentes del activador (12,5 y 25 mM).

El agregado de EDTA obedeció a la necesidad de evitar la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{+2} en su centro activo (Anderson, 1968), en tanto que el valor de pH elegido fue lo suficientemente alejado del pH óptimo como para minimizar la autodigestión durante el proceso.

3.3. OBTENCION DE EXTRACTOS PARCIALMENTE PURIFICADOS

3.3.1. Optimización de la Precipitación de la Enzima Empleando Solventes Orgánicos

Se colocaron alícuotas de 10 ml de extracto crudo en vasos de precipitado preenfriados a 4 °C, manteniéndolos en baño de hielo y agregando en cada caso gota a gota y con agitación 1; 2; 2,5; 3; 4; 5 y 6 volúmenes de solvente (acetona o etanol) preenfriado a -20 °C a efectos de minimizar la desnaturalización proteica. Las suspensiones resultantes se dejaron estabilizar en cámara fría a 4° C durante 30 min y se centrifugaron a 6.000 g durante 20 min a 4 °C. En cada caso, el precipitado obtenido fue separado cuidadosamente del sobrenadante, el cual se desechó. El precipitado se colocó 20 min en desecador al vacío para eliminar restos de solvente y luego se redisolvió en 1 volumen de buffer fosfatos 0,1 M de pH 7,0 conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 12,5 mM manteniéndose el sistema a 0°C. En cada una de las soluciones obtenidas se determinó la actividad proteolítica, el contenido de proteínas y el de hidratos de carbono.

El objetivo de esta técnica fue determinar el mínimo volumen de solvente precipitante necesario para obtener una solución de extracto crudo parcialmente purificado que retuviese el máximo valor de actividad respecto al extracto inicial eliminando compuestos fenólicos y glúcidos.

3.3.2. Obtención de Extractivos Parcialmente Purificados por Precipitación con Solventes Orgánicos

El extractivo crudo fue sometido a una primera precipitación con un volumen del solvente a -20 °C (acetona o etanol) agregado sobre la muestra en baño de hielo con agitación continua gota a gota desde una ampolla de decantación en cámara fría a 4°C a efectos de minimizar la desnaturalización proteica. La suspensión obtenida se dejó en reposo durante 30 min y se centrifugó a 6.000 g durante 20 min a 4°C. El precipitado obtenido se separó

cuidadosamente del sobrenadante el que fue sometido a una segunda precipitación con los mismos cuidados tenidos en la primera, empleando un volumen adecuado de solvente (3 volúmenes de acetona o 4 volúmenes de etanol). El precipitado así obtenido se redisolvió en 1 volumen de buffer fosfatos 0,1 M de pH 7,0 conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 12,5 mM, obteniéndose el extractivo parcialmente purificado. En la solución obtenida se determinó la actividad proteolítica, el contenido de proteínas y el de hidratos de carbono.

3.4. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN PROTEINAS E HIDRATOS DE CARBONO

Para la determinación del contenido en proteínas se utilizó el método de Bradford (1976) que se basa en la unión del Coomasie Blue G-250 a las proteínas, lo que produce un cambio en el máximo de absorbancia (595 nm). Dicho 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), no haciéndolo con el de Bradford.

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina en el rango de 100-900 mg/ml para el ensayo estándar y en el de 5-100 mg/ml para el microensayo. Las determinaciones fueron efectuadas por triplicado y efectuando un blanco de reactivos, también por triplicado.

Reactivos	Macrométodo	Micrométodo
Muestra	50 μ l	250 μ l
Reactivo	2,5 ml	2,5 ml
<i>Agitar en vórtex, leer la absorbancia a 595 nm a los 10 min.</i>		
Rango de detección	100-900 μ g/ml	10-100 μ g/ml

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

El contenido de hidratos de carbono se determinó por formación de un compuesto coloreado con máximo de absorbancia a 490 nm por reacción del fenol con los glúcidos en presencia de ácido sulfúrico concentrado (Dubois *et al.*, 1956). El color es estable por varias horas. La curva de calibración se confeccionó utilizando glucosa como patrón en el rango de 10-100 mg/ml.

Tanto para las muestras como para los blancos las determinaciones fueron efectuadas por cuadruplicado.

Reactivos	Volumen por tubo
Muestra	1 ml
Fenol al 80 %	0,5 ml
H ₂ SO ₄ conc (adicionar rápidamente)	2,5 ml
<i>Dejar 10 min en reposo. Agitar y llevar a baño de agua a 25-30 °C por 10-20 min.</i>	

3.5. ACTIVIDAD ENZIMATICA

3.5.1. Sustratos Proteicos

3.5.1.1. Caseína

La preparación del sustrato se realizó suspendiendo 1 g de caseína tipo Hammarsten en 50 ml de solución buffer glicina – OHNa 0,2 M de pH 10,0. La suspensión se colocó en un baño de agua fría que luego fue llevada a ebullición y se mantuvo en esas condiciones durante 20 min. La solución resultante se filtró en caliente por papel, agregando luego 40 ml de agua destilada y dejando enfriar. A la solución obtenida se le agregó cisteína para obtener una concentración final 25 mM, ajustándose el pH a 8,7 con NaOH 0,2 M y agregando luego agua destilada hasta un volumen final de 100 ml. La solución debe conservarse a 4 °C y ser utilizada el mismo día en que es preparada.

De no indicarse lo contrario, la mezcla de reacción se preparó mezclando 1,1 ml de solución de caseína al 1% conteniendo cisteína 25 mM y 0,1 ml de solución de la enzima, ambas en buffer glicina - NaOH 0,1 M de pH 8,7. La reacción fue llevada a cabo a 37 °C y detenida por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Los tubos se dejaron reposar durante 30 min en frío y luego fueron centrifugados a 6.000 g durante otros 30 min, determinándose la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm en una celda de 1 cm de paso. Los ensayos en blanco fueron realizados inactivando la enzima con TCA previo al agregado del sustrato. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y a diferentes tiempos para cada extractivo y en el caso de los blancos por triplicado.

Siguiendo el criterio de Sarath *et al.* (2001) 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 1 min, en las condiciones de ensayo.

3.5.1.2. Azocaseína

El uso de este sustrato obedece a la necesidad de reemplazar a la caseína en los ensayos de inhibición enzimática con 1,10-fenantrolina, ya que dicho inhibidor exhibe un alto valor de absorbancia a 280 nm.

Para la preparación de la azocaseína se utilizó la técnica de Charney & Tomarelli (1947) modificada por López (1995), que requiere la preparación previa de una solución 0,01 M de ácido sulfanílico diazotado y de una solución de caseína al 7,5%.

La solución de ácido sulfanílico diazotado se preparó disolviendo 10 milimoles de nitrito de sodio y 10 milimoles de ácido sulfanílico en 300 ml de agua destilada, que se vertieron sobre 25 milimoles de HCl concentrado y 2 milimoles de NaBr, agitando durante 1 hora a 20 °C. La solución se llevó a un litro con agua destilada y se conservó en heladera. La solución de caseína se preparó agregando 15 g de caseína tipo Hammarsten lentamente y con agitación suave sobre 200 ml de una solución de Na₂CO₃ al 5 % (p/v) a temperatura inferior a 60 °C. La solución de ácido sulfanílico diazotado fue vertida lentamente sobre la de caseína, manteniendo la temperatura por debajo de 5 °C y asegurándose que el pH fuera inferior a 9,0 mediante el agregado de HCl 1 M. El conjunto se transfirió a la heladera con agitación constante durante 5 h o más. Al cabo de ese tiempo se agregó HCl 0,2 M hasta pH 6,5 y se dializó a igual temperatura contra NaCl 0,1 M (15 volúmenes) durante 12 h y luego contra agua destilada (15 volúmenes) otras 12 h. La solución dializada fue fraccionada y liofilizada.

La mezcla de reacción conteniendo 250 µl de azocaseína al 2% en glicina-NaOH 0,1 M de pH 9,0 conteniendo cisteína 12,5 mM y 150 µl del extracto enzimático se incubó a 37 °C. La reacción se detuvo agregando 1,2 ml de TCA al 10%; la mezcla se mantuvo en reposo durante 15 min y luego se centrifugó durante 20 min a 4.000 g. Se vertieron 1,2 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo conteniendo 1,4 ml de NaOH 1M y se midió la absorbancia a 440 nm a través de una celda de 1 cm de paso. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco agregando TCA en primer término.

La unidad de actividad enzimática (Uazocas) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 440 nm por min en las condiciones de ensayo.

3.5.2. Sustratos Sintéticos

3.5.2.1. *N- α -carboboixi-p-nitrofenil Ésteres de Aminoácidos*

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.

La actividad de las proteasas sobre N- α -carboboixi-aa-p-nitrofenil ésteres fue ensayada sobre los derivados de los siguientes aminoácidos: Ala, Asn, β -bencil-L-Asp, Gln, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr y Val.

La mezcla de reacción fue preparada con 1,8 ml de buffer fosfatos 0,1 M de pH 8,0 conteniendo cisteína 25 mM, 100 μ l de solución de sustrato (1 mM en acetonitrilo) y 100 μ l de solución de enzima. La reacción se llevó a cabo a 37 °C y los cambios de absorbancia se midieron a 405 nm durante 3 min. En este caso una unidad enzimática (U_{cbz}) fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto a 37 °C y pH 8,0.

Hidrólisis del sustrato	
Sustrato 1 mM	0,1 ml (conc final 50 μ M)
Buffer fosfatos 0,1M de pH 8,0	1,8 ml
Muestra	100 μ l
Tiempo	Cada 10 s hasta 3 min

Blanco (hidrólisis no enzimática)	
Buffer fosfatos 0,1M de pH 8,0	1,8 ml
Acetonitrilo	0,1 ml
Sustrato 1 mM	0,1 ml
Tiempo	Cada 10 s hasta 3 min

3.5.3. *Ensayo de Actividad Carboxipeptidásica A y B y de Actividad Inhibitoria de Carboxipeptidasa A*

Para el ensayo de actividad carboxipeptidásica de carboxipeptidasa A se añadieron de 10 a 20 μ l del extractivo parcialmente purificado a una cubeta de 1 cm de paso óptico conteniendo 1,5 ml de disolución de sustrato (N-benzoíl-L-

glicil-L-fenilalanina [hipuril-L-fenilalanina] 1 mM disuelto en buffer Tris-HCl de pH 7,5) y se registró la variación (incremento) de absorbancia a 254 nm durante 2 min.

Para el ensayo de actividad carboxipeptidásica de carboxipeptidasa B se añadieron de 10 a 20 μ l del extracto parcialmente purificado (1-3 μ g de enzima) a una cubeta de 1 cm de paso óptico conteniendo 1,5 ml de disolución de sustrato (N-benzoil-L-glicil-L-arginina [hipuril-L-arginina] 1 mM disuelto en buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,1 M de pH 7,5) 25 mM, NaCl 0,5 M y se registró la variación (incremento) de absorbancia a 254 nm durante 2 min. Luego se comparó la velocidad de reacción con un ensayo en blanco donde se reemplazaron los 20 μ l de muestra por igual volumen de buffer.

Para el ensayo de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A se añadieron 20 μ l del extracto parcialmente purificado conteniendo 5 a 15 μ g de enzima y 10 μ l de carboxipeptidasa A a una cubeta de 1 cm de paso óptico conteniendo 1,5 ml de disolución de sustrato (N-benzoil-L-glicil-L-fenilalanina [hipuril-L-fenilalanina] 1 mM disuelto en buffer Tris-HCl 25 mM, NaCl 0,5 M de pH 7,5) y se registró la variación (incremento) de absorbancia a 254 nm durante 2 min. Luego se comparó la velocidad de reacción con un ensayo en blanco donde se reemplazaron los 20 μ l de muestra por igual volumen de buffer.

3.5.4. Hidrólisis de N-CBZ-Ala-p-nitrofenilésteres

Las medidas fueron realizadas en las condiciones ya establecidas, pero trabajando a distintas concentraciones del sustrato derivado de Ala (máxima velocidad relativa). Se utilizaron nueve concentraciones del sustrato en el rango 1-50 mM.

3.5.5. Conservación a Bajas Temperaturas

Dado lo reducido del período en el que los frutos alcanzan el grado de madurez óptimo para la producción de proteasas, el almacenamiento del material en estudio es un aspecto crítico ya que si se conservan las frutas congeladas el proceso de congelación y descongelación provoca la desorganización de los tejidos y estructuras intracelulares, con la consiguiente disminución de actividad proteolítica por dilución y/o inactivación de las

proteasas. En consecuencia se establecieron dos tipos distintos de determinaciones sobre los extractivos obtenidos a partir de los frutos, según se indicó en 3.3.2.

3.5.5.1. Efecto de la congelación-descongelación

Extractos parcialmente purificados de *Bromelia balansae* se dividieron en 6 alícuotas de 2 ml. La mitad se mantuvo en baño de hielo y el resto se congeló a -20 °C durante 30 min. Las muestras congeladas se descongelaron en baño a 40 °C con rotación permanente de modo que en el interior del recipiente la temperatura se mantuvo a valores menores a 10 °C. Las muestras descongeladas se colocaron en baño de hielo y se determinó su actividad proteolítica residual según protocolo 3.5.1.1 junto a las muestras que no fueron descongeladas. El ensayo se realizó por duplicado.

3.5.5.2. Efecto del tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas

Extractos parcialmente purificados de *Bromelia balansae* se conservaron congelados a -20 °C en alícuotas de 5 ml. Luego de transcurridos 5, 7, 15, 20, 25, 30, 35, 60 y 180 días fueron descongeladas dos muestras correspondientes a cada tiempo de conservación, determinándose la actividad residual en cada caso, como se indicó en 3.5.1.1.

3.5.6. Efecto de la Liofilización Sobre la Actividad Proteolítica

Se ensayó el efecto de la liofilización sobre la actividad caseinolítica de los extractivos parcialmente purificados. Alícuotas de 2 ml de dichas preparaciones fueron colocadas en frascos y congeladas por rotación de los mismos dentro de un recipiente conteniendo aire líquido, con lo que se obtiene una película delgada, lo que reduce el tiempo de congelación y facilita el proceso de liofilización. La liofilización fue llevada a cabo en un equipo Heto Holten A/S Drywinner 3. Algunas muestras congeladas no fueron liofilizadas, a efectos de ser utilizadas como control del experimento. A continuación se determinó la actividad caseinolítica tanto en las muestras liofilizadas como en los controles, tal como se indica en 3.5.1.1. Además se realizó un seguimiento de la actividad de los liofilizados a lo largo de un año de conservación a 4 °C. El experimento se realizó por triplicado.

3.5.7. Efecto de Modificadores de la Actividad

3.5.7.1. *Determinación de la concentración óptima de activador*

Para establecer la concentración de cisteína que permita a la enzima manifestar la máxima actividad, se preincubó la misma durante 30 min en baño de hielo con distintas concentraciones de cisteína (0; 7,5; 12,5; 17,5; 25 y 50 mM). La actividad proteolítica fue determinada incorporando la enzima preincubada al sustrato (solución al 1% de caseína en buffer fosfatos 0,1 M de pH 8,0 conteniendo cisteína en la misma concentración que en la preincubación) y siguiendo el protocolo descrito en 3.5.1.1. El pH de cada solución de caseína fue ajustado a pH 8,0 luego del agregado de la correspondiente cantidad de cisteína.

3.5.7.2. *Efecto de inhibidores específicos de grupo sobre la actividad enzimática*

Con el objeto de determinar a qué grupo pertenece la proteasa en estudio según los tipos mecanísticos propuestos por Barrett y Rawlings (1991), las preparaciones enzimáticas fueron incubadas durante 30 min a 37 °C con inhibidores específicos para peptidasas serínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas (Salvesen & Nagase, 2001). Los inhibidores empleados fueron PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1, 5 y 10 mM); E-64 (n-[n-[1-hidroxicarboxietil-carbonil]leucilamino-butil]-guanidina) 0,1; 1 y 10 mM; ácido iodoacético 0,1; 0,5 y 1 mM; cloruro mercúrico 5, 10 y 20 mM; pepstatina A (ácido isovaleril-Val-Val-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoil-Ala-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico) 0,5; 1 y 10 mM y 1,10-fenantrolina 1 y 10 mM, respectivamente.

Se realizaron controles negativos por preincubación de la preparación de proteasa con los solventes usados para disolver cada inhibidor. Finalizada la incubación, se determinó en todos los casos la actividad caseinolítica residual a tres valores de pH (3, 6 y 9) sobre caseína según el protocolo 3.5.1.1, con la excepción del ensayo con 1,10-fenantrolina, en el que se utilizó azocaseína como sustrato según el protocolo descrito en 3.5.1.2. En ningún caso se añadió cisteína a la mezcla de reacción.

3.5.7.3. Efecto de la cisteína sobre la capacidad inhibitoria de PMSF y Cl_2Hg_2

Para estudiar el efecto de la cisteína sobre la inhibición producida por PMSF y Cl_2Hg_2 en extractos parcialmente purificados de frutos maduros e inmaduros, se procedió a repetir el ensayo descrito en 3.5.7.2 agregando luego de la inhibición este activador en concentración 25 mM incubando la enzima durante 10 min a temperatura ambiente y midiendo luego la actividad proteolítica remanente como se indica en 3.5.1.1.

3.5.8. Efecto del pH Sobre la Actividad Proteolítica

Para obtener el perfil de pH se utilizó una solución de caseína al 1 % con cisteína 25 mM como sustrato, ajustando al pH deseado con NaOH o HCl 40 mM una solución concentrada de caseína (al 2 % con cisteína 50 mM) en sales de sodio 40 mM de los siguientes buffers: MES, MOPS, TAPS, AMPSO y CAPS (Good e Izawa, 1972) y llevándolas al doble de su volumen inicial con agua destilada. La actividad fue determinada como se indicó en 3.5.1.1.

3.5.9. Efecto de la Fuerza Iónica Sobre la Actividad Proteolítica

Si bien la actividad de la mayoría de las enzimas es poco afectada a valores bajos de fuerza iónica, la misma suele disminuir cuando la concentración de sal se incrementa por encima de 0,2 M (Scopes, 1984). Para conocer el comportamiento de balansaína en este sentido, se incubaron muestras de enzima a diferentes valores de fuerza iónica (0; 62,5; 125; 250; 500 y 1000 mM) durante 30 min a temperatura ambiente y luego se ensayó la actividad residual a 37 °C empleando caseína conteniendo NaCl en la misma concentración que en la incubación previa.

3.5.10. 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, 5, 10, 20, 40, 60, 90 y 120 min a 20, 37, 45, 55, 65 y 75 °C, a pH 8,5. Finalizado el período de incubación, las muestras fueron mantenidas en un baño de hielo hasta que se

midió la actividad caseinolítica residual en la forma indicada anteriormente (3.5.1.1).

3.6. ELECTROFORESIS

3.6.1. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida Desnaturalizantes con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE según Laemmli, 1970, con modificaciones)

3.6.1.1. Tratamiento de las muestras

Las muestras fueron preparadas agregando un volumen de buffer de muestra para electroforesis a un volumen de muestra. Para muestras con bajo contenido proteico, se procedió a concentrar la muestra por precipitación con tres volúmenes de acetona fría (-20 °C) y los precipitados se redisolieron en un volumen de buffer de muestra adecuado, de modo tal que la concentración final fuese de 5 µg/ml. Para el caso de muestras con actividad enzimática se agregó ácido iodoacético 5 mM para evitar autodegradación. En el caso de proteínas lácteas se procedió a agregar al volumen de muestra un volumen de buffer de muestra dos veces concentrado (2X), cuya composición se indica en la siguiente tabla:

Buffer de muestra	
Tris	1,57 g
SDS	24 g
Mercaptoetanol	10 ml
Glicerol al 10%	16 ml
Azul de bromofenol	4 mg
<i>Llevar a pH 6,8 con HCl 1 N</i>	
AD1, c.s.p.2	100 ml

Las muestras así dispuestas fueron llevadas a ebullición durante 5 min y centrifugadas a 16.000 g. Los sobrenadantes obtenidos se conservaron en freezer a -20 °C hasta su posterior uso.

1 AD: Agua Destilada

2 c.s.p.: cantidad suficiente para

3.6.1.2. Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). La composición de los sistemas buffer empleados así como la de los geles se indican a continuación en forma de tablas:

Buffer del gel de resolución	
Tris	36,3 g
HCl 1M	48 ml
AD, c.s.p.	100 ml
pH final	8,8

Buffer del gel de apilamiento	
Tris	36,3 g
HCl 1M	48 ml
AD, c.s.p.	100 ml
pH final	8,8

Gel de resolución (12,5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	4,15 ml
Buffer de resolución	1,25 ml
SDS3 al 10%	0,1 ml
AD	4,39 ml
PSA ⁴ al 5%	105 µl
<i>Desairear</i>	
TEMED5	5 µl
Volumen final	10 ml

Gel de Apilamiento (5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	1,16 ml
Buffer stock de stacking	0,87 ml
SDS al 10%	70 µl
AD	4,79 ml
PSA al 5%	105 µl
<i>Desairear</i>	
TEMED	5 µl
Volumen final	7 ml

En primer lugar se colocaron 5 ml del gel de resolución en cada placa y se dejaron polimerizar sin mover el formador de geles. Sobre la mezcla del gel de resolución se colocaron con jeringa Hamilton 100 µl de n-butanol para alinear su superficie y facilitar la visualización de la polimerización. Luego de la polimerización se retiró el alcohol, se lavó la superficie con agua y se eliminó

3 SDS: Dodecil sulfato de sodio

4 PSA: Persulfato de Amonio

5 TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina

el exceso de agua con papel de filtro doblado. A continuación se colocaron con pipeta X ml de la solución del gel de apilamiento y de inmediato los peines.

3.6.1.3. Aplicación de las muestras

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton de 25 μ l de capacidad. Los volúmenes de siembra fueron de 5 μ l para los patrones de peso molecular. En el caso de las muestras, se calculó el volumen necesario para sembrar de 10 a 20 μ g de proteína por calle (volumen máximo 20 μ l). Los patrones de PM (Bio-Rad) utilizados fueron: 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).

3.6.1.4. Condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló en una celda Miniprotean III (Bio-Rad), a una intensidad de corriente constante de 30 mA durante el apilado (stacking) y de 60 mA hasta la finalización de la corrida (llegada del colorante al borde inferior del gel) El buffer de reservorio, cuya composición se indica en la siguiente tabla, se colocó en los reservorios catódico (hasta cubrir la parte superior del gel) y anódico (hasta cubrir la mitad del gel).

Buffer de reservorio (10 X)	
Tris	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
AD, c.s.p.	100 ml

3.6.1.5. Fijación, coloración y decoloración

Finalizada la electroforesis, los geles se fijaron y tiñeron por inmersión en solución colorante de Coomassie Brilliant Blue R-250 durante 30 min a 40-50 °C según el protocolo de Wu & Welsh (1996).

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
<i>(la solución se filtra antes de usar)</i>	

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
<i>(la solución se filtra antes de usar)</i>	

Solución decolorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	25 ml
AD, c.s.p.	100 ml

3.6.2. Electroforesis Desnaturalizante en Gradiente de Poliacrilamida

3.6.2.1. Preparación de las muestras

Las muestras fueron preparadas según el protocolo desarrollado en 3.6.1.1.

3.6.2.2. Preparación de los geles

Los gradientes de poliacrilamida (Hames, 1990) se obtuvieron mezclando cantidades iguales (2,2 ml) de las dos soluciones de poliacrilamida que definen los extremos del gradiente, utilizando para ello un formador de gradientes (modelo 385, Bio-Rad) colocado sobre un agitador y adosado al mismo una bomba peristáltica (modelo P-1, Pharmacia). En los geles resultantes (7,3 cm x 8 cm x 0,75 mm) la concentración de poliacrilamida se incrementa en forma lineal desde la zona de siembra hacia el fondo de la placa.

Las soluciones de poliacrilamida utilizadas para la obtención de los geles en gradiente se prepararon de acuerdo a las fórmulas que se indican a continuación (las cantidades consignadas son las necesarias para preparar dos placas).

Solución A	
Sacarosa	0,9 g
Buffer de resolución (BTC6 M pH 8,8)	0,75 ml
AD	1 ml

Gel de resolución	5 %	20 %
Acril-Bis (30:0,8)	1 ml	4 ml
Buffer de resolución (BTC 3 M pH 8,8)	0,75 ml	---
Solución A	-----	2 ml
AD	4,25 ml	-----
<i>Tomar 2,7 ml y agregar:</i>		
TEMED	5 μ l	5 μ l
PSA al 5%	12 μ l	12 μ l

3.6.2.3. Aplicación de las muestras

Las muestras fueron aplicadas según el protocolo desarrollado en 3.6.1.3.

3.6.2.4. Condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad) durante 80 min a corriente constante (40 mA), empleando el siguiente buffer de reservorio (Hashimoto *et al.*, 1983), de pH 8,5:

Buffer de reservorio	
Tris	0,05 M
Glicina	0,384 M
SDS	0,1 %

3.6.2.5. Fijación, coloración y revelado

La fijación y decoloración de los geles se realizaron según el protocolo desarrollado en 3.6.1.5.

3.6.3. Electroforesis en Geles con Tricina Desnaturalizante y Reductores (SDS-Tricine-PAGE)

Esta técnica de electroforesis permite una mejor resolución de péptidos de bajo peso molecular (PM). Es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina (Laemmli, 1970). Una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango entre 5 y 20 kDa, se logra sin la necesidad del uso de urea (Schägger & von Jagow, 1987). Las proteínas mayores a 30 kDa son desapiladas dentro del gel. Así se garantiza un pasaje suave de estas

proteínas al gel de separación y los efectos de carga excesiva están reducidos. Esto es de especial importancia cuando grandes cantidades de alguna proteína se siembran en los geles preparativos. Otra ventaja, si se desea emplear el sistema como purificación previa al microsecuenciamiento, es que la omisión de glicina y urea previene interferencias que ocurrirían en el curso del mencionado procedimiento.

3.6.3.1. Preparación de las muestras

Las muestras fueron preparadas según el protocolo desarrollado en 3.6.1.1.

3.6.3.2. Preparación de los geles

Se utilizó el sistema para la resolución de muestras en el rango 5-100 kDa, el cual posee valores característicos de los parámetros de Tjerten %T7 y %C8 (10 % T y 3 % C para los geles de resolución y 4 % T y 3 % C para los geles de apilamiento).

Buffer del Gel	
Tris	36,3g
SDS	0,3 g
HCl 1 M, c.s.p.	pH 8,45
AD c.s.p.	100 ml

Reactivos	Gel de Apilamiento (4%T, 3%C)	Gel Espaciador (10%T, 3%C)
Acril-Bis (48 : 1,5)	0,4 ml	2 ml
Buffer del gel	1,25 ml	3,3 ml
AD	3,4 ml	4,7 ml
Volumen total	5 ml	10 ml
<i>Polimerización</i>		
PSA 10%	40 µl	40 µl
TEMED	5 µl	5 µl

3.6.3.3. Aplicación de las muestras

Las muestras fueron aplicadas según el protocolo desarrollado en 3.6.1.3.

$$7 \% T = (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida}) \times 100 / \text{volumen total}$$

$$8 \% C = g \text{ bis-acrilamida} \times 100 / (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida})$$

3.6.3.4. Condiciones de corrida

Todas las corridas se realizaron a voltaje constante de (30 V/ 70 mA) durante el apilado, aumentando progresivamente el voltaje cada 10 seg 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.

Buffer Anódico	
Tris	2,42 g
HCl 1 M, c.s.p.	pH 8,9
AD, c.s.p.	100 ml

Buffer Catódico	
Tris 0,1M	1,21 g
Tricina 0,1M	1,79 g
SDS	0,1 g
AD, c.s.p.	100 ml

3.6.3.5. Fijación, coloración y decoloración

Inmediatamente después de la corrida, el gel se sumergió durante 30 min en una solución fijadora de la siguiente composición:

Solución fijadora	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	50 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Luego de la fijación, los geles se tiñeron por inmersión en la siguiente solución colorante durante 30 min a 40-50 °C según el protocolo de Wu & Welsh (1996):

Solución fijadora y colorante	
Acido acético glacial	10 ml
Serva Blue G	100 mg
AD, c.s.p.	100 ml
<i>(la solución se filtra antes de usar)</i>	

Solución decolorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	25 ml
AD, c.s.p.	100 ml

3.6.4. Electroforesis en Geles con Tricina de Alta Resolución (SDS-Tricine-PAGE, AR)

Para optimizar la separación de péptidos en el rango de 5 a 20 kDa se trabajó con geles de tricina de alta resolución compuestos por un gel de apilamiento (4 % T y 3 % C), un gel espaciador (10 % T y 3 % C) y un gel de resolución (16,5 % T y 6 % C).

3.6.4.1. Preparación de las muestras

Las muestras fueron preparadas según el protocolo desarrollado en 3.6.1.1.

3.6.4.2. Preparación de los geles

Se utilizaron dos sistemas para la resolución de muestras en distintos rangos de peso molecular:

1. Para la separación en el rango 5-70 kDa: Gel Separador (16 %T, 3 %C), Gel Espaciador (10 %T, 3 %C) y Gel de Apilamiento (4 %T, 3 %C). El gel espaciador se omite en el caso de que la resolución de proteínas de PM menor a 5 kDa no sea importante.

2. Para la separación en el rango 5-20 kDa: Gel Separador (16,5 %T, 6 %C), Gel Espaciador (10 %T, 3 %C) y Gel de Apilamiento (4 %T, 3 %C), con o sin urea 6 M. El gel espaciador se omite en el caso de que la resolución de proteínas de PM menor a 5 kDa no sea importante.

Buffer del Gel	
Tris	36,3 g
HCl 1M, c.s.p.	pH 8,45
SDS	0,3 g
AD, c.s.p.	100 ml

Reactivos	Gel Apilador 4%T, 3%C	Gel Espaciador 10%T, 3%C	Geles de Resolución			
			10%T, 3%C	16,5%T, 3%C	16,5%T, 6%C	16,5%T, 6%C + urea 6M
Acril-Bis (48:1,5)	0,4 ml	2 ml	2 ml	3,3 ml	-	-
Acril-Bis (46,5:3)	-	-	-	-	3,3 ml	3,3 ml
Buffer del Gel	1,25 ml	3,3 ml	3,3 ml	3,3 ml	3,3 ml	3,3 ml
AD	3,4 ml	4,7 ml	4,7 ml	4,7 ml	4,7 ml	4,7 ml
PSA 10%	40 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<i>Desairear y agregar:</i>						
TEMED	4 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

3.6.4.3. Aplicación de las muestras

Las muestras fueron aplicadas según el protocolo desarrollado en 3.6.1.3.

3.6.4.4. Condiciones de corrida

Todas las corridas se realizaron según el protocolo desarrollado en 3.6.3.4.

3.6.4.5. Fijación, coloración y decoloración

Inmediatamente después de la corrida, el gel se sumergió durante 30 min en una solución fijadora de la siguiente composición:

Solución fijadora	
Acido acético glacial	100 ml
Metanol	400 ml
AD, c.s.p.	500 ml

Luego de la fijación, los geles se tiñeron por inmersión en la siguiente solución colorante durante 30 min a 40-50 °C según el protocolo de Wu & Welsh (1996):

Solución colorante	
Acido acético glacial	10 ml
Coomassie Blue G-250	25 mg
AD, c.s.p.	100 ml
<i>(la solución se filtra antes de usar)</i>	

Solución decolorante	
Acido acético glacial	10 ml
AD, c.s.p.	100 ml

3.6.5. Electroforesis en Condiciones Desnaturalizantes con Urea (Urea-PAGE).

Para el análisis de proteínas lácteas y sus hidrolizados parciales se empleó el método de Andrews (1983) modificado por Shalabi & Fox (1987).

3.6.5.1. Preparación de las muestras

Las muestras consistieron en hidrolizados de caseínas de origen bovino. En el caso de muestras precipitadas con TCA, se resuspendieron en buffer de muestra 1X a una concentración final aproximada de 5 μg proteína/ml y se centrifugaron 10 min a 9000 rpm. Para muestras líquidas (sin precipitar) a 0,75 ml de muestra se le agregaron 0,75 ml de buffer de muestra dos veces concentrado.

A todas las muestras se les agregó 0,2 ml de β -mercaptoetanol/ml de buffer de muestra en el momento de la disolución.

Buffer de muestra (1X)	
Tris	0,75 g
Urea	48 g
Glicina	NO
Azul de bromofenol	2 mg
HCl 1N	Hasta pH 7,6
AD, c.s.p.	100 ml

3.6.5.2. Preparación de los geles

Los geles fueron preparados según la siguiente composición:

	Buffer de Separación	Buffer de Apilamiento
Tris	8 g	1,5 g
Urea	52 g	52 g
HCl 1N	Hasta pH 8,9	Hasta pH 7,6
AD, c.s.p.	200 ml	200 ml

	Gel de Separación (12,5%T - 4%C)	Gel de Apilamiento (4,2% T - 5%C)
Acril-Bis (32,4: 2,7)	3,7 ml	-
Acril -Bis (20:1)	-	1,4 ml
Buffer de Separación	1,1 ml	-
Buffer de Apilamiento	-	0,87 ml
Urea, 9 M	4,7 ml	3,35 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l
PSA 10%	50 μ l	50 μ l

3.6.5.3. Aplicación de las muestras

Las muestras fueron aplicadas según el protocolo desarrollado en 3.6.1.3.

3.6.5.4. Condiciones de corrida

Todas las corridas se realizaron a 280 V constante durante el apilado y a 300 V durante la corrida.

Buffer de Reservorio (10X)	
Tris	3 g
Glicina	14,6 g
AD, c.s.p.	100ml

3.6.5.5. Fijación, coloración y decoloración

Inmediatamente después de la corrida, el gel se sumergió durante 30 min en una solución fijadora de la siguiente composición:

Solución fijadora	
Acido acético glacial	100 ml
Metanol	400 ml
AD, c.s.p.	500 ml

Luego de la fijación, los geles se tiñeron por inmersión en la siguiente solución colorante durante 30 min a 40-50 °C según el protocolo de Wu & Welsh (1996):

Solución colorante	
Acido acético glacial	10 ml
Coomassie Blue G-250	25 mg
AD, c.s.p.	100 ml
<i>filtrar antes de usar</i>	

Solución decolorante	
Acido acético glacial	10 ml
AD, c.s.p.	100 ml

3.6.6. Electroforesis en Gradiente de pH: Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) es un método de alta resolución en el cual las proteínas son separadas en un gradiente continuo de pH cuando se aplica un campo eléctrico. En este gradiente las proteínas migran hasta llegar al pH correspondiente a su punto isoeléctrico (pI). Permite resolver muestras muy complejas y determinar varios pI en una misma corrida, permitiendo tanto trabajos analíticos como preparativos.

3.6.6.1. Tratamiento de las muestras

Dado que las muestras deben tener una concentración de proteínas cercana a $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y presentar una fuerza iónica reducida, se procedió a precipitarlas con 3 volúmenes de acetona fría ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), dejándolas reposar durante 20 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para luego centrifugarlas a 10.000 rpm durante 15 min, redisolviendo el precipitado en agua bidestilada (en el caso de muestras con bajo contenido proteico el volumen final se redujo respecto al inicial de modo de lograr una concentración adecuada). Este procedimiento se repitió dos veces para disminuir al mínimo la presencia de iones en las muestras dado que éstas producen distorsiones en las corridas.

En el caso de muestras con actividad enzimática se agregó ácido iodoacético 5 mM para evitar autodegradación, excepto en aquellos casos en los que se necesitó determinar la presencia de actividad proteolítica mediante un zimograma. Las muestras listas para usar fueron conservadas en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de ser sometidas a IEF.

3.6.6.2. Preparación de los geles

Se utilizó un equipo Mini IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). Los geles fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo, pudiendo prepararse dos placas simultáneamente. Para ello se adhirió firmemente la cara hidrofílica de la película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre el vidrio y el conjunto se invirtió sobre la

bandeja. Para obtener dos geles es necesario contar con una solución preparada de la siguiente manera:

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

La solución de poliacrilamida se desgasificó en un kitasato conectado a una bomba de vacío durante 20 min y luego se le adicionaron los siguientes reactivos para iniciar la polimerización:

Reactivos de polimerización	
Riboflavina (sol. Saturada)	200 μ l
TEMED	3 μ l
PSA al 10%	60 μ l

La mezcla fue depositada con pipeta entre el plato de vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo tapado e inmóvil durante 2 h a temperatura ambiente y en presencia de luz para obtener la polimerización total. Al cabo de ese tiempo, los geles se removieron cuidadosamente con ayuda de una espátula delgada.

3.6.6.3. Aplicación de las muestras

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 1-5 μ l y 7 siembras por placa como máximo) permitiendo que difundan dentro del gel durante 5 min antes de iniciar el IEF.

3.6.6.4. Condiciones de corrida

Los geles se depositaron sobre los electrodos de grafito (previamente humedecidos) de la celda de IEF, con la cara del gel sembrado hacia abajo. La celda se cerró herméticamente y se conectó a la fuente de poder.

El enfoque se llevó a cabo en tres etapas, a voltaje constante:

100 V durante los primeros 15 min, 200 V durante los siguientes 15 min y 450 V durante los 60 min finales.

3.6.6.5. Fijación, coloración y decoloración

Una vez finalizada la corrida, los geles se separaron de las placas de vidrio y fueron sumergidos durante 30 min en la siguiente solución fijadora:

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

Finalizada la etapa anterior, los geles se trataron durante 2 h con la solución colorante y luego fueron decolorados por tres lavados sucesivos con solución decolorante I, seguidos de un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro.

Solución colorante	
CuSO ₄ (disolver primero en agua)	500 mg
Acido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	40 mg
AD, c.s.p.	100 ml

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

Solución decolorante II	
Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
AD c.s.p.	100 ml

3.6.6.6. Estimación de los puntos isoeléctricos

Para la determinación de los puntos isoeléctricos (pI) de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar una mezcla de proteínas de amplio rango de pI (Broad pI kit, Pharmacia).

Proteína	Banda	pI
Amiloglucosidasa	1	3,50
Inhibidor de Tripsina	2	4,55
β -Lactoglobulina A	3	5,20
Anhidrasa carbónica B (bovina)	4	5,85
Anhidrasa carbónica B (humana)	5	6,55
Mioglobina (banda ácida)	6	6,85
Mioglobina (banda básica)	7	7,35
Lentil lectina (ácida)	8	8,15
Lentil lectina (media)	9	8,45
Lentil lectina (básica)	10	8,65
Tripsinógeno	11	9,30

La determinación de los valores de pI se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por la especie proteica de interés, tomando como referencia la posición del cátodo.

3.6.7. Otros Sistemas de Detección de Proteínas y Enzimas no Citadas Precedentemente

3.6.7.1. Tinción de proteínas con plata en geles de poliacrilamida

Se utilizó la técnica de Blum *et al.* (1987), basada en dos propiedades químicas del tiosulfato: mejoramiento de la imagen por pretratamiento de los geles y formación de complejos solubles de plata que eliminan el color de fondo (“background”) inespecífico (precipitación de sales insolubles de plata) durante el desarrollo de la imagen, lográndose una sensibilidad del orden de los nanogramos.

3.6.7.1.1. Preparación de los geles: fijación

Los geles provenientes de las electroforesis se fijaron durante toda la noche para prevenir la difusión de las proteínas y remover sustancias interferentes. En el caso de geles previamente teñidos con Coomassie Blue, esta operación fue omitida.

Solución Fijadora	
Metanol	50 ml
Acido Acético glacial	12 ml
Formaldehido 37 %	50 μ l
ABD c.s.p.	100 ml

3.6.7.1.2. Lavado y pretratamiento de los geles

Luego de fijados, los geles se lavaron 3 veces durante 20 min cada vez con la solución de lavado indicada debajo con el fin de remover el ácido acético cuya acidez interfiere en la etapa de tratamiento con tiosulfato.

Solución de Lavado	
Etanol	30 ml
ABD	70 ml

Luego de este lavado, los geles se sumergieron en solución de pretratamiento durante un min exacto, que produce un mejoramiento de la imagen y un mayor contraste. Luego de realizado el pretratamiento con tiosulfato de sodio, los geles se lavaron otras tres veces con agua bidestilada durante 20 seg cada vez para remover el exceso de tiosulfato, el que podría formar una capa de sulfuro de plata sobre la superficie del gel.

Solución de Pretratamiento	
$S_2O_3Na_2 \cdot 5 H_2O$	0,03 g
ABD c.s.p.	150 ml

3.6.7.1.3. Tratamiento con plata

Los geles pretratados fueron sumergidos durante 20 min en una solución de plata. El formaldehído de esta solución, además de favorecer el entrecruzamiento (“crosslinking”), aumenta la sensibilidad y el contraste sin aumento del background.

Solución de Plata	
Ag NO ₃	0,2 g
Formaldehído 37 %	75 µl
ABD c.s.p.	100 ml

Luego los geles fueron lavados dos veces con agua bidestilada (20 seg por vez) para remover el AgNO₃ en exceso.

3.6.7.1.4. Revelado

Los geles se sumergieron en solución de desarrollo hasta que no aparecieron más bandas, evitando la sobrecoloración del gel (visualización de precipitado marrón de AgS por consumo de tiosulfato libre). La velocidad de revelado depende del tipo y concentración de las proteínas y del grado de entrecruzamiento del gel: entre 30 seg para bandas con un contenido proteico total de 500 ng y 2 min para bandas con contenidos menores a 50 ng.

Solución de Desarrollo	
Na ₂ CO ₃	6 g
Solución de Pretratamiento	1 ml
Formaldehído 37 %	50 µl
ABD c.s.p.	100 ml

Finalizado el desarrollo, la reacción se detuvo sumergiendo los geles en solución de stopping durante 10 min.

Solución de Stopping	
Metanol	10 ml
Acido acético glacial	12 ml
ABD c.s.p.	100 ml

3.6.7.2. Tinción de glicoproteínas en geles de poliacrilamida

Se empleó el método desarrollado por Fairbanks *et al.* (1971), modificado luego por Dubray & Bezard (1982).

3.6.7.2.1. Fijación

Los geles provenientes de las electroforesis se fijaron durante toda la noche en la siguiente solución.

Solución Fijadora	
Isopropanol	25 ml
Acido acético glacial	10 ml
ABD c.s.p.	100 ml

3.6.7.2.2. Lavado y pretratamiento de los geles

Luego de la fijación los geles fueron lavados por inmersión en una solución de ácido acético al 7,5 % durante 30 min. Posteriormente, los geles

fueron tratados con una solución oxidante de ácido periódico al 0,2 % durante a 1 h a 4 °C.

3.6.7.2.3. Tratamiento con solución de Schiff

Los geles fueron sumergidos en la correspondiente solución de Schiff durante a 1 h a 4 °C.

Reactivo de Schiff	
Fucsina Básica	2,5 g en 500 ml de AD
Metabisulfito de Na	5 g
HCl 1N	50 ml
<i>Dejar 24hs en la oscuridad</i>	
Carbón activado (activarlo a 180°C en estufa)	4 g
<i>Filtrar y guardar en frasco color caramelo</i>	

3.6.7.2.4. Decoloración y revelado de los geles

Se eliminó el colorante excedente por sucesivos lavados en solución de ácido acético al 7,5 % a temperatura ambiente, utilizando luego una solución de Coomassie Blue como contracolorante.

3.6.7.3. Tinción de glicoproteínas en geles de PAA con ácido periódico y tratamiento con plata

La técnica fue desarrollada por Oakley *et al.* (1980) y luego modificada por Dubray & Bezard (1982). Esta técnica es 65 veces más sensible que la tinción con ácido periódico-Schiff, con un límite inferior de detección de 0,4 ng y evita el uso del glutaraldehído como agente de entrecruzamiento entre las proteínas y entre las proteínas y el gel. La oxidación con ácido periódico produce funciones aldehído que pueden ser reveladas por tinción con plata, de modo que se revelen sólo los grupos 1,2-diol de los polisacáridos. Puede utilizarse luego otra tinción como contracolorante para el resto de las proteínas.

3.6.7.3.1. Preparación de los geles: fijación

Los geles provenientes de las electroforesis se fijaron durante toda la noche en la siguiente solución:

Solución Fijadora	
Isopropanol	25 ml
Acido acético glacial	10 ml
ABD c.s.p.	100 ml

3.6.7.3.2. Lavado y pretratamiento de los geles

Luego de la fijación, los geles fueron lavados por inmersión en una solución de ácido acético al 7,5 % durante 30 min. Posteriormente, los geles fueron tratados con una solución oxidante de ácido periódico al 0,2 % durante a 1 h a 4 °C y luego lavados por sucesivos cambios de agua bidestilada, durante 3 h.

3.6.7.3.3. Tratamiento con solución de plata

Los geles lavados fueron sumergidos en solución fresca de plata amoniacal por no más de 15 min (para evitar la deposición de plata en el gel).

Solución de Plata Amoniacal	
NaOH al 0,36 %	21 ml
NH ₄ OH	1,4 ml
Ag NO ₃ al 19,4%	4 ml
<i>Agregar el nitrato de plata lentamente y agitando</i>	
ABD c.s.p.	100 ml

3.6.7.3.4. Lavado y revelado de los geles

Los geles fueron lavados dos veces con agua bidestilada y luego sumergidos en solución de revelado a temperatura ambiente.

Solución de Revelado	
Acido Citrico	0,05 g
Metanol	10 ml
Formaldehído	0,02 ml
2ABD c.s.p.	100 ml

Cuando la tinción se hizo visible, se detuvo la misma utilizando fijador fotográfico comercial. Los geles teñidos en exceso (con mucho color de fondo) pudieron ser clarificados sumergiéndolos en reductor fotográfico comercial y luego lavándolos con agua bidestilada.

3.6.7.4. Detección de la actividad proteolítica (zimograma)

Para la realización del zimograma se utilizó la técnica de Westergaar *et al.* (1980).

3.6.7.4.1. Preparación de las placas agarosa-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). Una vez polimerizada la agarosa, la placa fue sumergida en una solución de caseína al 1 % en el mismo buffer durante 20 min, enjuagada con agua destilada y escurrida durante 10 min.

3.6.7.4.2. Incubación

El gel de poliacrilamida fue dispuesto 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 50 °C durante 10 min.

3.6.7.4.3. Fijación y coloración

Una vez finalizado el período de incubación, los geles fueron separados y la placa de agarosa-caseína sumergida durante 60 min en la solución fijadora cuya composición se indica a continuación:

Solución fijadora	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	45 ml
AD c.s.p.	100 ml

Una vez fijadas las proteínas, 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. Luego fue secada con pistola de aire y sumergida durante 10-30 min en la siguiente solución colorante:

Solución colorante	
Coomassie Brilliant Blue R-250	250 mg
Solución fijadora c.s.p.	100 ml
<i>(filtrar la solución antes de usar)</i>	

La decoloración se realizó por inmersión de la placa de agarosa-caseína en solución fijadora durante 10 min y se secó durante 30 min con pistola de aire.

3.6.8. Tratamiento Analítico de Datos por Densitografía

3.6.8.1. Secado y almacenamiento de geles

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.

En el caso de los geles teñidos con plata, se trataron previamente con una solución de metanol al 30 % durante 30 min a 4 °C, seguido por otros 30 min en solución de glicerol al 3 %.

3.6.8.2. Captura y procesamiento preliminar de los datos

Para la digitalización y posterior procesamiento de los datos se trabajó con un Procesador Pentium II, de 128 MB de RAM, Disco rígido de 10 Gb, Placa de video con tarjeta de color de 24 bits, D-ROM, un dispositivo externo de almacenamiento de datos (unidad zip) y sistema operativo Windows 98.

Para la digitalización de los geles provenientes de las electroforesis, isoelectroenfoques y zimogramas, se utilizó un escáner UMAX con una velocidad de escaneo de 20 x 20 cm en 40 seg a 300 dpi, una resolución máxima de 2400 x 1200 dpi y un rango de densidad óptica de 0,01 a 3,4 DO (para imágenes de geles no mayor a 1,5 DO).

Para lograr reproducibilidad en la digitalización, el escáner se calibró por software (ya que el valor de los píxeles dependen de la intensidad de la fuente de luz), regulando el brillo y el contraste para que distintos geles

podrían ser escaneados de la misma forma. Los geles fueron escaneados a la mayor resolución posible (24 bits, 16,7 millones de colores y formato TIFF no comprimido) 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) y suavizado (smoothing) y Remoción de defectos de fondo (background) como se ejemplifica en la figura 3.4.

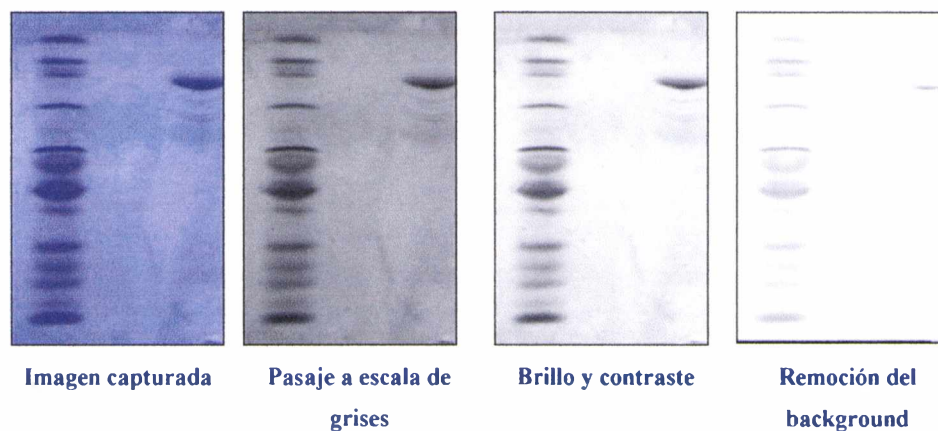


Figura 3.4. Procesos más comunes en el ajuste de una imagen.

3.6.8.3. Análisis de los datos por densitografía

Una vez que las imágenes escaneadas fueron procesadas, se utilizó un software especial (Scion Image, 1998); URL: <http://www.scioncorp.com>) para la medida automática de la intensidad de color de las bandas proteicas en el gel.

Este tipo de programas pueden medir variaciones monodimensionales en alguna señal específica como las bandas proteicas presentes en geles de electroforesis o de IEF, donde la imagen consiste en una serie de líneas cuyas posiciones y densidades son de interés. Estas densidades son determinadas por conversión a partir del brillo de los píxeles. El procedimiento requiere de la medida de estándares o patrones y se utiliza para determinar la abundancia relativa y la posición de cada banda en un gel.

Los pasos ejecutados para la obtención de los densitogramas se detallan en la figura 3.5. Los datos obtenidos a partir de estas medidas fueron utilizados para el análisis de parámetros tales como variación relativa del área de pico y distribución de cada banda proteica dentro del gel. El programa también se

utilizó para el cálculo del punto isoeléctrico (isoelectroenfoque) y del peso molecular (electroforesis) de cada banda.

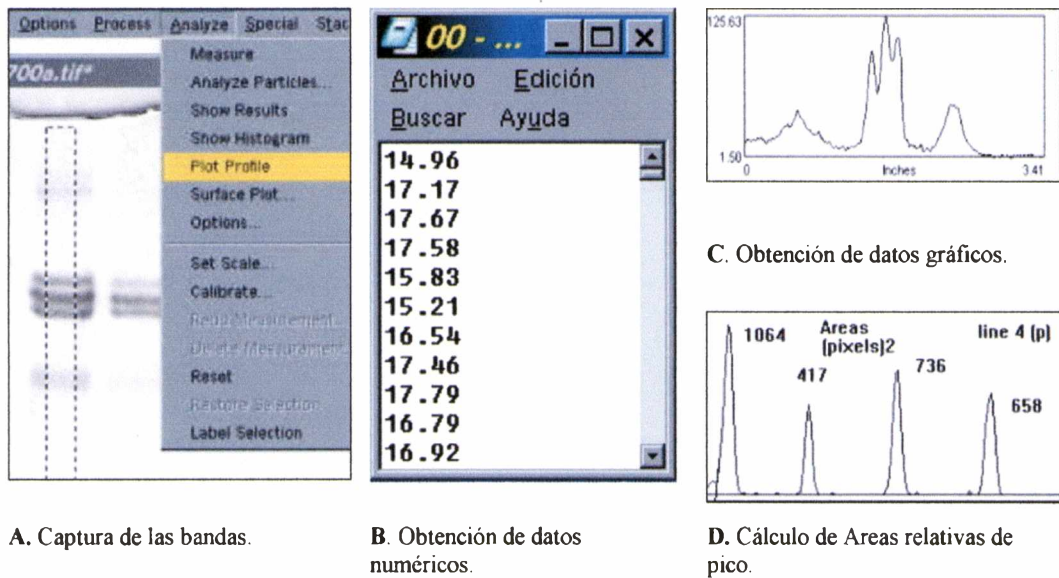


Fig. 3.5. Análisis de datos por densitografía.

3.7. HIDROLISIS CONTROLADA DE SUSTRATOS PROTEICOS

3.7.1. Determinación del Grado de Hidrólisis de Proteínas de Soja

Por este método se comparó el grado de hidrólisis producido por balansaína a distintos valores de pH (7,0; 8,0; 9,0 y 10,0) con el producido por alcalasa (preparación comercial obtenida de *Bacillus licheniformis*, Novo Industri A/S, Denmark) más el producido por tres fitoproteasas aisladas y purificadas en nuestro laboratorio (pomiferaína, hironymaína y macrodontaína) en la misma relación enzima/sustrato.

3.7.1.1. Preparación de los concentrados de soja

Para la obtención de los concentrados de soja se suspendieron 10 g de harina de poroto de soja desgrasada (origen Brasil) en 100 ml de etanol al 70 %, manteniendo la agitación durante 12 h a 4 °C. Se centrifugó a 9000 rpm durante 30 min y se trató el sedimento de la misma forma durante 1 h. Se filtró por vacío y se secó en estufa a 55 °C durante 48 h. El sólido obtenido se desmenuzó con mortero y se almacenó hasta su uso a 4 °C.

3.7.1.2. Seguimiento de la hidrólisis

El seguimiento de la hidrólisis se realizó con un "pH-stat" manual para valorar los protones liberados durante la proteólisis, empleando una microbureta tipo Bahn, un pH-metro, un vaso de doble camisa para termostatar la mezcla de hidrólisis y un baño de temperatura graduable. El pH se mantuvo constante por adición de solución de NaOH 0,25 N cada vez que el mismo descendió 0,1 unidad. Se tomaron alícuotas (250 µl recogidas en 50 µl de HCl 2 N para detener la reacción) a distintos tiempos para su posterior análisis por electroforesis. La reacción se concluyó por disminución del pH a 4,2 mediante el agregado de HCl 2 N. En todos los experimentos la temperatura fue fijada en 45 °C y se utilizaron 100 ml de una dispersión de concentrado de soja al 8% p/v en agua desmineralizada (5,6 % en proteínas) que fue llevada con NaOH al valor de pH elegido. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco, reemplazando la solución de enzima por una cantidad equivalente de agua destilada. Se mantuvo la relación de 8,9 Ucas/g de sustrato proteico (López *et al.*, 1998).

El grado de hidrólisis (GH) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Adler-Nissen, 1986):

$$GH, \% = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH}}{\alpha \times MP \times h_{tot}} \times 100$$

donde α es el grado de disociación promedio de los grupos α -NH-, MP es la masa de proteína en gramos (Kjeldahl) y h_{tot} el número total de uniones peptídicas en el sustrato proteico (meq/g).

3.7.1.3. Pretratamiento de las muestras de hidrolizados parciales para electroforesis

Las alícuotas (250 µl) del material proveniente de la hidrólisis parcial de los concentrados proteicos recogidas en 50 µl de solución de HCl 2 N fueron sometidas a un tratamiento de solubilización: para ello los 300 µl de cada una de las muestras se mezclaron con 2,7 ml de buffer de extracción y se agitaron durante una hora a temperatura ambiente.

Buffer de Extracción	
Urea 9 M	5,4 g
SDS	0,11 g
Buffer Tris-ClH 0,1M de pH 8,0	10 ml

Las suspensiones obtenidas se centrifugaron durante 5 min a 16.000 g, tomándose luego 0,5 ml de cada sobrenadante para su posterior tratamiento.

3.7.1.4. Tratamiento de las muestras de hidrolizados parciales para electroforesis.

Las muestras fueron tratadas según el protocolo descrito anteriormente (3.6.2.1) y sembradas en un gel en gradiente de poliacrilamida (5-20 %).

3.7.1.5. Desarrollo de la electroforesis y análisis de los datos

Las muestras se desarrollaron por electroforesis desnaturalizante en gradiente de poliacrilamida según el protocolo descrito en 3.6.2. El análisis de los datos obtenidos se realizó por densitometría según la técnica descrita en 3.6.8.3.

3.7.2. Determinación del Grado de Hidrólisis de Caseínas Bovinas

La acción proteolítica de los extractos parcialmente purificados de balansaina fue ensayada sobre caseínas de leche bovina con el fin de determinar el grado de hidrólisis.

3.7.2.1. Seguimiento de la hidrólisis

Se realizó según el protocolo empleado con soja (3.7.1) Las hidrólisis se realizaron a 45°C y a pH 9,0. Las dispersiones de caseína al 8% p/v se prepararon disolviendo caseína tipo Hammarsten en buffer glicina - NaOH 0,1M con el agregado de cisteína en una concentración final de 25 mM, ajustando el pH a 9,0 con NaOH y se llevando a volumen final de 100 ml. La reacción se detuvo a las 2 h por disminución del pH a 4,2 mediante el agregado de HCl 2 N. En los blancos se reemplazó la solución de enzima por una cantidad equivalente de agua destilada. A efectos comparativos, se mantuvo la relación de 8,9 Ucas/g de sustrato proteico utilizado en la hidrólisis de proteínas de soja.

3.7.2.2. *Pretratamiento de las muestras de hidrolizados parciales para electroforesis.*

El pretratamiento de las muestras se realizó según se indica en 3.7.1.3.

3.7.2.3. *Desarrollo de la electroforesis y análisis de los datos*

Las electroforesis se efectuaron por SDS-Tricine-PAGE según la técnica descrita en 3.6.1. El análisis de los datos obtenidos se realizó por densitometría según la técnica descrita en 3.6.9.

3.7.3. Hidrólisis Parcial de Proteínas de Leche realizadas en tubo

Dado que el sistema de hidrólisis continuo permitía ensayar sólo una muestra por vez (ver apartado anterior) se decidió reemplazarlo por una técnica de hidrólisis en tubos. Este método permite procesar un gran número de muestras en las mismas condiciones.

3.7.3.1. *Preparación de los sustratos*

Para que todos los ensayos tuviesen un alto grado de reproducibilidad se utilizó leche bovina en polvo descremada *San Regim*. El contenido en sólidos de la leche disuelta es del 11 % p/v. De estos sólidos, sólo 3,1 % p/v corresponden a proteínas lácteas totales de las cuales un 80 % son caseínas (2,5 % p/v) y el 20 % restante corresponden a proteínas séricas. La composición de las fracciones que componen las caseínas y el suero se encuentran resumidas en la siguiente tabla (CN = caseína, LA = lactoalbúmina, SA = seroalbúmina, Ig = inmunoglobulinas):

		Fracción	% del total	% p/v
Proteínas totales (100 %) 3,1 % p/v	Caseínas (CN) (80 %) 2,5 % p/v	α -CN	44	1,37
		β -CN	25	0,8
		γ -CN	4	0,11
		<i>k</i> -CN	7	0,22
	Suero (20 %) 0,6 % p/v	α -LA	4	0,11
		β -LG	13	0,40
		SA	1	0,03
		Ig	2	0,06

Para una correcta visualización en las electroforesis de las diferentes fracciones proteicas se emplearon en todos los casos soluciones conteniendo la mitad del porcentaje presente en leche. Para los ensayos específicos de caseínas se utilizó caseína bovina tipo Hammarsten.

3.7.3.1.1. Leche reconstituída

Para el ensayo se reconstituyeron 0,55 g de leche en polvo descremada *San Regim* en 10 ml de agua bidestilada. La misma fue utilizada como patrón electroforético.

3.7.3.1.2. Caseínas totales

Las dispersiones del sustrato se prepararon al 1,25 % p/v por disolución de caseína tipo Hammarsten en buffer Glicina - NaOH 0,1M de pH 8,9 según el protocolo desarrollado en 3.5.1.1..

3.7.3.1.3. Fracción β -caseínica

Se disolvió caseína tipo Hammersten en urea 6 M precipitando las distintas fracciones por dilución con agua destilada, las que se separaron del sobrenadante por centrifugación a 10000 g. La fracción de β -CN pudo separarse precipitada a una concentración de urea de 3,3 M (Hipp, 1952). Estos cristales de β -CN fueron secados posteriormente al vacío.

Las dispersiones de β -CN se prepararon al 0,4 % p/v en buffer Glicina - NaOH 0,1 M de pH 8,9 según el protocolo desarrollado en 3.5.1.1..

3.7.3.1.4. Obtención de la fracción sérica

Sobre la leche en polvo reconstituída según el protocolo desarrollado en 3.7.3.1.1 se efectuó una precipitación isoeléctrica adicionando HCl 1 N hasta pH 4,2 y manteniendo la temperatura a 30 °C (McKenzie, 1971) con el objeto de separar la fracción sérica de los caseinatos.

Luego de una centrifugación a 10.000 g durante 30 min a 4 °C el sobrenadante obtenido se secó por vacío y se almacenó hasta su posterior uso. Las dispersiones de suero se prepararon al 0,3 % p/v por disolución del sólido obtenido en buffer Glicina - NaOH 0,1 M de pH 8,9.

3.7.3.1.5. Fracción rica en betalactoglobulina

Se tomó una alícuota del sobrenadante obtenido en 3.7.3.1.4, alcalinizándolo hasta pH 7,0 con NaOH 1 N, se llevó a ebullición durante 8 min y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min. El precipitado obtenido se lavó con agua bidestilada y se volvió a centrifugar, luego de lo cual se secó mediante vacío y se almacenó hasta su posterior uso (McKenzie, 1971). Las dispersiones de betalactoglobulina (β -LG) se prepararon al 0,2 % p/v por disolución del sólido obtenido en buffer Glicina - NaOH 0,1 M de pH 8,9.

3.7.3.2. Desarrollo de las hidrólisis

Los ensayos de hidrólisis se realizaron con balansaína como enzima proteolítica. Se realizaron además ensayos de hidrólisis de caseínas empleando otras proteasas cisteínicas aisladas en el LIPROVE: asclepaína f, hieronymaína, y philibertaina g, con el objeto de comparar los resultados con los obtenidos empleando balansaína.

Las condiciones de los ensayos fueron 45 °C y una relación enzima - sustrato de 8,9 Ucas/ g proteína. A 450 μ l de sustrato se le adicionaron 50 μ l de extracto enzimático, deteniéndose la reacción a distintos tiempos (0, 5, 10, 30, 60 y 90 min) por precipitación con 500 μ l de TCA al 5 %. Los blancos fueron preparados reemplazando los 50 μ l de enzima por buffer Tris-HCl de pH 8,0. Los tubos se dejaron reposar durante 30 min a 4 oC.

3.7.3.3. Pretratamiento de las muestras

Las muestras obtenidas según la técnica descrita en 3.7.3.2 se centrifugaron a 9500 rpm durante 10 min para eliminar el sobrenadante. Los precipitados conteniendo proteínas y los péptidos insolubles en TCA se redisolviéron en 450 μ l del correspondiente buffer de muestra para electroforesis dos veces concentrado y se alcalinizaron con 50 μ l de NaOH 1N. Se llevaron a ebullición durante 5 min y se centrifugaron durante 10 min a 9000 rpm. Los blancos cumplieron a su vez la función de patrones de electroforesis respecto a las proteínas de leche.

3.7.3.4. Desarrollo de la electroforesis y análisis de los datos

Las muestras a analizar fueron sembradas en los siguientes sistemas de geles: SDS-PAGE (3.6.1), SDS-Tricine-PAGE (3.6.3), SDS-Tricine-PAGE de alta resolución (3.6.4) y UREA-PAGE (3.6.5.). El análisis densitométrico se realizó según la técnica descrita en 3.6.9.

3.8. Actividad Coagulante sobre Proteínas de Leche.

3.8.1. Preparación del Sustrato

Para el ensayo se reconstituyeron 11 g de leche en polvo descremada *San Regim* en 100 ml de solución de CaCl_2 0,01 M en agua bidestilada (pH final 6,4).

3.8.2. Desarrollo de la Coagulación

A 5 ml de la suspensión de leche termostaticada a 30 °C se le agregaron 0,5 ml de extracto enzimático manteniendo la mezcla a la temperatura indicada anteriormente. El punto final se determinó por observación directa de la formación de un coágulo macroscópico en el tubo de reacción. El tiempo de formación del coágulo se midió en segundos. En función de estos valores se establecieron las unidades de actividad coagulante en IMCU (International Milk Clotting Units) por comparación con los tiempos de coagulación de un cuajo patrón (Quimosina bovina CHR Hansen, con una fuerza coagulante de 108 IMCU/mg proteína). El blanco de reacción se preparó reemplazando los 0,5 ml de enzima por la misma cantidad de solución de CaCl_2 .

3.8.3. Análisis Electroforético de los Coágulos

Los coágulos formados en las condiciones descritas en 3.8.2 fueron centrifugados a los efectos de separarlos del suero. Tanto las muestras de coágulo como las de suero se mezclaron con buffer de muestra para electroforesis y fueron sembradas en geles de SDS-Tricine-PAGE (3.6.3). El análisis de los datos obtenidos se realizó por densitografía según la técnica descrita en 3.6.9.

3.8.4. Variación de la Actividad Coagulante con la Relación Enzima-Sustrato

Con el fin de analizar la variación de la actividad coagulante con la relación sustrato- enzima, se repitió el protocolo descrito en 3.8.2 utilizando las siguientes relaciones volumen en volumen de leche a balansaína: 5:1, 10:1, 25:1 y 50:1. La actividad proteolítica de balansaína fue de 8,9 Ucas/mg proteína.

3.8.5. Variación de la Actividad Coagulante con la Concentración de Calcio

Para estudiar la variación de la actividad coagulante con la concentración de calcio, se repitió el protocolo descrito en 3.8.2 utilizando las siguientes concentraciones de calcio: 0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 y 50,0 mM.

3.8.6. Variación de la Actividad Coagulante con la Temperatura

A los efectos de analizar la variación de la actividad coagulante con la temperatura, se repitió el protocolo descrito en 3.8.2 utilizando las siguientes temperaturas de ensayo: 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0 y 45,0 °C.

3.9. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

La etapa final de la purificación se desarrolló utilizando un equipo FPLC Pharmacia, con columnas XK/16 de 1,6 x 40 cm equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM de pH 7,0 (buffer de partida) a 4 °C. El sistema cromatográfico estuvo compuesto por un programador de gradiente (GP250 Plus) adosado a dos bombas (P500) para el proceso de elución, un mixer, un sistema de válvulas para la inyección y control del flujo de volumen (V-7), un monitor UV (UV-1) para la medida de absorbancia a 280 nm y otro para la medida de la fuerza iónica, un registrador y un colector de fracciones automático.

Las condiciones de gradiente empleadas fueron equivalentes, utilizando un intercambiador aniónico fuerte (Q-Sepharose Fast Flow, Bio-Rad) en las separaciones iniciales y otro de mayor resolución (Q-Sepharose High Performance, Bio-Rad) en las recromatografías. En todos los casos se trabajó a mayor velocidad de flujo (0,5 ml/min) recogiendo fracciones de 1,4 ml. La

actividad caseinolítica fue determinada luego de 10 min de incubación a 37 °C. Todos los ensayos fueron hechos a 4 °C .

3.10. ESPECTROMETRIA DE MASAS

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

El análisis fue llevado a cabo en el Instituto de Biología Fundamental de la Universidad Autónoma de Barcelona. Se realizó como paso previo al secuenciamiento del extremo amino con el fin de determinar el grado de pureza de la fracción cromatográfica y para establecer su masa molecular. El equipo utilizado fue un MALDI-MS TOF Bruker, modelo Biflex, equipado con un láser de nitrógeno y un voltaje de aceleración de 19 kv.

Las muestras purificadas por cromatografía de intercambio iónico (en concentración 1-10 mM) fueron mezcladas en volúmenes iguales con una solución saturada de la matriz de ácido sinapínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) disuelta en ácido trifluoroacético al 0,1% en una mezcla agua/acetonitrilo en proporción 2:1. Se depositaron cuidadosamente alícuotas de 0,5-1 ml de muestra sobre la placa de siembra y se dejaron secar por evaporación. Se determinó la masa molecular de la muestra utilizando tripsinógeno y carboxipeptidasa B como patrones.

3.11. SECUENCIA N-TERMINAL

Este análisis se llevó a cabo en el Instituto de Biología Fundamental de la Universidad Autónoma de Barcelona. Para este ensayo se adsorbieron 10-100 pg de balansaína I en una membrana de PVDF (Millipore). La muestra se dispuso en un tubo Ultrafree-Probind Filters y fue centrifugada a 10000 g durante 2 min, procediendo luego a despegar el filtro de PVDF y a lavarlo varias veces con agua de calidad Mili Q. La secuencia N-terminal se determinó por el método de degradación de Edman automatizado, con un secuenciador Beckman LF3000 equipado con un sistema analizador PTH-aminoácido Gold (Beckman). A partir de la información obtenida se realizó en nuestro laboratorio

(LIPROVE) la búsqueda de homología de proteínas utilizando el servicio BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

PARTE I

ESTUDIO DE LA VARIACION DE DISTINTOS PARAMETROS DURANTE EL DESARROLLO DE LOS FRUTOS

4.1. PARAMETROS MACROSCOPICOS

4.1.1. Clasificación de los Frutos en Base a su Color Superficial

Al analizar las muestras de frutos de *Bromelia balansae* destinadas a la extracción de proteasas se observó que estaban compuestas por frutos en distinto grado de madurez. Dado que el desarrollo del color de la superficie de los frutos -causado por la variación de su contenido en pigmentos- varía paulatinamente durante el proceso de maduración, se ha seleccionado este parámetro para determinar el grado de madurez de los mismos y luego correlacionarlo con el contenido y tipo de proteínas presentes en dichos frutos. El análisis del color de superficie de los frutos se realizó por colorimetría triestímulo según la técnica descrita en 3.1.4., empleando un colorímetro de superficie Cromameter Minolta, modelo CR 300. Mediante este método se obtuvieron los parámetros necesarios que permitieron clasificar los frutos en cinco grupos con diferente grado de madurez, que se muestran en la figura. 4.1

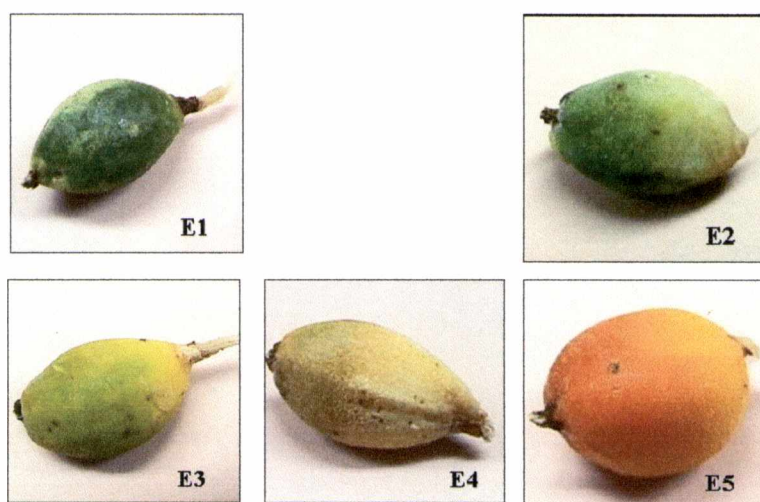


Fig. 4.1. Estadios de frutos seleccionados para la determinación de los parámetros de color.

En la Tabla 4.1 se muestra un ejemplo del análisis colorimétrico realizado, con sus correspondientes parámetros triestímulo.

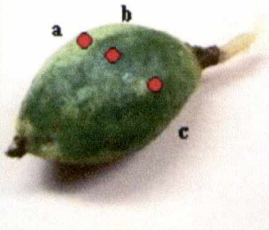



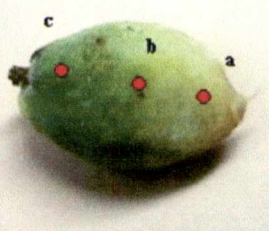



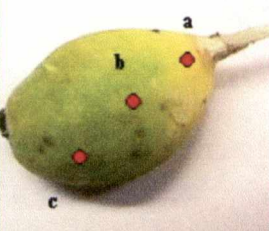



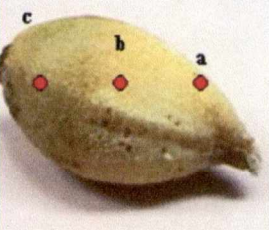
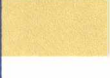


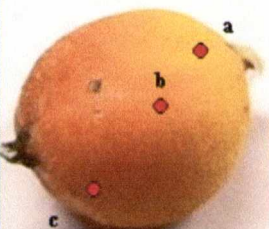



Estadio		L	a	b	
E1		78,3	-19,1	40,4	
		60,2	-20,1	20,6	
		40,0	-10,3	20,2	
E2		60,5	-9,8	40,2	
		50,0	-19,9	40,1	
		39,7	-20,3	30,1	
E3		80,3	0,2	79,8	
		60,1	-10,3	60,3	
		40,1	-9,7	40,2	
E4		79,4	0,0	50,3	
		70,2	0,2	49,7	
		50,1	0,0	40,6	
E5		79,8	9,7	80,1	
		70,1	40,3	69,9	
		40,1	40,0	39,5	

Tabla 4.1. Parámetros colorimétricos de los frutos

Como puede observarse en esta tabla, los datos numéricos obtenidos se reconvirtieron a color mediante un programa de tratamiento de imágenes (Adobe Photo Shop), pudiendo verificarse los valores obtenidos con el colorímetro y creando luego una escala de colores en forma de cartilla que se presenta en la misma tabla.

Puede observarse que, como era de esperar, los valores del parámetro “a” -que indica el equilibrio verde-rojo- va incrementándose a medida que el fruto madura y que el parámetro “b” -que indica el equilibrio amarillo-azul- también aumenta con la madurez.

Mediante los datos obtenidos en este muestreo se pudo seleccionar los restantes frutos a ser estudiados en el presente trabajo.

4.2. RELACION ENTRE EL GRADO DE MADUREZ Y EL CONTENIDO PROTEICO

Para verificar si el contenido de proteínas variaba en los distintos estadios de madurez se prepararon por duplicado extractos crudos de cada uno de los grupos de frutos según la técnica descrita en 3.2.1, obteniéndose extractivos con una relación de 0,2 g de frutos por ml de extracto. En todos los casos el pH de los extractos fue 7,0, suficientemente alejado del pH óptimo de las endopeptidasas (obtenido en estudios preliminares) para minimizar procesos de autodigestión. A continuación se realizaron los correspondientes isoelectroenfoces según la técnica descrita en 3.6.6, los cuales pueden visualizarse en la figura 4.2.

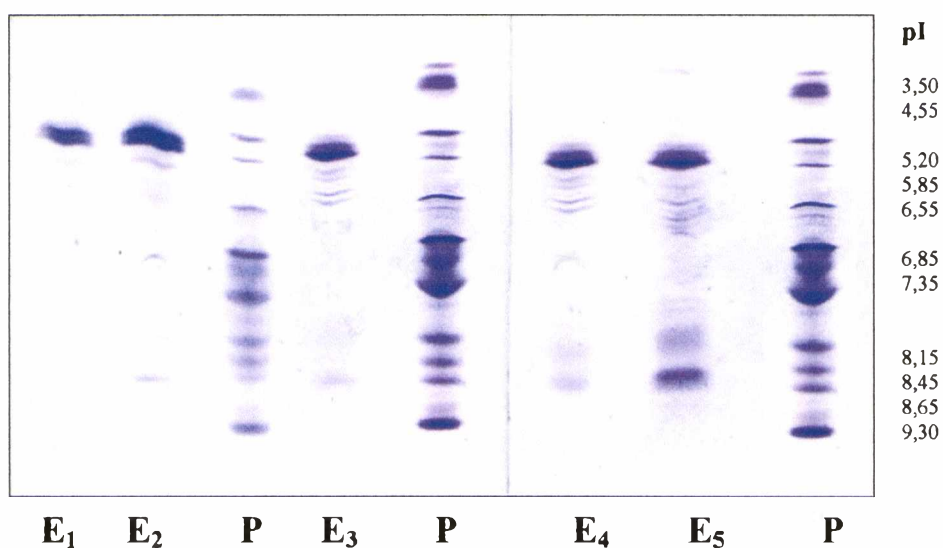


Fig. 4.2. Perfil polipeptídico para los distintos estadios de madurez de los frutos. E₁, E₂, E₃, E₄, E₅. Extractivos correspondientes a los distintos grados de madurez; P: patrones de punto isoelectrónico.

Como se observa en la figura, sólo los estadios E₁ y E₅ presentaron patrones de bandas diferenciales, siendo el resto de tipo intermedio entre los dos mencionados.

En el extractivo correspondiente al estadio inmaduro pudo observarse la presencia de menor cantidad de bandas y de proteínas totales. Las bandas

proteicas principales se situaron en la zona de pH ácido (pI 4,5-5,5), siendo casi imperceptibles en la zona alcalina (pI 8,0-8,5). A medida que avanza el proceso de maduración se produce un aumento en el número de bandas, así como en el contenido de proteínas totales, haciéndose más evidentes las bandas de la zona alcalina (en especial dos de ellas); al mismo tiempo las bandas ácidas predominantes en los estadios inmaduros comienzan a disminuir en intensidad.

En base a los resultados obtenidos se decidió proseguir el estudio solamente con los estadios extremos, denominándose frutos inmaduros a “E₁” y frutos maduros a “E₅” de la anterior nomenclatura. En la tabla 4.2 se muestran los valores promedio de largo, diámetro y peso de los frutos de los dos estadios seleccionados y su aspecto se presenta en las figuras. 4.3a y 4.3b.

Parámetro	Frutos inmaduros	Frutos maduros
Largo (cm)	3,3	4,1
Diámetro (cm)	1,9	3,2
Peso (g)	10,9	27,5

Tabla 4.2. Parámetros macroscópicos de frutos maduros e inmaduros de *Bromelia balansae*.



Fig. 4.3a. Frutos verdes de *Bromelia balansae* Mez

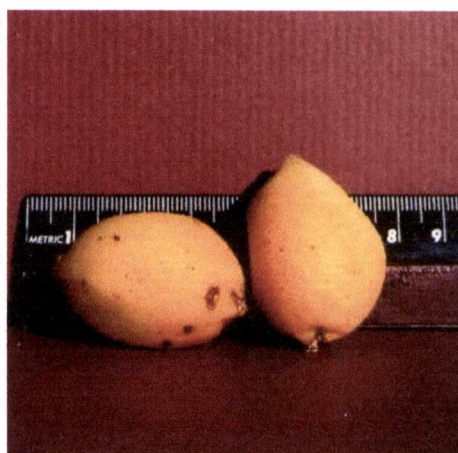


Fig. 4.3b. Frutos maduros de *Bromelia balansae* Mez

4.3. ANALISIS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

4.3.1. Contenido en Proteínas, Hidratos de Carbono y Actividad Caseinolítica

Al proseguir con el análisis de los extractos crudos (tabla 4.3) correspondientes a los frutos inmaduros (ECI) y maduros (ECM), se observó que tanto el contenido de azúcares solubles como el de proteínas, determinados según los protocolos descritos en 3.4, se incrementaron notoriamente durante el proceso de maduración. El bajo contenido proteico en los extractos coincide con

el hecho de que las células vegetales se encuentran compartimentalizadas y la mayor parte de su volumen se encuentra ocupado por espacio vacuolar, lo que hace que el citosol no ocupe más del 1 a 2 % del espacio celular total (Scopes, 1984). El menor contenido proteico en frutos inmaduros respecto a frutos maduros coincide con los resultados observados en el isoelectroenfoque de la figura 4.3. Se determinó también una disminución del contenido de fenoles al transcurrir la maduración, lo que se comprueba por el descenso de la absorbancia a 330 nm.

Los valores máximos de actividad proteolítica determinados según el protocolo 3.5.1.1 se presentaron en los estadios de menor madurez, con valores de actividad total y específica superiores a los del extracto obtenido a partir de frutos maduros.

Muestra	Azúcares (mg/g fruto)	Proteínas (mg/g fruto) x 100	Actividad Ucas/ ml	Ucas/g fruto	Actividad Específica	Comp. Fenólicos (A ₃₃₀)
ECI	17 ± 0,3	35 ± 0,5 (70 ug/ml)	2, 0 ± 0,1	10 ± 0,5	28,6 ± 2	1,2
ECM	136 ± 3	75 ± 2 (150 ug/ml)	1,3 ± 0.04	6,5 ± 0,2	8,7 ± 0,4	0,7

Tabla 4.3. Contenido en azúcares, proteínas y actividad en los extractos crudos maduros (ECM) e inmaduros (ECI).

4.3.2. Ensayo de Actividad Carboxipeptidásica

La actividad carboxipeptidásica de los extractos crudos de frutos de *Bromelia balansae* fue determinada según el protocolo descrito en 3.5.3. No se ha detectado actividad carboxipeptidásica ni actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A en ninguna de las muestras ensayadas.

PARTE II

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE EXTRACTOS PARCIALMENTE PURIFICADOS

4.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PARCIALMENTE PURIFICADOS

Si bien con la centrifugación de la suspensión obtenida al triturar los frutos en presencia de buffer se asegura la remoción de materiales insolubles de diferente naturaleza, en los extractos vegetales suelen permanecer una importante cantidad de pigmentos, en particular flavonoides, además de otros compuestos de naturaleza fenólica y una considerable cantidad de glúcidos. En la obtención de preparaciones proteicas y en particular en las enzimáticas es necesario eliminar los compuestos fenólicos para evitar que las formas oxidadas de los mismos reaccionen con las proteínas, inactivándolas de forma irreversible (Loomis & Battaile, 1966). Por otra parte, tanto los compuestos fenólicos como los glúcidos dificultan la aplicación de las técnicas cromatográficas de purificación. Por ello, y además para obtener preparaciones con un grado de purificación adecuado tanto para su uso en diferentes aplicaciones tecnológicas como para su posterior purificación final, se sometió a los extractos crudos a precipitación fraccionada empleando solventes orgánicos polares.

Con el fin de definir la técnica a emplear se utilizaron como solventes acetona y etanol según la metodología descrita en 3.3.1. Los resultados mostrados en las figuras 4.4 y 4.5 corresponden a los ensayos con extractos provenientes de frutos inmaduros, en tanto que en las figuras 4.6 y 4.7 se presentan los obtenidos con los de frutos maduros.

En la figura. 4.4 podemos observar que el precipitado obtenido a partir de los extractos crudos de frutos inmaduros con un volumen de acetona presentó un valor muy bajo (6 %) de actividad enzimática, un 45 % de azúcares y un 15 % de proteínas, con respecto a los valores determinados en los extractivos de partida.

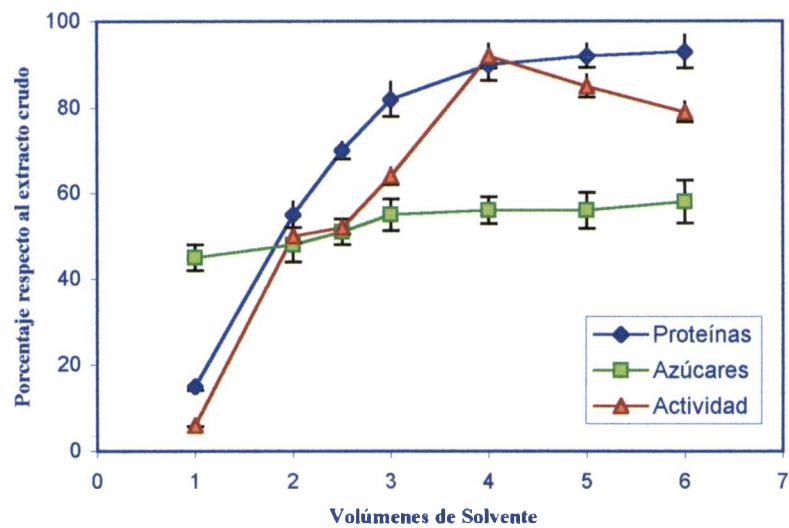


Fig. 4.4. Precipitación acetónica de extractos crudos de frutos inmaduros. Los valores corresponden a dos experimentos independientes y las determinaciones se realizaron por triplicado.

Con 4 volúmenes de solvente se retuvieron el 92 % de la actividad inicial y el 90% de las proteínas presentes en el extracto crudo.

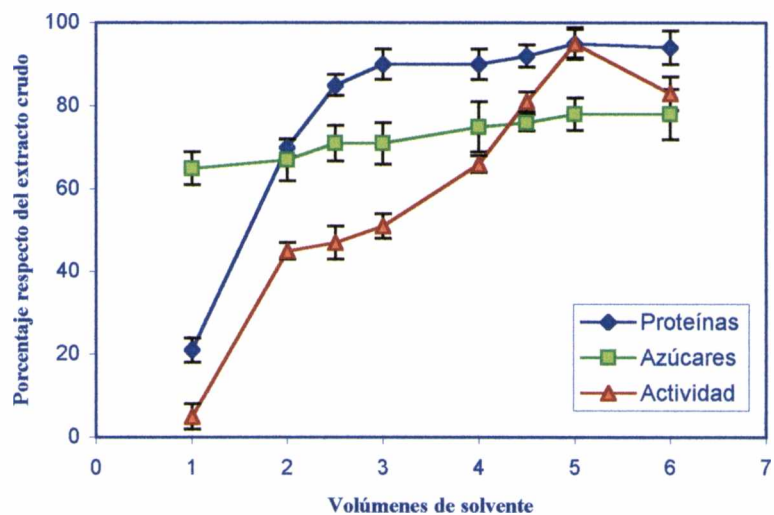


Fig. 4.5. Precipitación etanólica de extractos crudos de frutos inmaduros. Los valores corresponden a dos experimentos independientes y las determinaciones se realizaron por triplicado.

En la figura. 4.5 se observa que el precipitado obtenido a partir de los extractos crudos de frutos inmaduros con un volumen de etanol también presentó un valor muy bajo (5%) de actividad enzimática, en tanto que retuvo un 65 % de azúcares y un 21 % de proteínas, con respecto a los valores determinados en los extractivos de partida. Por su parte al precipitar con 5 volúmenes de solvente se

retuvieron el 95 % de la actividad inicial y el 95% de las proteínas presentes en el extracto crudo.

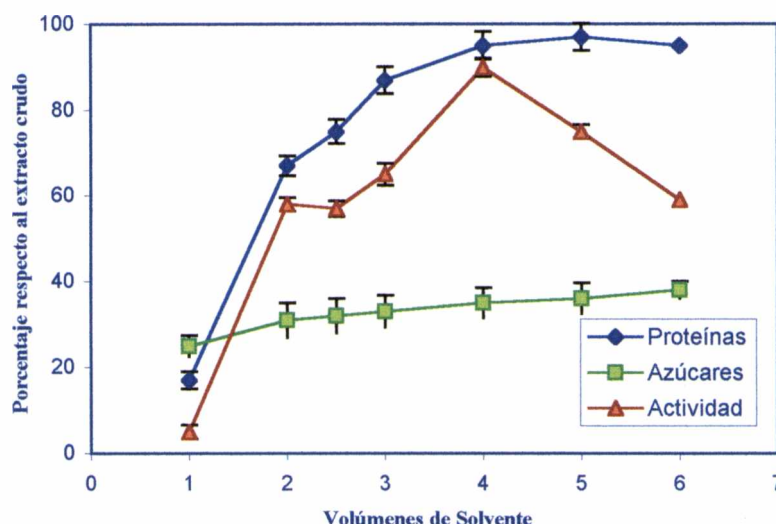


Fig. 4.6. Precipitación acetónica de extractos crudos de frutos maduros. Los valores corresponden a dos experimentos independientes y las determinaciones se realizaron por triplicado.

En la figura. 4.6 vemos que el precipitado obtenido a partir de los extractos crudos de frutos maduros con un volumen de acetona presentó también un valor muy bajo (5%) de actividad enzimática, con un 25 % de azúcares y un 17 % de proteínas, con respecto a los valores determinados en los extractivos de partida. Con 4 volúmenes de solvente se retuvieron el 90 % de la actividad inicial y el 95% de las proteínas presentes en el extracto crudo.

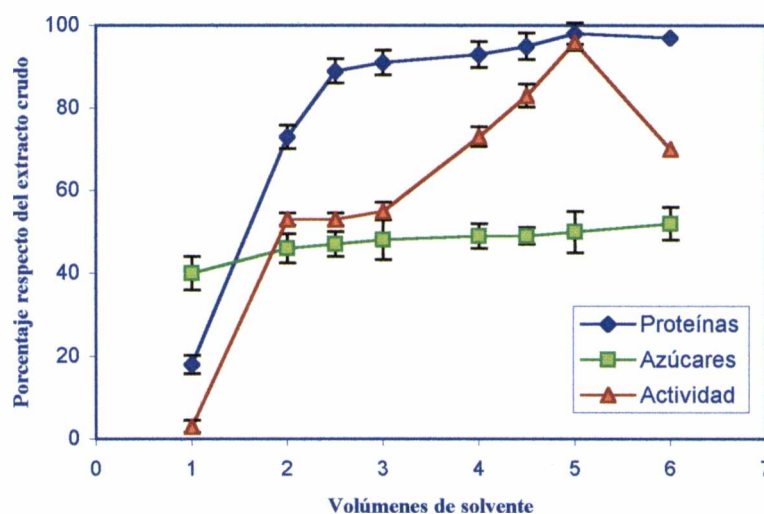


Fig. 4.7. Precipitación etanólica de extractos crudos de frutos maduros. Los valores corresponden a dos experimentos independientes y las determinaciones se realizaron por triplicado.

En la figura 4.7 podemos observar que el precipitado obtenido a partir de los extractos crudos de frutos maduros con un volumen de etanol presentó un valor muy bajo (3 %) de actividad enzimática, un 40 % de azúcares y un 18 % de

proteínas, con respecto a los valores determinados en los extractivos de partida. Empleando 5 volúmenes de solvente en la precipitación se retuvieron el 96 % de la actividad inicial y el 98% de las proteínas presentes en el extracto crudo.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados fueron similares tanto para extractivos crudos de frutos maduros (ECM) como inmaduros (ECI), así como para los dos solventes ensayados, tanto al analizar los resultados obtenidos para el precipitado obtenido con un volumen de solvente como para el obtenido con la máxima cantidad del mismo.

Considerando que el etanol es un solvente más apropiado para el uso de estas proteasas en la industria alimentaria se lo seleccionó como solvente precipitante. En base a los resultados obtenidos en los ensayos presentados anteriormente se procedió a eliminar el primer precipitado que posee una muy escasa actividad proteolítica reprecipitando el sobrenadante obtenido con 4 volúmenes de etanol según la técnica descrita en 3.3.2. Los extractos parcialmente purificados obtenidos por esta última técnica fueron denominados genéricamente *balansaina*, utilizándose la abreviatura BI para la preparación proveniente de frutos inmaduros y BM para la proveniente de frutos maduros. En la Tabla 4.4. se presentan los valores de actividad en Ucas por gramo de fruto (Ucas/g F), de proteínas en miligramos por gramo de fruto (mg/g F) y de azúcares en miligramos por gramo de fruto (mg/g F) para cada tipo de extractivo. La medida de la absorbancia a 330 nm de los extractos es una medida del contenido en compuestos fenólicos.

Muestra	Actividad (Ucas/g F)	Proteínas (mg/g F)x100	Azúcares (mg/g F)	A ₃₃₀
ECI	10 ± 0,5	35 ± 0,5	17 ± 0,3	1,22
BI	9,2 ± 0,6	29 ± 1	9,4 ± 0,3	0,13
ECM	6 ± 0,2	75 ± 2	136 ± 3	0,72
BM	5,4 ± 0,2	60 ± 2	12,2 ± 0,2	0,081

Tabla 4.4. Comparación de la composición de los diferentes extractivos. ECI y ECM: extractos crudos de frutos inmaduros y maduros, respectivamente, BI: balansaina obtenida de frutos inmaduros, BM: balansaina obtenida de frutos maduros. Los valores corresponden a dos experimentos independientes y cada determinación se realizó por quintuplicado.

Mediante la aplicación de la técnica seleccionada para la obtención de los extractos parcialmente purificados se logró retener el 92 % de la actividad enzimática y el 83 % de las proteínas, eliminando el 45 % de los azúcares en relación al extracto crudo de frutos inmaduros, mientras que en el caso de los frutos maduros se retuvo el 90 % de la actividad enzimática y el 80 % de las proteínas, eliminándose el 81 % de los azúcares en relación al extracto crudo. La técnica empleada resultó también muy eficiente para la eliminación de compuestos de naturaleza fenólica, lo que se refleja en la drástica reducción de la absorbancia medida 330 nm en ambos extractivos.

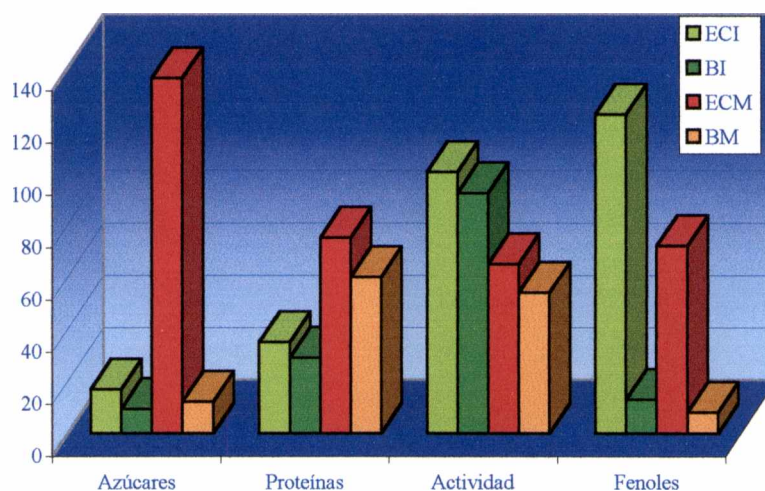


Fig. 4.8. Comparación gráfica de la composición de los diferentes extractivos. Los valores corresponden a dos experimentos independientes y cada determinación se realizó por quintuplicado.

La figura. 4.8. nos permite observar en forma gráfica la modificación en la composición de los extractos crudos y balansaina (enzima parcialmente purificada) para ambos tipos de frutos.

4.5. CARACTERIZACION DE BALANSAINA DE FRUTOS MADUROS E INMADUROS.

4.5.1. Electroforesis Desnaturalizante

Para tener una estimación de los pesos moleculares de las proteínas contenidas tanto en balansaina de frutos maduros como de inmaduros, se realizaron electroforesis reductoras y desnaturalizantes en geles con tricina según el protocolo descrito en 3.6.3. Los resultados de dichas electroforesis se muestran en la figura 4.9.

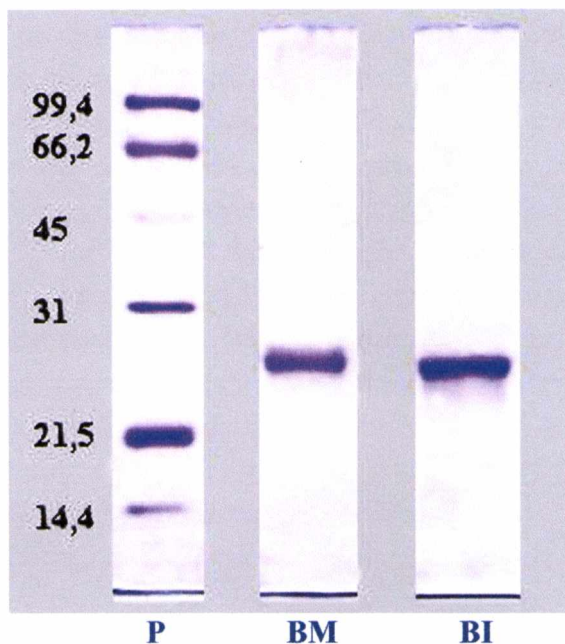


Fig. 4.9. Electroforesis en geles con tricina. BM: balansaina de frutos maduros; BI: balansaina de frutos maduros; P: Patrones de peso molecular

Las electroforesis revelan que las principales bandas proteicas correspondientes tanto a balansaina proveniente de frutos maduros como de inmaduros se encuentran comprendidas en la región de 20-30 kDa, valores que son del mismo orden que los encontrados en endopeptidasas de otras especies de *Bromeliaceae*.

Realizando una electroforesis similar, aunque reduciendo la cantidad de muestra sembrada y tiñendo los geles con plata según la técnica de Blum *et al.* (1987) con modificaciones, cuyo protocolo se describe en 3.6.7.1, se obtuvo la imagen que se presenta en la figura 4.10.

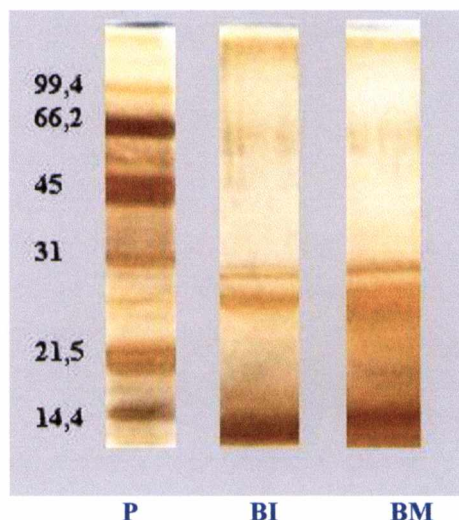


Fig. 4.10. Electroforesis en geles con tricina teñidos con plata. BM: balansaina de frutos maduros; BI: balansaina de frutos maduros; P: Patrones de peso molecular.

Como puede observarse en la figura la electroforesis correspondiente a balansaina proveniente de frutos maduros presenta un número mayor de polipéptidos. De todos modos, tanto en balansaina proveniente de frutos maduros como de inmaduros existen tres bandas principales con pesos moleculares de 21,5; 23,5 y 24,5 kDa, alguna banda de mayor PM y un conjunto de péptidos de pesos moleculares menores a 14,4 kDa.

4.5.2. Puntos Isoeléctricos de las Fracciones Activas

Para tener una estimación de los puntos isoelectricos de las fracciones activas de ambos tipos de balansaina se realizaron isoelectroenfoces seguidos de zimograma según los protocolos descritos en 3.6.6 y 3.6.7.4, respectivamente. Los resultados de dichos isoelectroenfoces se muestran en la figura 4.11.

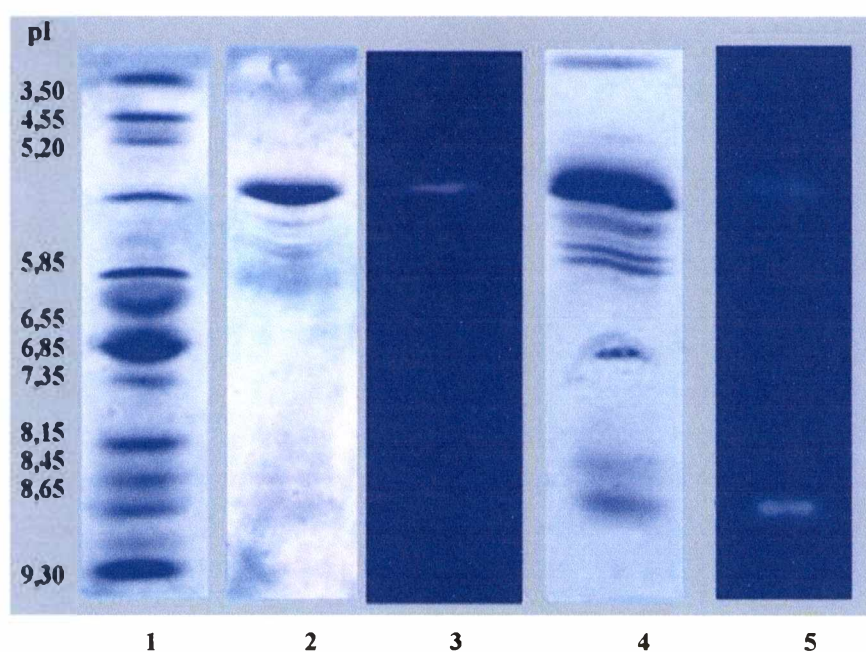


Fig. 4.11. Isoelectroenfoco y zimograma de balansaina. 1: patrones de pI; 2: IEF de BI; 3: zimograma de BI; 4: IEF de BM; 5: zimograma de BM.

Como observamos en la figura, sólo la banda activa de pI 5,5 se encuentra presente en cantidades apreciables durante todo el proceso de maduración. En cuanto a otras proteasas de *Bromeliaceae* con valores de punto isoelectrico en ese mismo rango pueden mencionarse bromelaína de fruto: pI 4,6 (Ota *et al.*, 1964), pinguinaína: pI 6,5 (Rowan *et al.*, 1990a) y macrodontaína I y II: pI 6,1 y 5,9 respectivamente (López *et al.*, 2000).

La segunda banda activa, de pI 8,7 sólo puede encontrarse en cantidades apreciables en las últimas etapas del proceso de maduración. Otras proteasas de *Bromeliaceae* con valores de punto isoelectrico alcalino son hieronymaína I: pI > 9,3 (Bruno *et al.*, 2002), serraína: pI > 8,0 (Caffini *et al.*, 1988), bromelaína de

tallo: pI 9,55 (Murachi, 1970), ananáina: pI > 10 (Rowan *et al.*, 1988; Harrach *et al.*, 1995) y comosáina: pI > 10 (Barret *et al.*, 1998).

4.5.3. Efecto del Almacenamiento a Bajas Temperaturas

Tanto para balansaina obtenida de frutos maduros como de inmaduros se observó un descenso de la actividad caseinolítica debido al efecto de la congelación y posterior descongelación (3.5.5.1), en tanto que el ensayo planificado para verificar la estabilidad de las preparaciones enzimáticas congeladas (3.5.5.2) no mostró variaciones significativas de la actividad a lo largo de un período de 180 días. Ambos efectos se pueden apreciar en la figura 4.12.

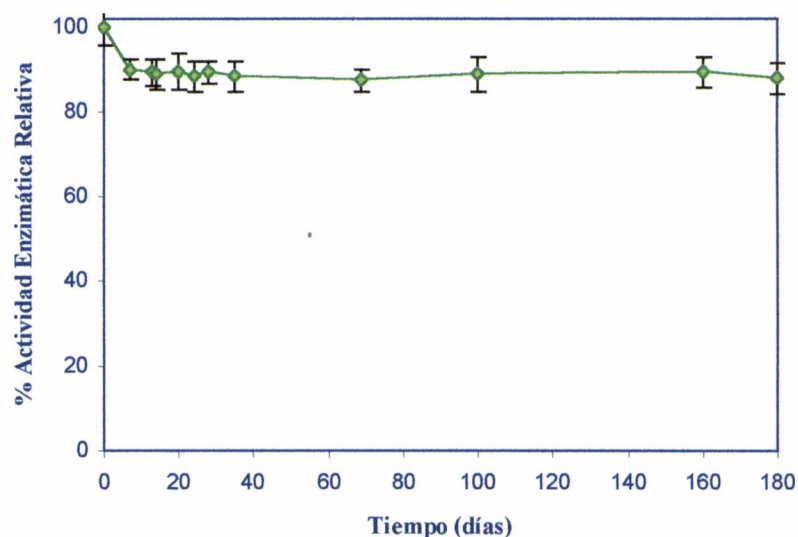


Fig. 4.12. Efecto del almacenamiento a -20°C . Los datos corresponden a BI, siendo los resultados equivalentes en el caso de BM

Si bien la disminución inicial de la actividad proteolítica por efecto de la congelación-descongelación es del 10 %, la actividad de los extractos se mantiene luego en un valor constante, lo que permite conservar la enzima a -20°C hasta 6 meses sin una pérdida significativa de actividad.

4.5.4. Efecto de la Liofilización

Siguiendo los pasos detallados en 3.5.6, se determinó que la actividad de las muestras de balansaina liofilizadas y reconstituidas fue de un 85-90 % respecto a la actividad de las muestras sin liofilizar, habiéndose determinado que esta actividad no disminuye al menos hasta los 12 meses. Este fue el método de elección para la conservación de los extractos enzimático.

4.5.5. Efecto de Modificadores de la Actividad

4.5.5.1. Efecto de la concentración de cisteína sobre la actividad enzimática

En ensayos preliminares se comprobó que la cisteína, un efectivo agente reductor, produce un incremento en la actividad enzimática debido a la transformación de moléculas de enzima oxidada en su forma activa, en la cual el grupo -SH del centro activo se halla libre y capaz de participar en la catálisis de la ruptura de las uniones peptídicas. Con el fin de conocer la concentración óptima de cisteína se determinó la actividad caseinolítica de balansaina a diferentes concentraciones de cisteína en la mezcla de reacción (3.5.7.1). Los resultados de los experimentos se muestran en la figura 4.13.

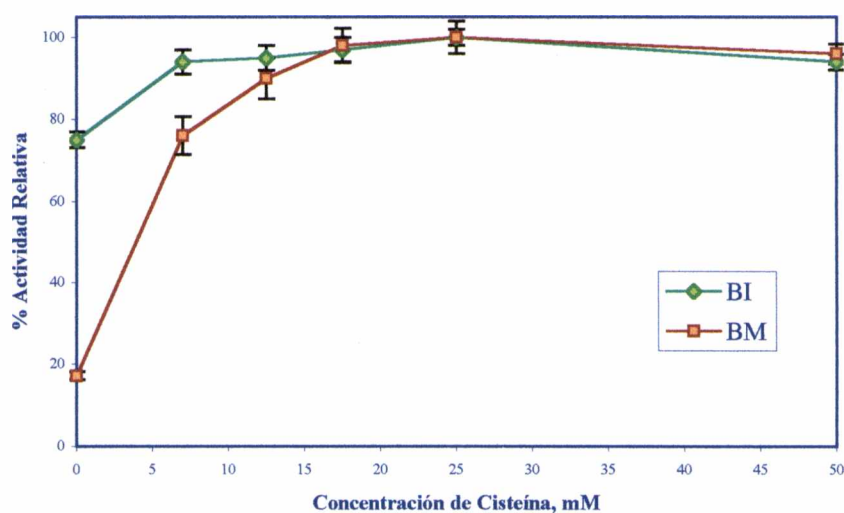


Fig. 4.13. Efecto de la concentración de cisteína sobre la actividad proteolítica de balansaina.

Como puede observarse en la figura, ambos extractivos de balansaina se comportaron de manera similar ante el agregado creciente de cisteína, llegando rápidamente a sus respectivos valores máximos de actividad a concentraciones moderadas de este agente protector del sitio activo (17,5 mM). Debe observarse que balansaina se halla en estado de mayor oxidación en los extractos de frutos maduros que en los de frutos inmaduros. Dado que el máximo valor de actividad caseinolítica se obtuvo con una concentración de cisteína cercana a 20 mM y que concentraciones algo mayores de este agente no influyeron en el valor de la actividad, se decidió emplear una concentración final de cisteína 25 mM en todos los ensayos posteriores, con el objeto de compensar pequeñas pérdidas de este agente protector que se pudieran producir por oxidación.

4.5.5.2. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática

Los valores de actividad proteolítica residual de balansaína luego de ser incubada con inhibidores específicos de grupo según el protocolo descrito en 3.5.7.2 a tres valores de pH se presentan en la tabla 4.5. A pH 3 balansaína no presentó actividad enzimática por lo que no puede realizarse ninguna comparación.

Reactivo	Concentración Efectiva, mM	% Actividad residual		
		pH 3	pH 6	pH 9
E-64	1	X	0	0
HgCl₂*	10	X	0	0
Iodoacetato	0,1	X	1	0
Pepstatina A	0,5	X	98	96
PMSF*	5	X	29	34
1,10 fenantrolina	10	X	95	99

Tabla 4.5. Acción de inhibidores sobre la actividad proteolítica de balansaína. Los valores corresponden a la enzima proveniente de frutos inmaduros, siendo equivalentes para la obtenida de frutos maduros (datos no mostrados). Los ensayos marcados con (*) se realizaron sin cisteína en el medio. En la columna correspondiente a pH 3 la X indica que la enzima no es activa en esas condiciones.

Como puede observarse en la tabla, tanto la enzima proveniente de frutos maduros como la de inmaduros fueron inhibidas en forma prácticamente total por E-64, cloruro mercúrico e iodoacetato, todos ellos inhibidores característicos de proteasas cisteínicas. Por su parte la pepstatina A (inhibidor de endopeptidasas aspárticas) y la 1,10-fenantrolina (inhibidor de metaloendopeptidasas) no producen inhibición significativa. El efecto del PMSF se verificó empleando el protocolo descrito en 3.5.7.3 y los datos del experimento se muestran en la figura 4.13.

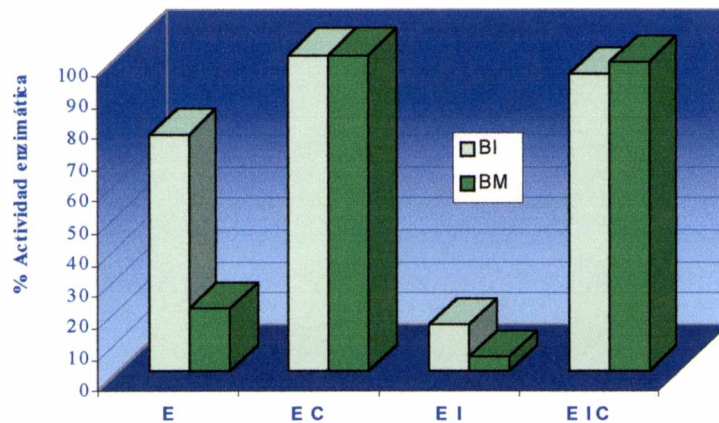


Fig. 4.13. Inhibición de extractos parcialmente purificados con PMSF. E: enzima sin cisteína (Cys), EC: enzima con Cys, EI: enzima con inhibidor, EIC: actividad enzimática restaurada con Cys

El PMSF es un inhibidor irreversible para endopeptidasas serínicas y reversible, en presencia de cisteína, para endopeptidasas cisteínicas. Los valores de actividad residual obtenidos muestran que ambos extractivos fueron inhibidos casi completamente por PMSF, siendo este efecto revertido por el agregado de cisteína al medio.

Por su parte, la inhibición de los extractos con cloruro mercúrico pudo ser revertida con cisteína según el protocolo descrito en 3.5.7.3, lo que también es una característica de las cisteinproteasas. Los datos del experimento se presentan en la figura 4.14, donde puede observarse que la inhibición total se logró con la mayor de las concentraciones utilizadas (10 mM), fenómeno que se revertió completamente con el agregado de cisteína.

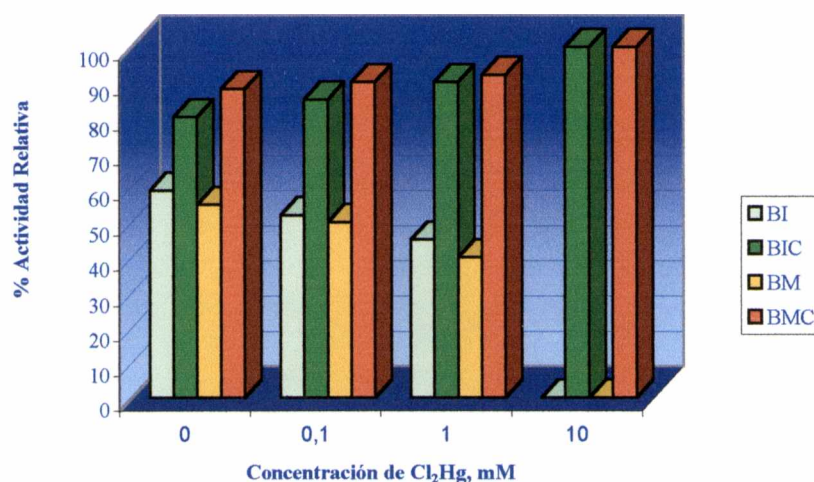


Fig. 4.14. Inhibición del Cl₂Hg sobre la actividad proteolítica. BI: actividad de balansaína de frutos inmaduros con inhibidor, BIC: actividad restaurada con Cys, BM: actividad de balansaína de frutos maduros con inhibidor, BMC: actividad restaurada con Cys.

La totalidad de los resultados precedentes, obtenidos con los inhibidores específicos de grupo, indican que la proteasa aislada exhibe un comportamiento típico de las proteasas cisteínicas (Fahrney & Gold, 1963), por lo que puede aseverarse que balansaína pertenece a este grupo de endopeptidasas.

4.5.6. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica

La determinación del efecto del pH sobre la actividad proteolítica se llevó a cabo según el protocolo descrito en 3.5.8 y los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.15.

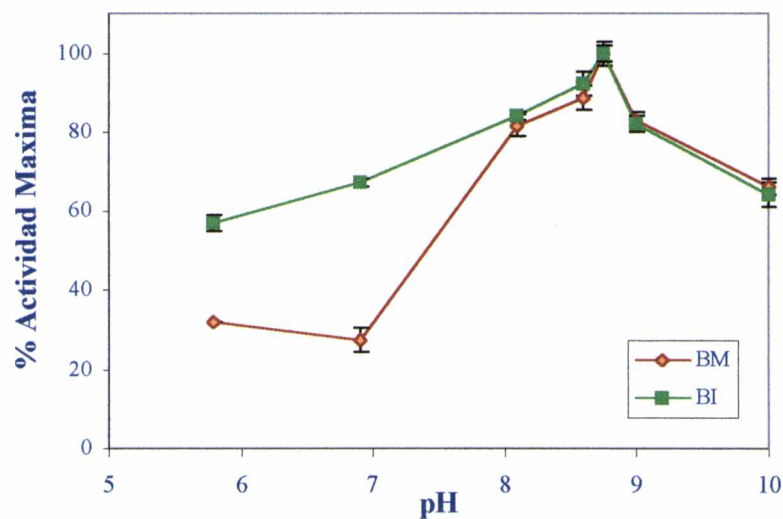


Fig. 4.15. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de balansaína.

Como podemos observar, los perfiles de pH para ambos extractivos de balansaína son similares, presentando valores de actividad enzimática considerables dentro de un muy amplio rango de pH (5,8-10). Entre los valores de pH 8 y 9 ambos extractivos presentan más de un 80% de su actividad máxima, la que se alcanza a pH 8,7. La amplitud del rango de pH en que la enzima es activa coincide con lo observado por Natalucci *et al.* (1988) en un trabajo preliminar realizado con extractos de frutos semimaduros de *Bromelia balansae*.

4.5.7. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la Actividad Proteolítica

Los ensayos del efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica se llevaron a cabo según el protocolo descrito en 3.5.9 y los resultados se presentan en la figura 4.16.

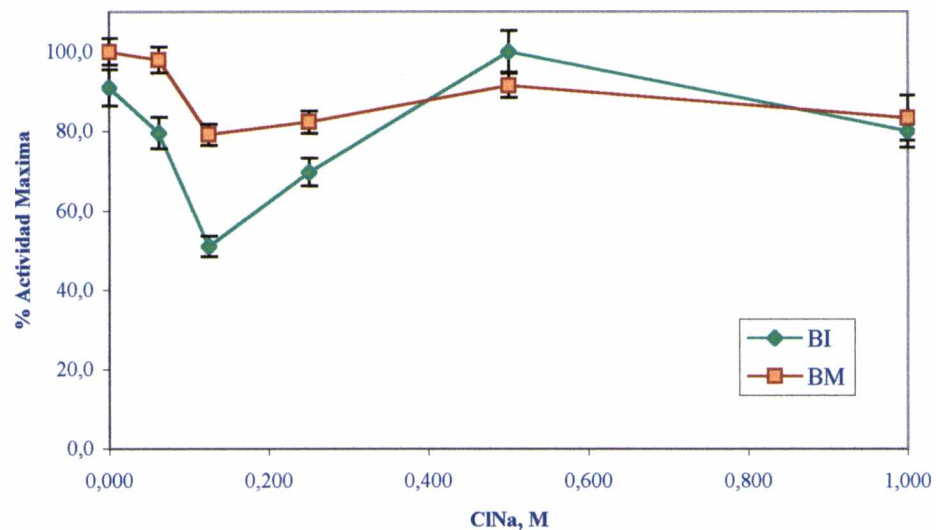


Fig. 4.16. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica de balansaina.

Como puede observarse en el gráfico, las muestras de balansaina provenientes tanto de frutos maduros como inmaduros presentan la mínima actividad proteolítica cuando son incubados con NaCl 0,125 mM; este descenso es mucho más pronunciado en el caso de la enzima obtenida a partir de frutos inmaduros. Puede suponerse que a la citada concentración salina se produce un cambio conformacional de las enzimas, lo que provoca una modificación en su capacidad catalítica. Por otra parte, ambos extractos de balansaina fueron estables a valores moderados de fuerza iónica, ya que no hubo cambios apreciables en la actividad proteolítica luego de incubar la enzima durante 30 minutos en NaCl 1M.

4.5.8. Estabilidad Térmica

Los ensayos se llevaron a cabo según protocolo descrito en 3.5.10. Los datos del experimento se resumen en la figura 4.17.

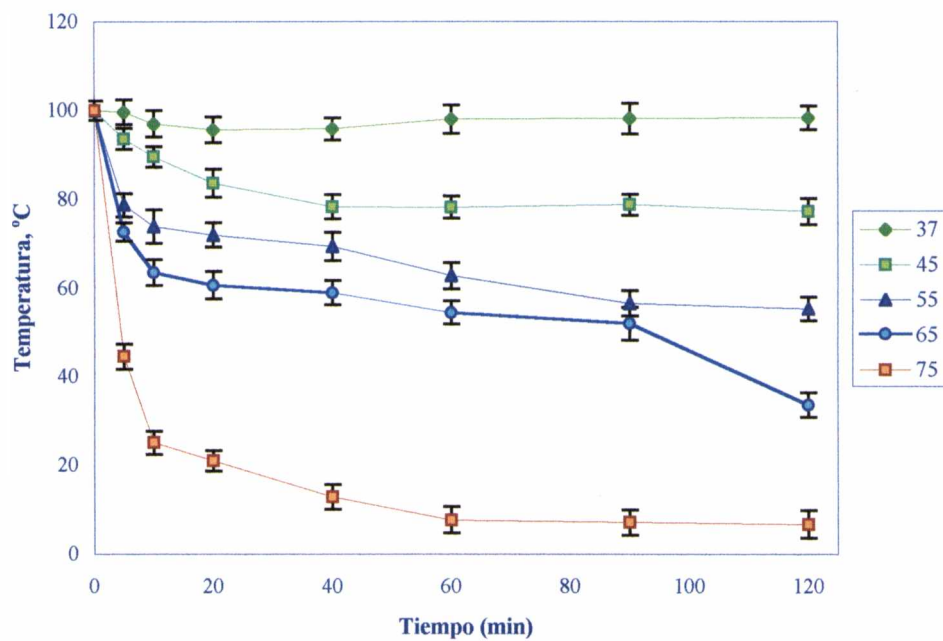


Fig. 4.17. Estabilidad de balansaina con la temperatura

Como puede observarse en el gráfico, los extractos de balansaina demostraron poseer una buena estabilidad térmica (datos de EPPM no mostrados), ya que no se observó disminución alguna de la actividad al incubarse a 37 °C durante 120 min, mientras que a 45 °C retuvo hasta un 80 % de la actividad caseinolítica. Balansaina fue desactivada casi por completo por calentamiento a 75 °C durante 60 min.

PARTE III

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE BALANSAINA I.

4.6. PURIFICACION CROMATOGRAFICA DE LA ENZIMA

4.6.1. Cromatografía de Intercambio Aniónico de Balansaina

La purificación de la principal fracción proteolítica presente en los extractos parcialmente purificados de balansaina provenientes de frutos inmaduros se inició por optimización de la cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose Fast Flow) según el protocolo descrito en 3.9. La selección de la estrategia de purificación se basó en los datos obtenidos por electroforesis (ítem 4.5.1) y por isoelectroenfoco con zimograma (ítem 4.5.2).

Se empleó un equipo de FPLC Pharmacia Biotech, buffer Tris-HCl 50 mM de diferentes valores de pH y gradientes lineales de NaCl. El primer paso de la optimización consistió en realizar variaciones en el pH del buffer (9; 8,5 y 8) y una vez lograda la mejor resolución se comenzó a modificar el gradiente de NaCl (0 a 1, 0 a 0,5 y 0 a 0,25 M). Empleando buffer de pH 8,0 y el gradiente más estrecho se logró la purificación casi total de la endopeptidasa (figura 4.19).

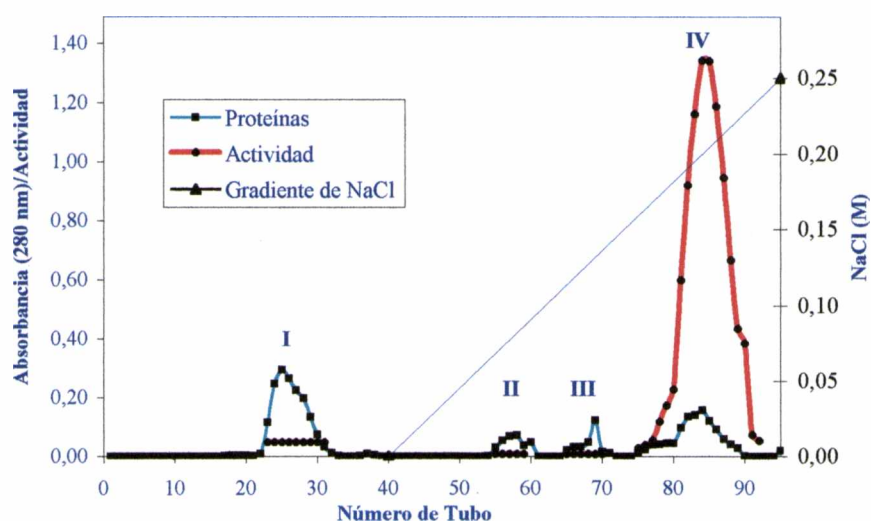


Fig. 4.19. Cromatograma de balansaina de frutos inmaduros.

Como puede observarse en la figura, mediante cromatografía de intercambio aniónico se obtuvo una fracción no retenida (I) conteniendo dos componentes, sólo uno de ellos con una pequeña actividad proteolítica demostrada a través de isoelectroenfoque-zimograma (datos no mostrados). La aplicación del gradiente lineal de NaCl 0-0,25 M permitió la separación de otras tres fracciones, de las cuales sólo la última (IV) presentó actividad caseinolítica, con elevados valores de actividad específica.

4.6.2. Recromatografía de la fracción IV

En función de los resultados obtenidos en la cromatografía anterior se procedió a recromatografiar la proteasa de pI ácido (fracción IV) utilizando la misma técnica pero disminuyendo el pH del buffer a 7,0. Los resultados se muestran en la figura 4.20.

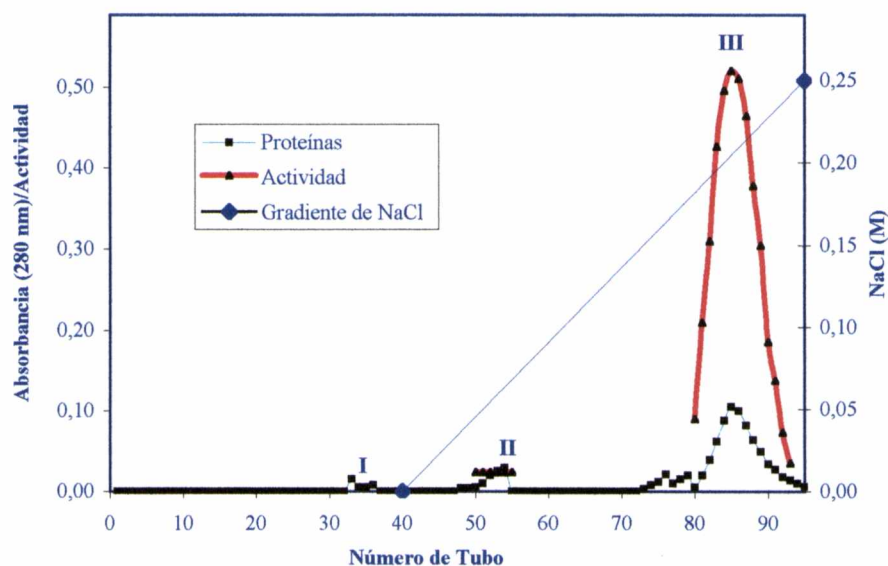


Fig. 4.20. Recromatografía de la fracción IV aislada a partir de balansaína.

Como puede observarse en la figura, la recromatografía permitió obtener 3 fracciones proteicas rindiendo una fracción principal (III) a la que denominamos balansaína I (tubos 80-93), que resultó pura empleando diferentes criterios: tamaño por SDS-PAGE (coloreado con azul de coomasie y con plata), pI por IEF y masa por espectrometría de masas, tal como se muestra más adelante.

4.6.3. Tabla de Purificación

El esquema de purificación de balansaína I se muestra en la tabla 4.6.

Paso de purificación	Actividad (Ucas)	Proteínas (mg)	Actividad específica (Ucas/mg)	Purificación (n-veces)	Rendimiento (%)
Extracto Crudo	340,0	9,6	35,4	1,0	100,0
EPP	312,8	8,0	39,1	1,1	92,0
Fracción activa (IV)	234,6	2,3	102,0	2,9	69,0
Balansaína I	164,2	1,6	102,6	2,9	48,3

Tabla 4.6. Tabla de purificación (Pardo *et al.*, 2000).

Se observa que el factor de purificación obtenido para esta enzima es bajo, hecho bastante común en plantas con un elevada actividad proteolítica, en donde las proteasas representan la mayor parte del contenido proteico del extracto crudo (López *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2000). El rendimiento de balansaína I es elevado (48,3%) lo que permite obtener una importante cantidad de balansaína I pura a partir de extractos crudos de frutos inmaduros.

4.7. CARACTERIZACION DE BALANSAINA I

4.7.1. Análisis de la Pureza y Determinación de PM de Balansaína I por SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis reductora y desnaturalizante (SDS – PAGE) de balansaína I según el protocolo descrito en 3.6.1. Se sembraron además, a efectos comparativos, los extractos crudos de frutos inmaduros y maduros así como los correspondientes extractos parcialmente purificados. Los perfiles electroforéticos pueden visualizarse en la figura 4.23.

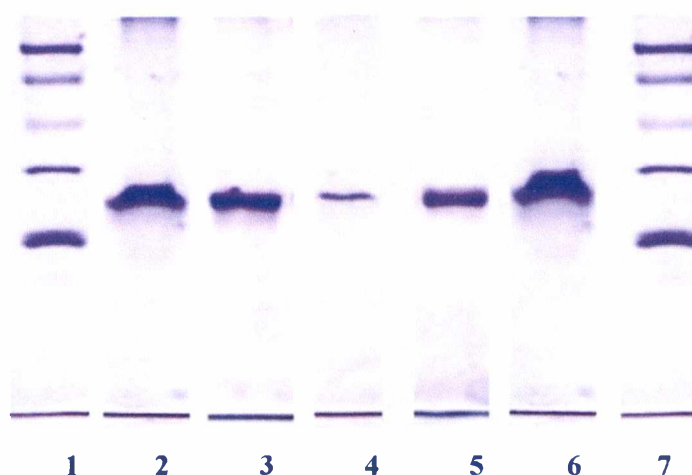


Fig. 4.23. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).
Carriles 1 y 7: patrones de PM; carril 2: ECI; carril 3: EPPi;
carril 4: balansaina I; carril 5: EPPM; carril 6: ECM.

Como se puede observar, en el carril 4 hay una única banda en balansaina I. Con el fin de confirmar los resultados se procedió a teñir con plata un gel corrido de la misma manera. La figura. 4.24 presenta estos resultados.

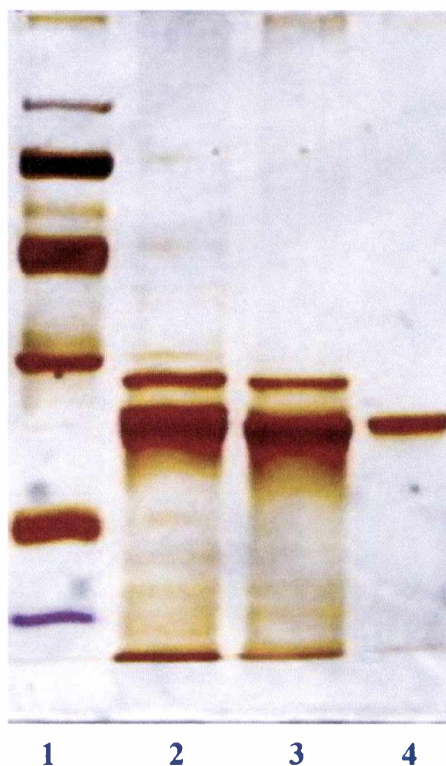


Fig. 4.24. Tinción con plata en geles de poliacrilamida. Carriles: 1 patrón de PM; 2: BM; 3: BI; 4: balansaina I.

Balansaina presentó una única banda con un PM de $25 \pm 0,5$ kDa calculado en base a los datos de su densitograma (ver figura 4.25). Este valor es del mismo orden que el hallado para otras proteasas de *Bromeliaceae* como hieronymaina I: 24 kDa (Bruno *et al.*, 2002), bromelaina de tallo: 24,5 kDa

(Harrach *et al.*, 1995), bromelaína de fruto: 25 kDa (Rowan *et al.*, 1990a), ananaina: 23,5 kDa (Rowan *et al.*, 1988; Napper *et al.*, 1994; Harrach *et al.*, 1995), comosaína: 24,5 kDa (Barret *et al.*, 1998), pingüinaína: 26 kDa- (Rowan *et al.*, 1990a), hemisfericina, karatasina, palmerina y silvestrisina: entre 22,5 y 24,8 kDa (Cruz *et al.*, 1974). Por su parte, el correspondiente extracto parcialmente purificado permite observar impurezas: una banda de mayor PM y una serie de bandas de menor PM eliminadas en la purificación cromatográfica.

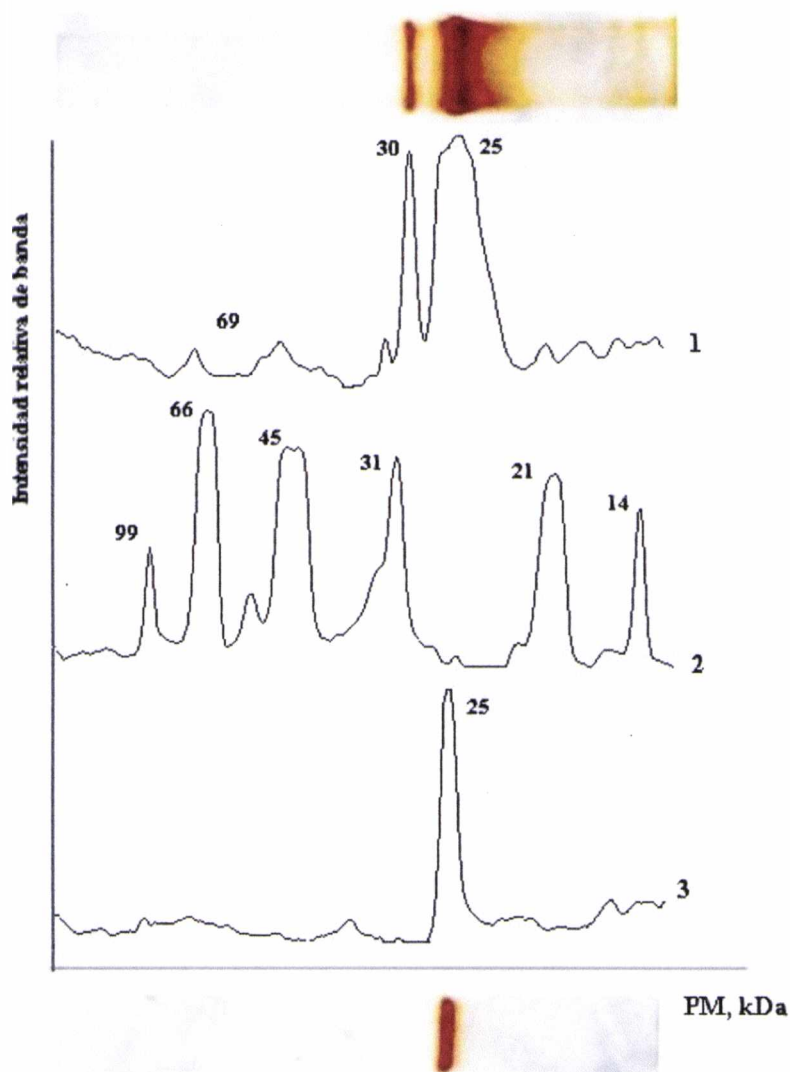


Fig. 4.25. Densitograma obtenido a partir de datos de la electroforesis anterior. 1: BI, 2: patrones de PM, 3: balansaina I. Los números sobre las bandas corresponden a los kDa de cada polipéptido.

4.7.2. Análisis de la Pureza y Determinación del pI de Balansaina I por IEF

Se realizaron isoelectroenfoces de las muestras de balansaina I según el protocolo descrito en 3.6.6. Los resultados de dichos isoelectroenfoces se muestran en la figura 4.26.

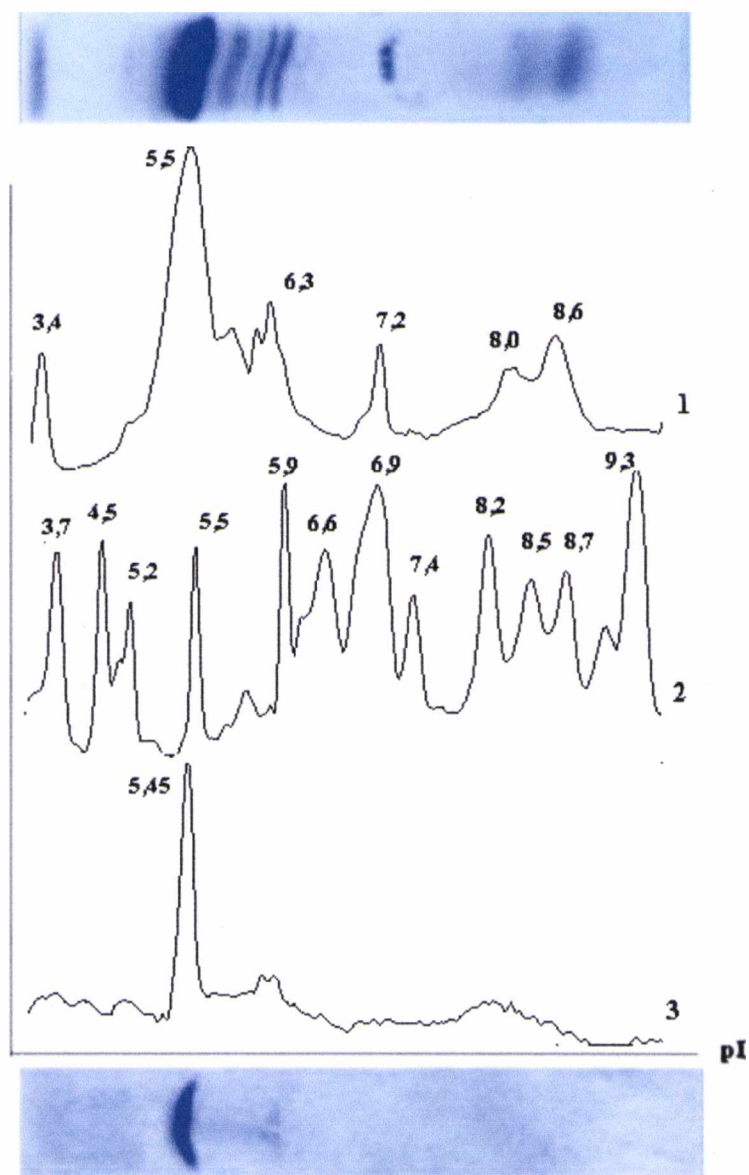


Fig. 4.26. Densitogramas a partir de datos de isoelectroenfoque.

1: BI, 2: patrones de pI, 3: balansaina I.

Como puede observarse en la figura, balansaina I muestra una única banda de pI 5,45 la cual, como ya se ha dicho anteriormente, se encuentra presente en cantidades apreciables durante todo el proceso de maduración.

4.7.3. Ensayo de la Actividad Esterolítica con Sustratos Sintéticos

Balansaina I presentó una marcada actividad endoesterásica frente a algunos de los N- α -CBZ-L-p-nitrofenil derivados de aminoácidos ensayados según el protocolo descrito en 3.5.2.1. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.21.

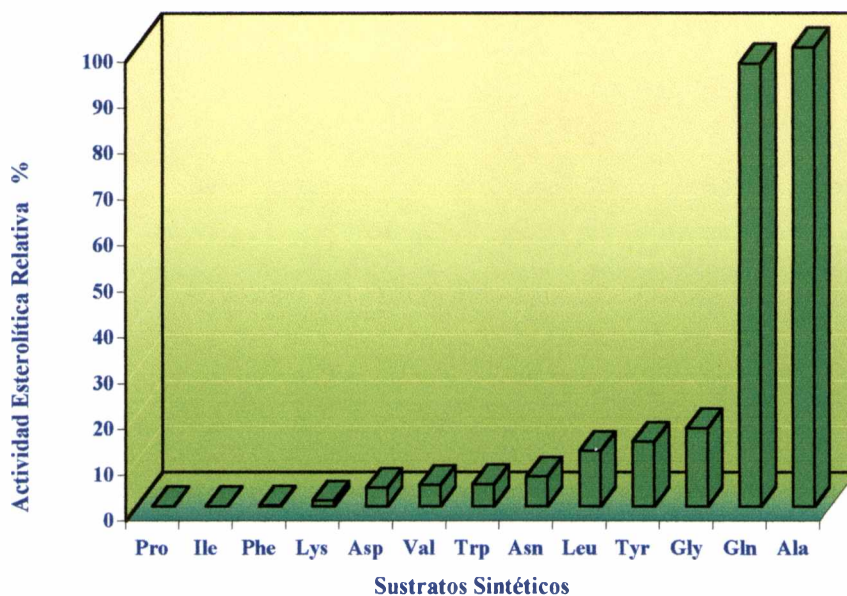


Fig. 4.21. Actividad esterolítica de balansaina I

Como puede observarse en la figura, balansaina I muestra la máxima actividad endoesterásica relativa con los derivados de alanina y glutamina, seguidos por los derivados de glicina, tirosina, y leucina (aproximadamente un quinto de la actividad lograda con el derivado de alanina) y en menor proporción con los derivados de asparagina, triptófano, valina y aspártico (aproximadamente una décima parte de la actividad lograda con el derivado de alanina).

4.7.4. Efecto del pH Sobre la Actividad Proteolítica

La determinación del efecto del pH sobre la actividad proteolítica de balansaina I se llevó a cabo según el protocolo descrito en 3.5.8. Los resultados del experimento se presentan en la figura 4.22.

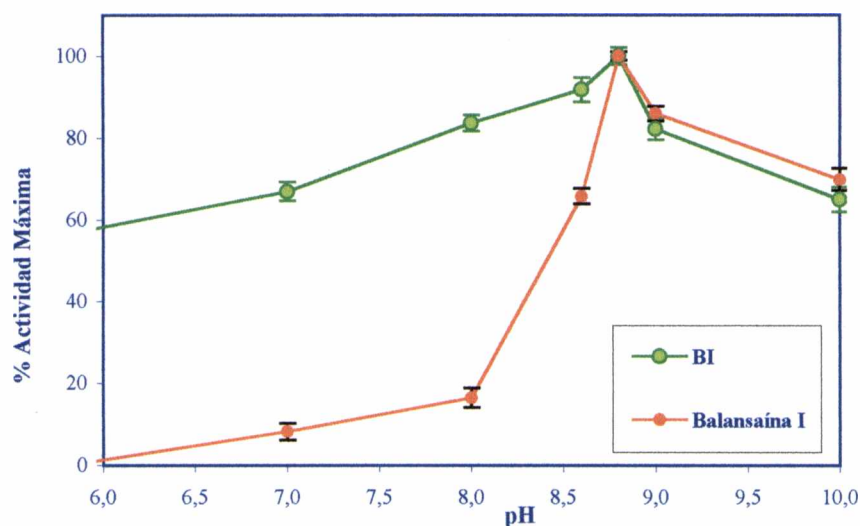


Fig. 4.22. Perfil de pH de balansaina I

Como puede observarse en la figura, balansaina I exhibió un pH óptimo de 8,8 igual al de los extractos parcialmente purificados de frutos inmaduros (EPPI) aunque con un perfil más estrecho. El 90 % de la actividad máxima se obtuvo entre 8,6 y 9,0. Otras endopeptidasas de *Bromeliaceae* cuyo pH óptimo se encuentra en valores similares son: hieronymaína I: 8,5 - 9,5 (Bruno *et al.*, 2002) y hemisfericina: 8,0 (Inei-Shizukawa *et al.*, 1976).

4.7.5. Efecto de Activadores e Inhibidores

La actividad proteolítica de balansaina I fue ensayada empleando inhibidores específicos de grupo según el protocolo descrito en 3.5.7.2. Los datos generales de inhibición se resumen en la tabla 4.7.

Reactivo	Concentración Efectiva, mM	% Actividad residual		
		pH 3	pH 6	pH 9
E-64	1	X	0	0
Hg ₂ Cl ₂	10	X	0	0
Iodoacetato	0,1	X	5	2
Pepstatina A	0,5	X	100	97
PMSF*	5	X	23	32
1,10 fenantrolina	10	X	98	96

Tabla 4.7. Acción de inhibidores sobre la actividad proteolítica de balansaina I. *La inhibición se revierte con el agregado de cisteína. En la columna correspondiente a pH 3 la X indica que la enzima no es activa en esas condiciones

Como puede observarse en la tabla, balansaína I fue inhibida en forma total por E-64, cloruro mercúrico y en forma prácticamente total por iodoacetato, todos ellos inhibidores característicos del grupo de endopeptidasas cisteínicas. Por su parte la pepstatina A (inhibidor de endopeptidasas aspárticas) y la 1,10-fenantrolina (inhibidor de metaloendopeptidasas) no producen inhibición significativa, en tanto que la inactivación parcial producida por PMSF (inhibidor irreversible de endopeptidasas serínicas) es completamente revertida por cisteína. Los resultados obtenidos confirman que balansaína I es una endopeptidasa cisteínica.

4.7.6. Detección de Glicoproteínas en Geles de Poliacrilamida

Empleando la técnica desarrollada por Fairbanks *et al.* (1971) y modificada luego por Dubray & Bezard (1982) descrita en 3.6.7.2 y por la técnica de Oakley *et al.* (1980) modificada por Dubray & Bezard (1982) se ensayó el posible carácter glicoproteico de balansaína I. Los geles fueron corridos según la técnica descrita en 3.6.1. No se ha podido comprobar glicosilación de la proteína por ninguna de estas técnicas en las muestras de balansaína I ensayadas. Es importante mencionar que la glicosilación no es una característica constante en las fitoendopeptidasas, como lo demuestra el hecho de que bromelaína y comosaína son glicosiladas pero no ananaína, proviniendo las tres proteasas del mismo material vegetal (tallos de *Ananas comosus* L., según Barret *et al.*, 1998).

4.7.7. Espectrometría de Masas

Balansaína I resultó pura al ser analizada por espectrometría de masas. Se utilizó un espectrómetro MALDI-TOF para la determinación de su masa molecular y se emplearon tripsinógeno y carboxipeptidasa B como patrones según el protocolo descrito en 3.10. El resultado del experimento se muestra en la figura. 4.27.

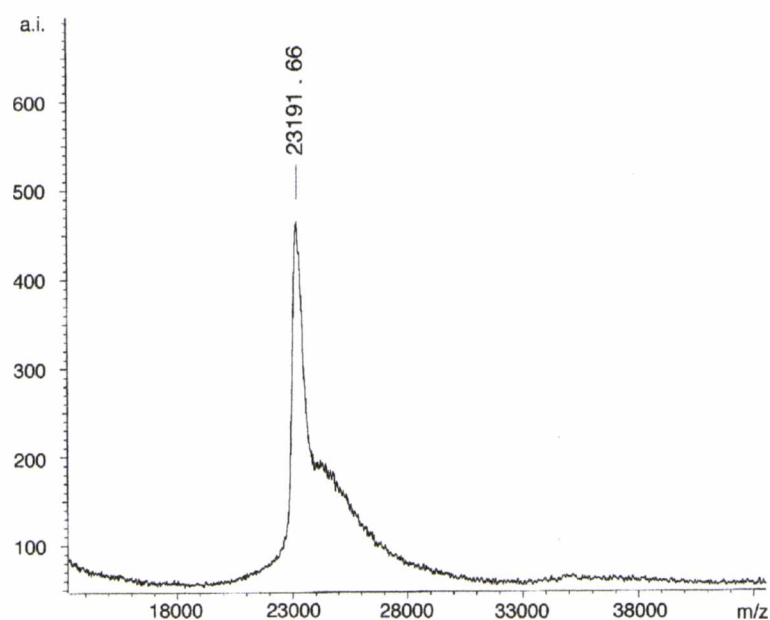


Fig. 4.27. Espectro de masas de balansaína I.

Como puede observarse en la figura, la masa molecular de balansaína I obtenida por este método es 23,192 kDa, el que coincide aceptablemente con el resultado obtenido por SDS-PAGE y es concordante con los reportados para las proteasas del resto de las Bromeliáceas estudiadas, tal como se indicó anteriormente.

4.7.8. Determinación de la secuencia N-terminal

La secuencia del péptido N-terminal de balansaína I obtenida (21 aminoácidos) fue AVPESIDWRDYGAVTSVKNQG y se muestra en la Tabla 4.7 comparada con sesenta y cinco proteasas de origen vegetal que exhiben más del 50% de identidad con ella. La búsqueda de homologías se realizó en base al servicio BLAST (blastp), disponible en internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Resultados y Discusión 124

Denominación de la Proteasa. Fuente Vegetal	Secuencia N-terminal	Identidad (%)
Balansaina I, <i>Bromelia balansae</i> (Pardo et al., 2000)	AVPESIDWRDYGAVTSVKNQG	100,0
Bromelaina, <i>Ananas comosus</i> (Rijionja et al., 1989)	AVPQSIDWRDYGAVTSVKQN	90,5
Ananaina, <i>Ananas comosus</i> (Lee et al., 1997)	-VPQSIDWRDYGAVTSVKNQG	85,7
Comosaina, <i>Ananas comosus</i> (Napper et al., 1994)	-VPQSIDWRNYGAVTSVKNQG	85,7
Macrodontaina I, <i>Pseudananas macrodontes</i> (López et al., 2000)	AVPQSIDWRDYGAVNEVKNQG	85,7
Bromelaina de fruto, <i>Ananas comosus</i> (Muta et al., 1997)	AVPQSIDWRDYGAVNEVKNQN	81,0
Macrodontaina II, <i>Pseudananas macrodontes</i> (López et al., 2000)	AVPQSIDWRDYGAVNEVKNQN	81,0
Sin denominación, <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (Firsthoefel et al., 1998)	EVPRSIDWRVKGAVTPVKNQG	76,2
CC-III, <i>Carica candamarcensis</i> (Jaziri et al., 1994)	-YPESIDWRKKGAVTPVKNQG	76,2
CC-IV, <i>Carica candamarcensis</i> (Walreavens et al., 1993)	-YPESIDWRKKGAVTPVKNQG	76,2
Sin denominación, <i>Pseudotsuga mentzesii</i> (Tranbarger & Misra, 1996)	DLPESIDWREKCAVTAVKNQG	76,2
Hieronymaina I, <i>Bromelia hieronymi</i> (Bruno et al., 2002)	ALPESIDWRKAKGAVTEVKRQD	71,4
Quimopapaina o papaya peptidasa II, <i>Carica papaya</i> (Watson et al., 1990)	-YPQSIDWRKAKGAVTPVKNQG	71,4
Sin denominación, <i>Vicia sativa</i> (Becker et al., 1997)	-VPSSIDWRNKGAVTGKDKQG	71,4
Sin denominación, <i>Arabidopsis thaliana</i> (Koizumi et al., 1993)	-LPESIDWRKKGAVAEVKDKQG	71,4
Sin denominación, <i>Arabidopsis thaliana</i> (Koizumi et al., 1993)	--PEDFDWRDHGAVTPVKNQG	71,4
Sin denominación, <i>Arabidopsis thaliana</i> (Williams et al., 1994)	-LPEEFDWRDRGAVTPVKNQG	71,4
Sin denominación, <i>Ricinus communis</i> (Schmid et al., 1998)	-VPASVDWRKKGAVTSVKDKQG	71,4
Papaina, <i>Carica papaya</i> (Cohen et al., 1986)	-IPEYVDWRQKGAIVPVKNQG	66,7
Sin denominación, <i>Zingiber officinale</i> (Choi & Laursen, 2000)	VIPEIDWREKGAIVPVKNQG	66,7
Sin denominación, Clon CYP-7 de <i>Nicotiana tabacum</i> (Linthorst et al., 1993)	DLPADFDWRDHGAVTGKDKQG	66,7

Sin denominación. Clon CYP-8 de <i>Nicotiana tabacum</i> (Linthorst <i>et al.</i> , 1993)	DLPADYDWRDHGAVTGVKNOG	66,7
Sin denominación. <i>Phaseolus vulgaris</i> (Tanaka <i>et al.</i> , 1991)	SVFPSVDWRKKGAVTDVKDQG	66,7
Oryzina β , <i>Oryza sativa</i> (Watanabe <i>et al.</i> , 1991)	-LPEsvDwREKGAVALPVKNQG	66,7
Sin denominación. <i>Arabidopsis thaliana</i> (Funk <i>et al.</i> , 2002)	KVPDSVDWRKKGAVTNVVKDQG	66,7
Sin denominación. <i>Alnus glutinosa</i> (Goetting-Minesky & Mullin, 1994)	AVPSAMDWRMKGAVTPVKDQG	66,7
Sin denominación. <i>Solanum melongena</i> (Xu & Chye, 1999)	DLPEDFDwREKGAVTGVKNOG	66,7
Papaina, <i>Carica papaya</i> (Cohen <i>et al.</i> , 1986)	-IPEYVDWRQKGAVTPVKNOG	66,7
Sin denominación. <i>Vigna mungo</i> (Yamuchi <i>et al.</i> , 1992)	-VPAsvDwRKKGAVTDVKDQG	66,7
Glicilendopeptidasa, <i>Carica papaya</i> (Buttle <i>et al.</i> , 1990)	-LPEsvDwRAKGAVTPVKHQG	66,7
Sin denominación. <i>Zinnia elegans</i> (Ye & Varner, 1996)	DLPKsvDwRKKGAVSPVKNOG	61,9
Sin denominación. <i>Zea mays</i> (Domoto <i>et al.</i> , 1995)	--PDDFDWRDHGAVGPVKNOG	61,9
Oryzina α , <i>Oryza sativa</i> (Watanabe <i>et al.</i> , 1991)	ALPEsvDwRtKGAVAEIKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Zea mays</i> (Pechan <i>et al.</i> , 1999)	DLPEsvDwRAKGAVAEIVKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Vigna mungo</i> (Okamoto <i>et al.</i> , 2001)	NLPKDFDWRDKGAVTNVVKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Brassica napus</i> (Wan <i>et al.</i> , 2002)	ALPISVDWRKKGAVTPIKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Lycopersicon pennellii</i> (Kruger <i>et al.</i> , 2002)	DMPsNLDwRESGAVTQVKNOG	61,9
Sin denominación. <i>Brassica napus</i> (Noh & Amasino, 1999)	ALPsvDwRKKGAVTPIKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Glycine max</i> (Nong <i>et al.</i> , 1995)	PLPENFDwREKGAVTEVKLQG	61,9
Sin denominación. <i>Dianthus caryophyllus</i> (Jones <i>et al.</i> , 1995)	-LPEsvDwRKKGAVSHVVKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Hordeum vulgare</i> (Mikkonen <i>et al.</i> , 1996)	DLFPsvDwRQKGAVTGVKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Pisum sativum</i> (Granell <i>et al.</i> , 1992)	KLPEsvDwRKEGAVVGVKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Astragalus sinicus</i> (Naito <i>et al.</i> , 2000)	TVPSNVdWRQKGAVTPVKDQG	61,9
Phytolacaina R, <i>Phytolacca americana</i> (Kaneda <i>et al.</i> , 1995)	NLPsYIDwRNnyAVTPVKNOG	61,9

Sin denominación. <i>Vicia sativa</i> (Becker <i>et al.</i> , 1994)	NLPEDFDWREKCAVTPVKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Pisum sativum</i> (Guerrero <i>et al.</i> , 1990)	NLPEDFDWREKCAVTPVKDQG	61,9
Sin denominación. <i>Zea mays</i> (Pechan <i>et al.</i> , 1999)	DLPDAIDWRQLGAVTEVKDQQ	57,1
CC-II, <i>Carica candamarcensis</i> (Walreavens <i>et al.</i> , 1993)	-YFGSVDWRQKCAVTPVKDON	57,1
Sin denominación. <i>Vicia faba</i> (Yu & Greenwood, 1994)	NLPEDFDWREKCAVTPVKDQG	57,1
Sin denominación. <i>Nicotiana tabacum</i> (Ueda <i>et al.</i> , 2000)	VLPETKDWREACIVSPVKNQG	57,1
Sin denominación. <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (Kruger <i>et al.</i> , 2002)	YMPSNLDWRESGAVTQVKHQG	57,1
Aleuraina. <i>Hordeum vulgare</i> (Rogers <i>et al.</i> , 1985)	ALPETKDWREDCIVSPVKNQA	57,1
Sin denominación. <i>Lycopersicon esculentum</i> (Kruger <i>et al.</i> , 2002)	YMPSNLDWRESGAVTQVKHQG	57,1
Sin denominación. <i>Oryza sativa</i> (Kato & Minamikawa, 1996)	DLPRAVDWRKCAVTVKDKQG	57,1
Sin denominación. <i>Oryza sativa</i> (Ho <i>et al.</i> , 2000)	DLPRAVDWRKCAVTVKDKQG	57,1
Sin denominación. <i>Lycopersicon esculentum</i> (Harrak <i>et al.</i> , 2001)	SLPESIDWREKCVLVGVKDKQG	57,1
Sin denominación. <i>Arabidopsis thaliana</i> (Hensel <i>et al.</i> , 1993)	ALPETKDWREDCIVSPVKDQG	57,1
Araujia h II, <i>Araujia hortorum</i> (Obregón <i>et al.</i> , 2001)	-VPDSIDWREKDAVLPVIRNQG	57,1
Caricaina, <i>Carica papaya</i> (Revell <i>et al.</i> , 1993)	NLPENVDWRRKCAVTPVRRHQG	57,1
Sin denominación. <i>Arabidopsis thaliana</i> (Sato <i>et al.</i> , 2000)	-LPENVDWRRKCAVTPVRRHQG	57,1
Sin denominación. <i>Prunus armeniaca</i> (Mbegue-A-Mbague <i>et al.</i> , 1997)	VLPESKNWRREECIVTPVKDQG	57,1
Sin denominación. <i>Solanum tuberosum</i> (Avrova <i>et al.</i> , 1999)	SLPESVDWRDKCVLVGVKDKQG	52,4
Thaumatopaina, <i>Thaumatococcus daniellii</i> (Cusack <i>et al.</i> , 1991)	NLPNSVDWRRKCAVAAVKNOR	52,4
Sin denominación. <i>Lolium multiflorum</i> (Li <i>et al.</i> , 2000)	ALPETKDWRETCIVSPVKDQA	52,4
Oryzaina γ, <i>Oryza sativa</i> (Watanabe <i>et al.</i> , 1991)	-LPETKDWREDCIVSPVKDQG	52,4
Sin denominación. <i>Lycopersicon esculentum</i> (Drake <i>et al.</i> , 1996)	VLPETKDWREKCVIVSPVKAQG	52,4

Tabla 4.7. Comparación de las secuencias N-terminal de balansaina I con otras endopeptidasas de origen vegetal.

Balansaína I exhibió un 90,5% de identidad con bromelaína, la endopeptidasa mayoritaria de tallos de *Ananas comosus* (*Bromeliaceae*), que es una de las proteinasas de origen vegetal de mayor aplicación biotecnológica. Al compararla con las dos proteasas minoritarias de tallo de ananá (ananaína y comosaína) la diferencia es de 3 aminoácidos (85,7% de identidad), presentando la misma diferencia con macrodontaína I. En cuanto a bromelaína de fruto y macrodontaína II difiere en 4 aminoácidos (81% de identidad). Como podemos concluir del análisis anterior, la mayoría de las endopeptidasas de la familia *Bromeliaceae* estudiadas presentan la más elevada identidad entre su péptido N-terminal y el de balansaína. La excepción (con 6 aminoácidos diferentes) la constituye hieronymaína I, una cisteinendopeptidasa aislada de frutos de *Bromelia hieronymi*, especie perteneciente al mismo género que la especie estudiada en este trabajo.

En el caso de papaína, la enzima tipo de este grupo (Clan CA y familia C1), el grado de identidad (66,7%) no es demasiado elevado, siendo la diferencia de siete residuos; otra de las proteasas de *Carica papaya*, quimopapaína, presenta un grado de identidad algo mayor (71,4%).

Un aspecto destacable es el grado de conservación de algunos motivos de los extremos N-terminales analizados. El motivo DWR (7-9, de acuerdo a la numeración de balansaína) está presente en la casi totalidad de las cisteinilpeptidasas analizadas, con la sólo excepción de las proteasas de *Prunus armeniaca* y de *Thaumatococcus daniellii*. Por su parte, el motivo GAV (12-14) se presenta en 54 de los 66 péptidos analizados, siendo notorio que en la mayoría de los casos en que no hay identidad Ala es reemplazada por Ile. En cuanto al motivo VKNQG lo podemos hallar en 35 casos y, considerando los dos primeros residuos (VK), sólo están ausentes en siete péptidos y en todos los casos son reemplazados por aminoácidos de igual característica (100% de positividades). La presencia de Pro en la posición 3 de todas las endopeptidasas analizadas se justifica por su función previniendo la proteólisis del extremo amino por medio de aminopeptidasas (exopeptidasas) que son incapaces de actuar sobre uniones Xaa-Pro.

PARTE IV

APLICACIONES DE BALANSAINA

4.8. HIDRÓLISIS CONTROLADA DE PROTEÍNAS DE SOJA

4.8.1. Determinación del Grado de Hidrólisis de Proteínas de Soja

Utilizando concentrados de soja como sustrato según el protocolo descrito en 3.7.1, se determinó en primer término el grado de hidrólisis (GH) producido por balansaina a diferentes valores de pH. Los resultados del experimento se muestran en la figura 4.28.

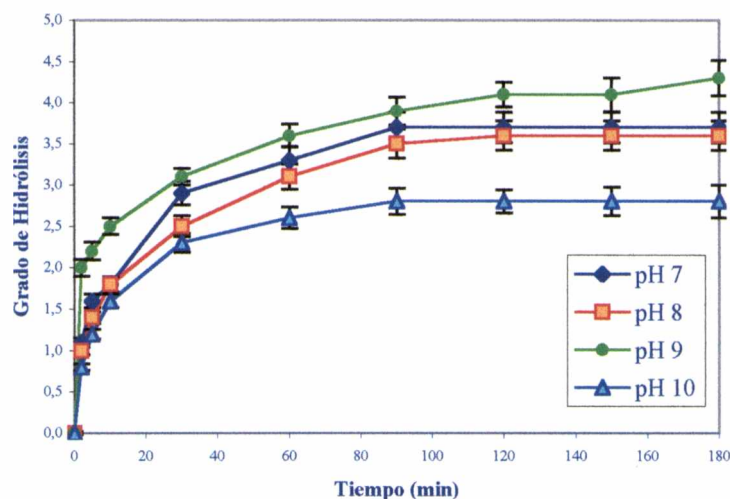


Fig. 4.28. Grado de hidrólisis de proteínas de soja a distintos valores de pH utilizando balansaina como enzima proteolítica.

Como puede observarse en la figura, los valores más elevados del GH de los concentrados de soja utilizando balansaina como enzima proteolítica se obtuvieron a pH 9,0. Ese valor de pH fue el elegido para la comparación del GH de balansaina con otras proteasas. Los resultados de la comparación se muestran en la figura 4.29.

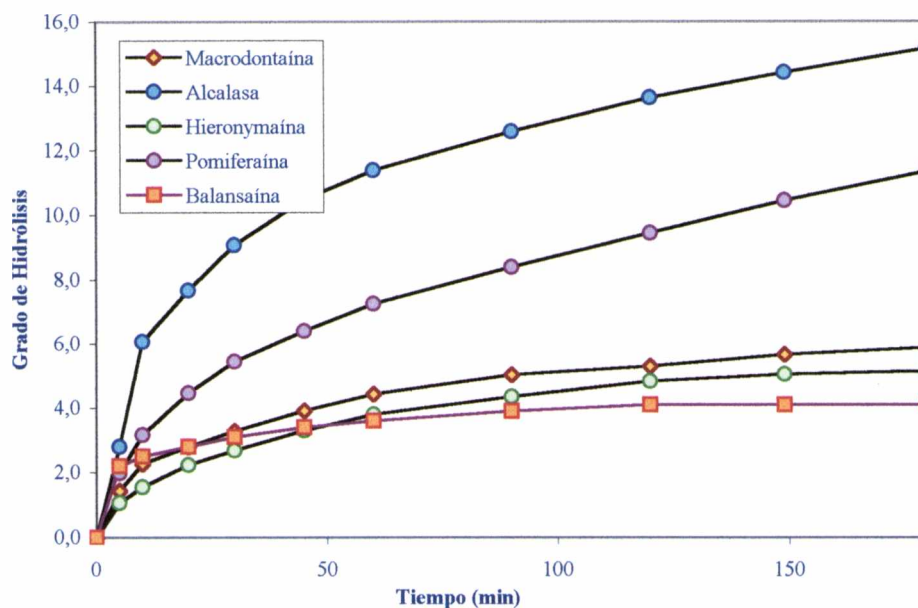


Fig. 4.29. Grado de hidrólisis de balansáina y otras endopeptidasas.

Como puede observarse en la figura, luego de 5 min el GH alcanzado con balansáina fue similar al obtenido con macrodonatáina (2%). Después de 180 min de el GH alcanzó un valor de 15% en el caso de alcalasa (proteasa serínica), en tanto que los valores obtenidos con las proteasas cisteínicas (balansáina, hieronymaína y macrodonatáina, todas cisteínproteasas) sólo alcanzaron valores comprendidos entre 4 y 6 %. Como hemos dicho, balansáina exhibió un comportamiento similar al de las otras dos proteasas de tipo cisteínico.

4.8.2. Análisis Electroforético de los Péptidos Obtenidos

Al analizar el patrón de péptidos obtenidos por electroforesis de muestras de hidrolizados de concentrados de soja utilizando balansáina como enzima proteolítica, pudo observarse una degradación preferencial de algunas de las fracciones proteicas respecto a otras, a un determinado tiempo de hidrólisis y en condiciones óptimas de reacción de la enzima. El resultado de la electroforesis se muestra en la figura 4.30.

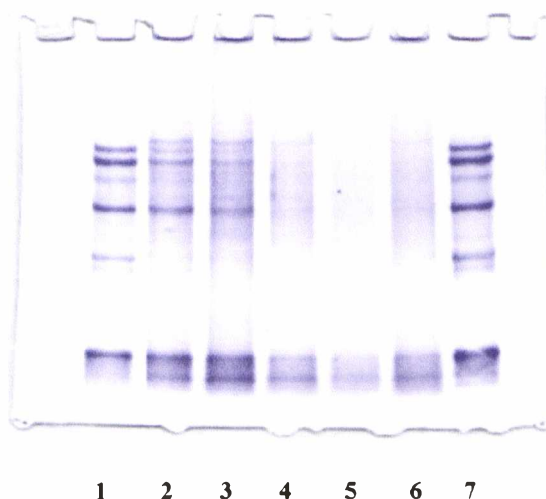


Fig. 4.30. Electroforesis en gradiente de hidrolizados de soja. Carriles 1 y 7: concentrado de soja a tiempo cero. Carril 2: 2 min. Carril 3: 10 min. Carril 4: 30 min. Carril 5: 90 min. Carril 6: 180 min.

Como puede observarse en la figura, el patrón de péptidos obtenidos a los 2 min de hidrólisis mostró una degradación parcial de las bandas α' , α y β (fracción 7S) y del polipéptido A, pero no del B (fracción 11S). A los 180 min, sólo la banda B y polipéptidos menores a 15 kDa pudieron evidenciarse. El densitograma correspondiente a la electroforesis se muestra en la figura 4.31.

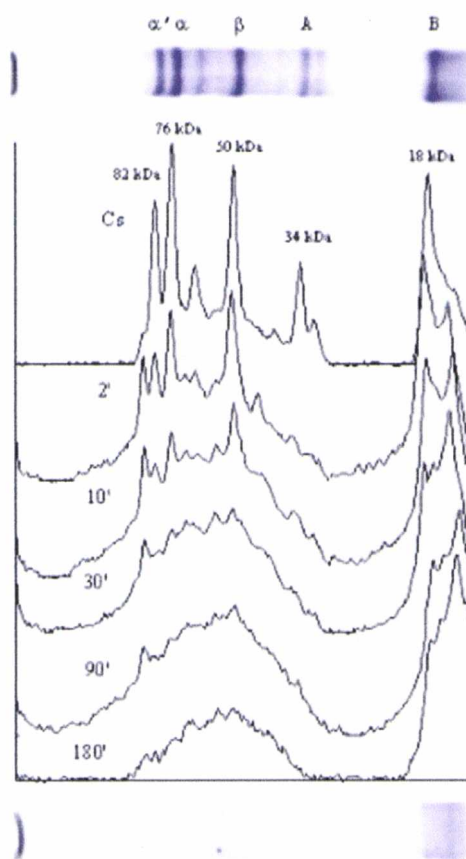


Fig. 4.31. Densitogramas correspondientes a los hidrolizados de soja con balansaína.

El análisis de las áreas de los densitogramas correspondientes a los 2 min de hidrólisis confirmaron la degradación parcial de las bandas α' , α y β de la fracción 7S y del polipéptido A, pero no del B (fracción 11S) tal como se comentó anteriormente. La hidrólisis del polipéptido B comenzó a ser detectada a los 10 min de transcurrida la reacción. A los 180 min se observó la aparición de polipéptidos menores a 15 kDa y el polipéptido B degradado en al menos un 35%. Los péptidos y aminoácidos menores a 10 kDa no son detectados por este método. Los valores calculados para las áreas de cada fracción se muestran en la figura 4.32.

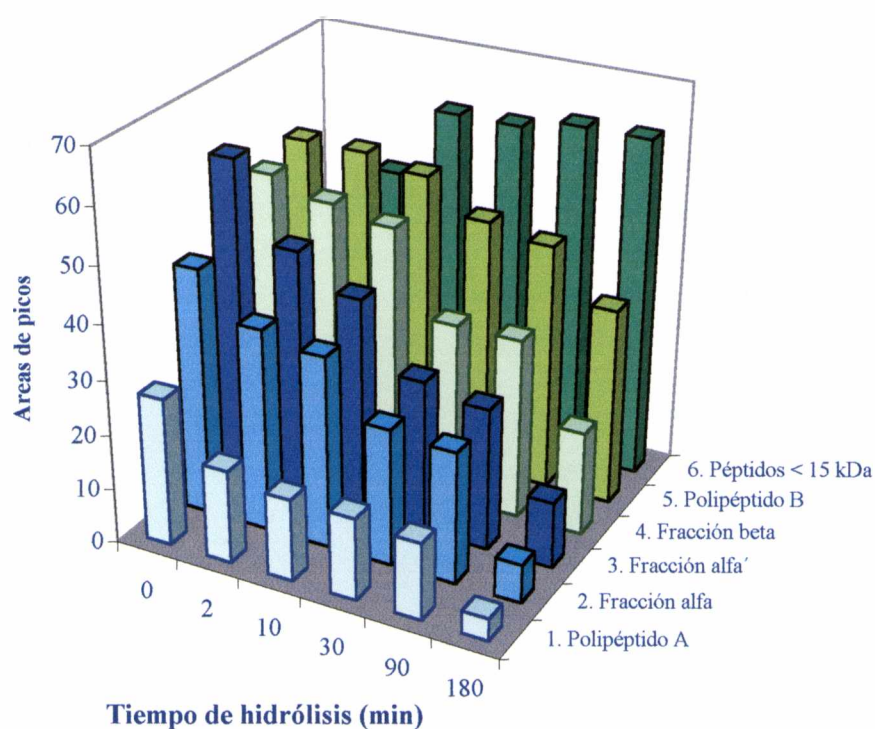


Fig. 4.32. Análisis de los densitogramas de los hidrolizados de soja.

4.9. HIDRÓLISIS CONTROLADA DE PROTEÍNAS LÁCTEAS

4.9.1. Determinación del Grado de Hidrólisis de Caseínas Bovinas y Análisis por SDS-PAGE de los Péptidos Obtenidos

Los valores de GH al pH óptimo de balansaina utilizando caseínas bovinas como sustrato (el valor fue determinado en 4.5.6) se determinaron según el protocolo descrito en 3.7.2. La curva de hidrólisis se muestra en la figura 4.33.

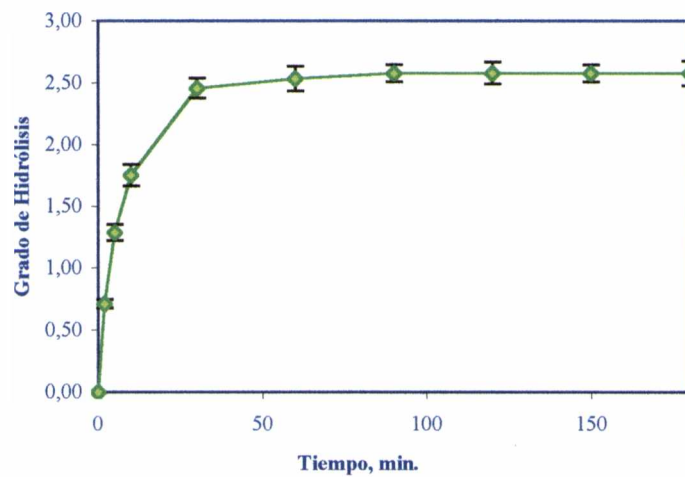


Fig. 4.33. Grado de hidrólisis de caseínas bovinas.

La hidrólisis se realizó al pH óptimo para la caseína (pH 9,0). Como puede observarse en la figura, la hidrólisis progresó hasta los 30 min luego del cual el GH se mantuvo prácticamente constante .

Para cada uno de los tiempos de hidrólisis graficados en la figura anterior se tomaron muestras por duplicado y se efectuaron las electroforesis de las mismas por SDS-PAGE, según los protocolos descritos en 3.7.2.2 y 3.6.1. El análisis densitográfico se muestra en la figura 4.34.

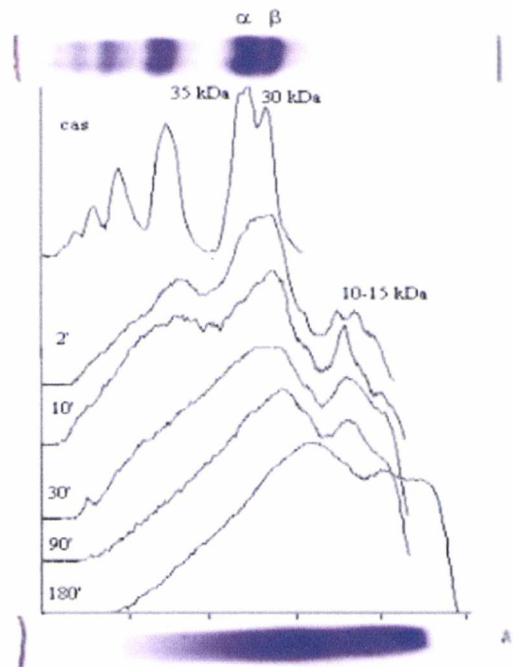


Fig. 4.34. Densitogramas de la electroforesis por SDS-PAGE de los hidrolizados de caseínas

Como puede observarse en la figura, el patrón de hidrólisis obtenido demostró la existencia de velocidades diferenciales de proteólisis para cada una de sus principales fracciones componentes (α y β caseínas) con una degradación preferencial de las fracciones α respecto a las β a un determinado tiempo de hidrólisis en condiciones óptimas de reacción de la enzima. De todas formas se decidió utilizar otro sistema electroforético para futuros análisis que permitiese una mejor separación de las bandas y la visualización de los péptidos de menor PM dado que la resolución obtenida con este sistema electroforético no fue buena. También se puso a punto una nueva técnica de hidrólisis en tubo que simplificó la obtención de los hidrolizados.

4.9.2. Hidrólisis de Proteínas Lácteas: Selección del Método Electroforético más Adecuado para el Análisis de las Proteínas Lácteas y sus Hidrolizados

Se efectuó una comparación entre los tres sistemas electroforéticos principales hallados en bibliografía (SDS-PAGE, UREA-PAGE y SDS-Tricina-PAGE) para establecer cuál de ellos era el más adecuado para mostrar las distintas fracciones proteicas de la leche y sus hidrolizados con la mejor definición.

4.9.2.1. Análisis por SDS-PAGE

Los métodos basados en SDS-PAGE (3.6.1) se han utilizado con relativo éxito en el estudio de las hidrólisis de proteínas lácteas por bromelaína (Gallaher *et al.*, 1994) o para determinar la relación caseína-suero en productos lácteos (Basch *et al.*, 1985), aunque este sistema ha sido utilizado con algunas limitaciones (Shalabi & Fox, 1987) tal vez por la baja movilidad electroforética mostrada por las mencionadas proteínas (en especial la fracción α_{s1} -) en presencia de SDS (Creamer & Richardson, 1984; Strange *et al.*, 1992). Un ejemplo de la resolución que hemos obtenido con este método se muestra en la figura 4.35. El análisis de los datos obtenidos se realizó por densitografía según la técnica descrita en 3.6.8.3.

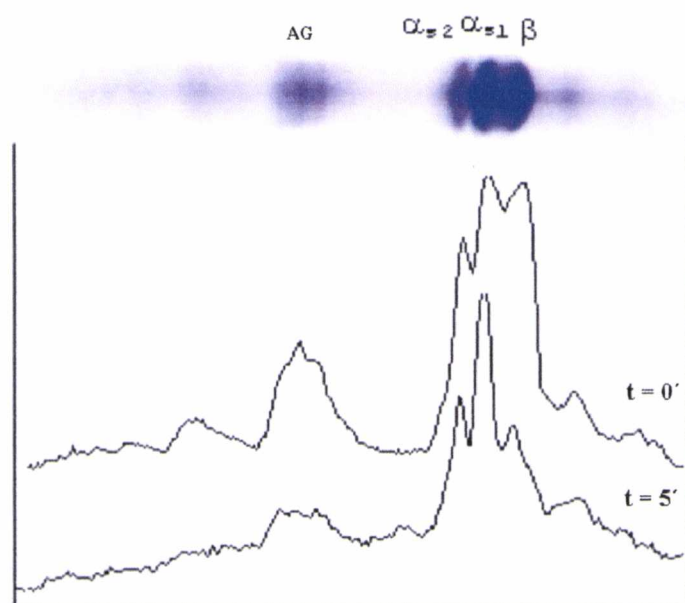


Fig. 4.35. Electroferograma y densitograma de caseínas por SDS-PAGE. $t = 0'$: muestra de caseínas sin hidrolizar; $t = 5'$: muestra obtenida a los 5 min de hidrólisis con balansaína. AG: agregados moleculares.

Como puede observarse en la figura, el patrón de hidrólisis obtenido presenta una baja resolución en la región de las α y β caseínas, con formación de agregados de alto peso molecular. Tampoco fue buena la resolución lograda para los hidrolizados obtenidos con balansaína (ver $t=5'$). Debido a estos resultados se decidió probar otros sistemas electroforéticos.

4.9.2.2. Análisis por Urea-PAGE y SDS-Tricina-PAGE

Tradicionalmente, los métodos basados en Urea-PAGE se han preferido para el estudio de proteínas lácteas (Shalabi & Fox, 1987; Andrews, 1983) debido a que la urea como agente disociante previene la formación de agregados moleculares. Sin embargo, hemos podido demostrar una mejor resolución de las mencionadas proteínas utilizando SDS-Tricina-PAGE (Pardo & Natalucci, 2002), tal como se muestra en la figura 4.36.

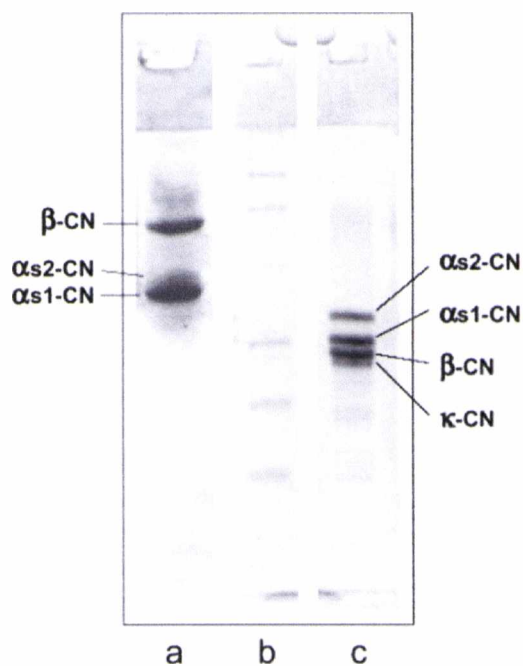


Fig 4.36. Electroferogramas de caseínas bovinas obtenidas por Urea-PAGE (calle a) y SDS-Tricina-PAGE (calle c). Calle b: patrones de bajo PM. CN= caseína..

Como puede observarse en la figura, en el gel de Urea-PAGE se obtiene una pobre resolución en las condiciones de ensayo (3.6.5), las bandas son gruesas y por lo general difusas, especialmente en la región de las α_s -caseínas (α_s -CN) donde no pueden distinguirse las fracciones α_{s2} - y α_{s1} . Además es difícil de detectar la κ - caseína (κ -CN). Por el contrario en la separación obtenida por SDS-Tricina-PAGE (3.6.3) se distinguen claramente las fracciones α_{s2} -, α_{s1} -, β - y κ -CN.

Una característica de la electroforesis realizada con tricina es que tanto α_{s1} - como β -CN presentan una velocidad electroforética diferente respecto a las que se observan en el sistema Urea-PAGE, debido a la presencia de SDS en el sistema. Su alta resolución, mejor aun que un sistema incluyendo tricina y urea (datos no mostrados) justifica plenamente su elección para el análisis de caseínas. El análisis densitográfico (3.6.8.3) se muestran en la figura 4.37.

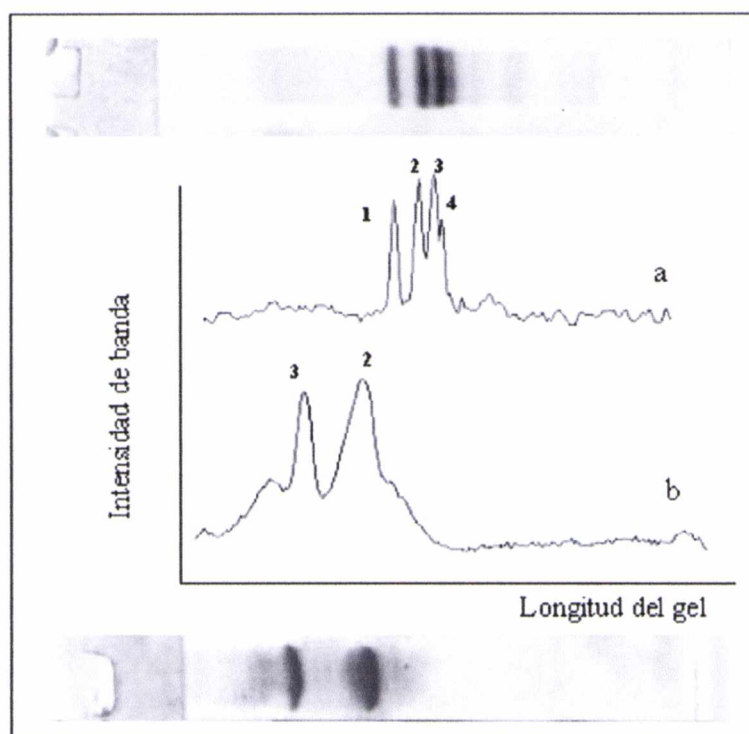


Fig. 4.37. Densitogramas de las electroforesis obtenidas por: a) SDS-Tricina-PAGE y (b) UREA-PAGE de caseínas bovinas.

Como puede observarse en la figura, en el densitograma inferior (Urea-PAGE) solo pueden visualizarse dos bandas anchas donde la número 3 corresponde a β -CN mientras que la número 2 incluye a α_{s2} - y α_{s1} -CN. Por su parte en el densitograma de SDS-Tricina-PAGE se visualizan cuatro bandas bien definidas (1-4 que corresponden a α_{s2} -, α_{s1} -, β - y κ -CN, respectivamente). Debe destacarse que en este caso la κ -CN, no detectada por otros métodos, se visualiza claramente.

Los geles con tricina demostraron ser los más adecuados tanto para la resolución de las diferentes proteínas lácteas como para sus hidrolizados. El uso de un gel de separación y un gel de stacking, en el mencionado sistema de tricina, se recomienda para la resolución de rangos moleculares comprendidos entre 20 y 100 kDa con los cuales pueden visualizarse muy bien las distintas fracciones proteicas de caseína. Por otra parte, para el análisis de péptidos de bajo PM obtenidos por hidrólisis, se recomienda un sistema de alta resolución (3.6.4) compuesto por un gel de separación, un espaciador y un gel de stacking (ver figura 4.39).

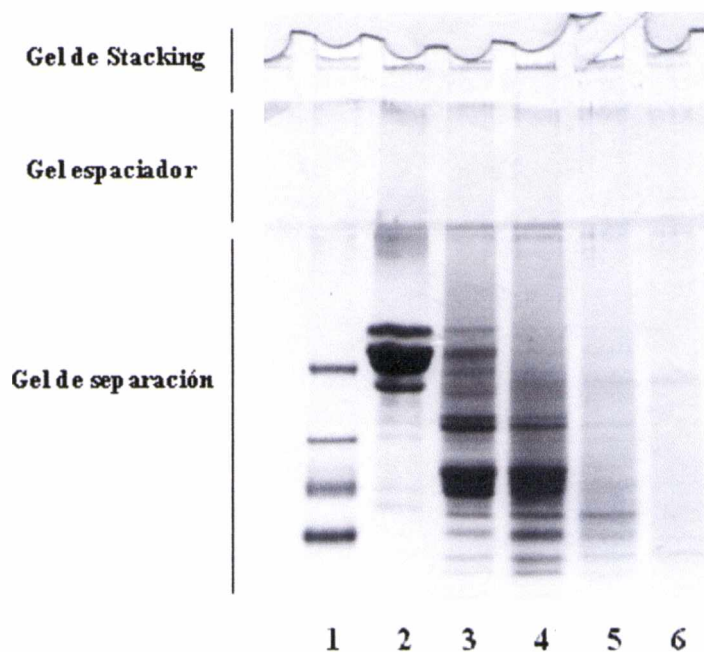


Fig. 4.38. SDS-tricina-PAGE de alta resolución de fracciones e hidrolizados caseínicos: 1 = Patrones de PM, 2 = caseína, 3-6 = hidrolizados de caseína obtenidos por tratamiento con balansaina a distintos tiempos. Este sistema está compuesto por un gel de separación (16,5%T, 3%C), un gel espaciador (10%T, 3%C) y un gel de stacking (4%T, 3%C).

En esta figura pueden observarse los patrones electroforéticos de distintas fracciones caseínicas (calle 2) e hidrolizados enzimáticos caseínicos obtenidos luego de diferentes tiempos de hidrólisis (calles 3-6) utilizando un gel de SDS-Tricina-PAGE compuesto por el gel de stacking, el gel espaciador y el gel separador (con tamaño de poro decreciente). Las ventajas de este procedimiento para la resolución de proteínas lácteas y sus hidrolizados son que las bandas se encuentran bien definidas y bien separadas por lo que pueden ser detectadas y cuantificadas aún las de bajo peso molecular (productos de degradación con alta movilidad electroforética) que no pueden ser detectadas por otros sistemas electroforéticos o que terminan corriendo junto con el frente del buffer, como es el caso de algunos métodos basados en UREA-PAGE (Shalabi & Fox, 1987). Nótese que el sistema de alta resolución constituido por tres concentraciones de monómeros diferentes (figura 4.39) es ideal para la visualización de los péptidos de bajo peso molecular procedentes de las hidrólisis, pero al concentrar las proteínas de mayor peso molecular en un espacio menor en el gel, las caseínas intactas sufren un efecto de “apilamiento”, siendo entonces mejor utilizar un sistema normal (gel de separación y gel de

stacking, ver figura 4.38) para visualizar estas caseínas con una mejor resolución.

Debido a los resultados aquí presentados se optó por utilizar los geles de tricina de alta resolución para el análisis electroforético de los productos de hidrólisis de proteínas lácteas.

4.9.3. Comparación de los Productos de Hidrólisis Obtenidos con Diferentes Endopeptidasas

Para evaluar la capacidad proteolítica sobre caseínas bovinas de distintas fitoproteasas cisteínicas respecto a balansaína, se procedió a efectuar las hidrólisis en condiciones enzimáticas óptimas (pH alcalino y 45 °C) según el protocolo descrito en 3.7.3.2. Los resultados de los experimentos se muestran en la figura 4.39.

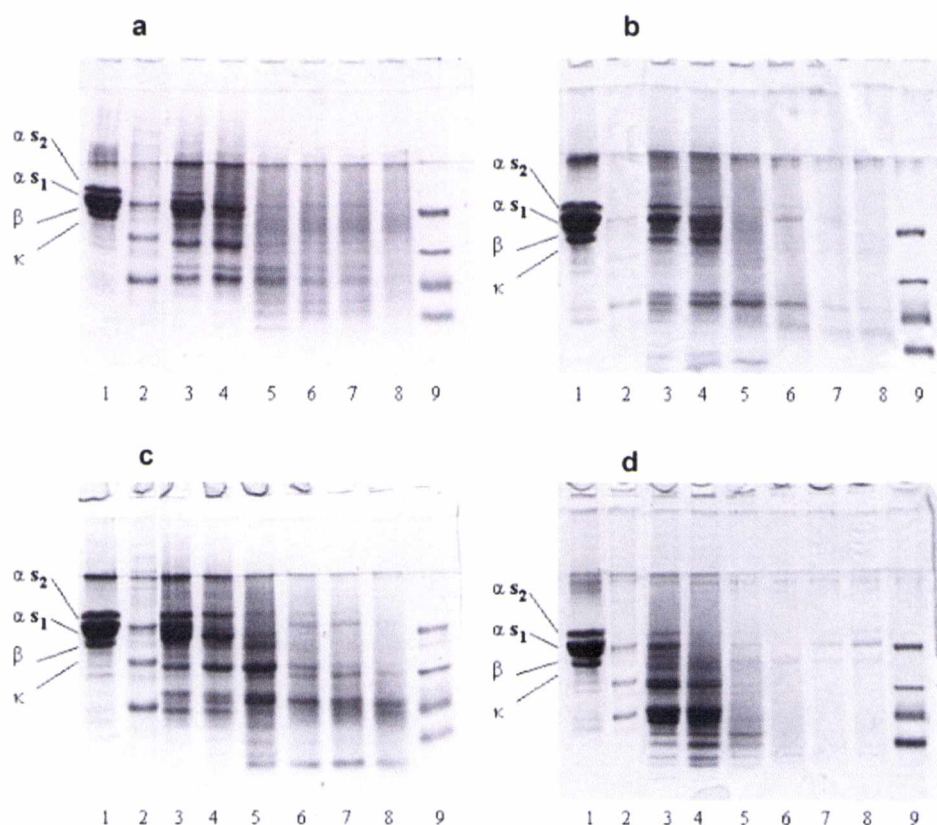


Fig. 4.39. SDS-Tricina-PAGE de alta resolución de los hidrolizados de caseínas por (a) asclepaina f, (b) balansaína, (c) hieronymaina, y (d) philibertaina g. Calle 1: caseinato bovino. Calle 2 patrones de bajo peso molecular. Calles 3-8: hidrolizados de las muestras a 5, 10, 30, 60, 90 y 180 min, respectivamente. Calle 9: patrones peptídicos (6,5; 14; 17; 26,6 kDa).

En la mencionada figura se muestran los hidrolizados correspondientes a todas las enzimas observándose que desde los 5 min comienzan a visualizarse bandas de menor peso molecular producidas por la hidrólisis de las caseínas, las que se van intensificando para finalmente convertirse en péptidos más pequeños.

En la hidrólisis de caseínas producida por asclepaína f se distinguieron 3 bandas de 19, 16 y 14,5 kDa a los 5 min, que se intensifican a los 10; desde los 30 min los mencionados polipéptidos comienzan a degradarse, apareciendo péptidos de menor peso molecular.

Respecto al patrón de la hidrólisis producida por balansáina, tanto a los 5 como a los 10 min se observaron un conjunto de bandas muy cercanas (entre 13-16 kDa) y péptidos menores a 6,5 kDa; a los 30 min permanece sin mayor hidrólisis una banda de 14,4 kDa y un polipéptido de peso molecular menor a 6,5 kDa, en tanto que a los 180 min la hidrólisis es casi total.

En el caso de hieronymaína a los 5 min aparecen un polipéptido de 19 kDa y dos de menor tamaño y muy cercanos (14,4 y 13,4 kDa); a los 30 min tanto las bandas correspondientes al polipéptido de 19 como al de 14,4 kDa se hacen más intensas, apareciendo varios polipéptidos de menor peso molecular, incluso por debajo de 6,5 kDa; a los 180 min el polipéptido de 19 kDa ya no se detecta pero permanece un conjunto de bandas en la zona entre 14,4 y 13 kDa así como el polipéptido de menor tamaño.

En tanto que para philibertaína g ya a los 5 min aparecen dos grupos de bandas de gran intensidad (17,5-18 kDa y 13,5-15 kDa), así como una serie de péptidos más pequeños (9,5;6,5;5 y 4 kDa). A los 10 min la serie de péptidos de menor peso molecular se intensifican. A los 30 min la hidrólisis es casi completa, aunque aún pueden visualizarse las bandas de 9; 6,5; 5 y 4 kDa. A tiempos mayores la hidrólisis es casi total.

4.9.3.1. Comportamiento individual de cada enzima

El comportamiento hidrolítico de cada fitoproteasa puede observarse en la figura (4.40). Asclepaína f y balansáina mostraron a los 30 min de digestión valores de hidrólisis similares en todas las fracciones de caseína, valor que en el caso de asclepaína f se mantiene prácticamente constante hasta los 180 min. En los hidrolizados realizados con balansáina la hidrólisis prosigue para las

diferentes fracciones llegando a un 15-20 % de proteína residual al finalizar la reacción.

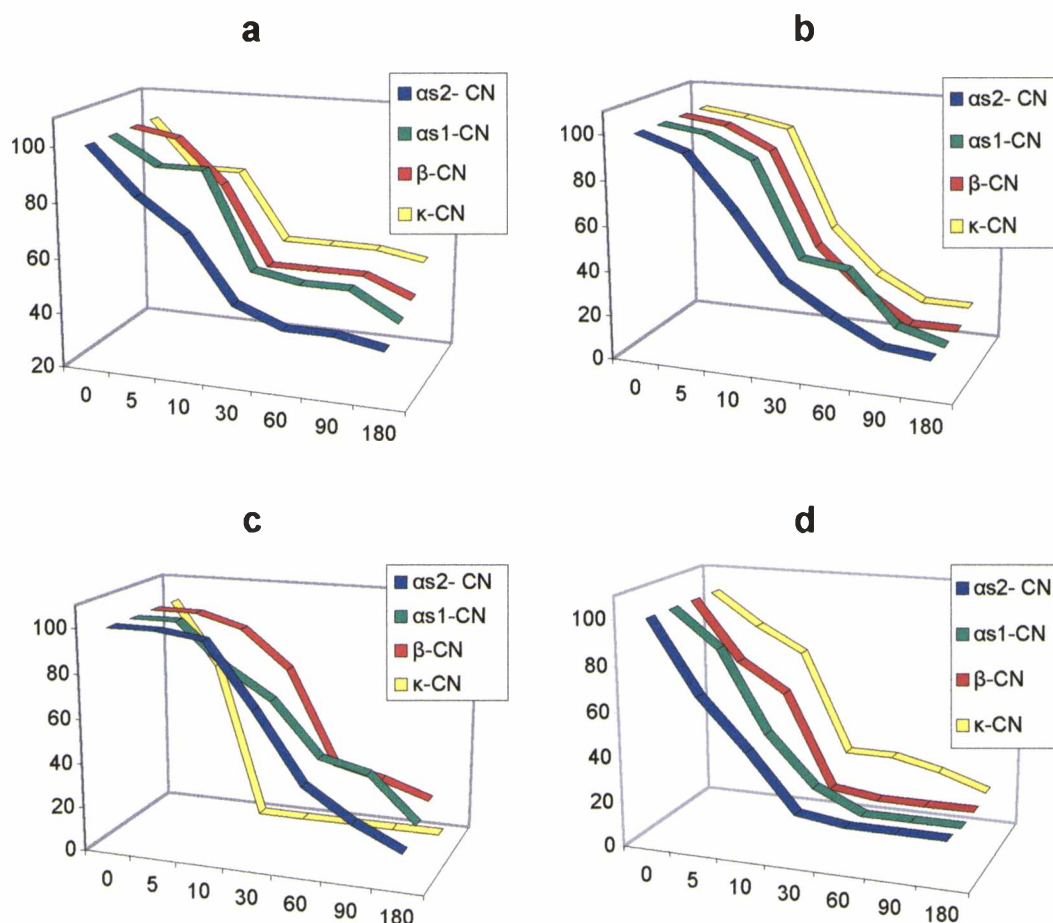


Fig. 4.40. Hidrólisis de α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β - y κ -caseínas por (a) asclepaina f, (b) balansaina, (c) hieronymaina, y (d) philibertaina g. Los gráficos indican la disminución relativa del área de pico de banda vs. Tiempo de hidrólisis, en min.

Es de destacar la elevada preferencia que hieronymaina mostró por la fracción κ -CN, la que ya es degradada completamente a los 10 minutos. Philibertaina g, tal como asclepaina f y balansaina, no presenta velocidades de hidrólisis diferenciales para las diferentes fracciones de caseína, aunque el grado de hidrólisis alcanzado a los 30 minutos es mayor para esta última enzima.

4.9.3.2. Análisis de la degradación de cada una de las fracciones caseínicas

La velocidad de proteólisis está fuertemente asociada con la accesibilidad de la proteasa a la estructura del sustrato en solución (Park, 2001). En iguales condiciones una diferencia en la velocidad de degradación de una misma fracción proteica por distintas enzimas indica una diferencia en la especificidad de las mismas.

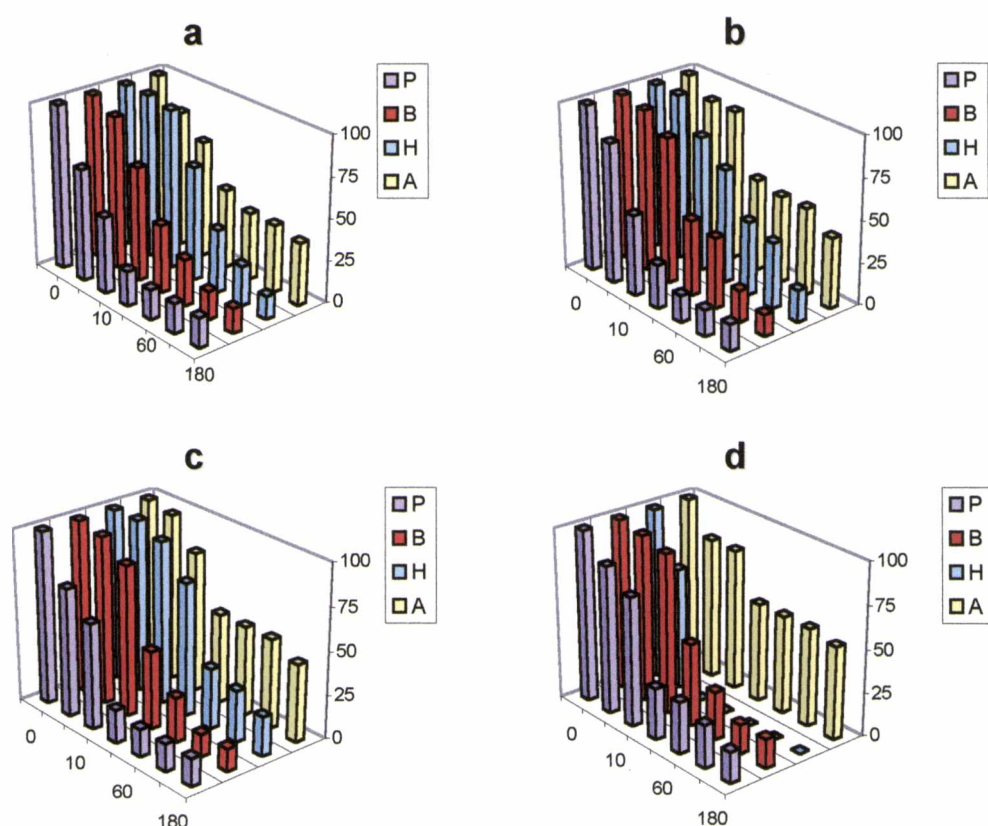


Fig. 4.41. Degradación de las fracciones de caseína por proteasas vegetales: (a) α_{S1} -CN, (b) α_{S2} -CN, (c) β -CN y (d) κ -CN. A= asclepaina f, B= balansaina, H= hieronymaina, P= philibertaina g. Los gráficos indican la disminución relativa del área de pico de banda vs. Tiempo de hidrólisis, en min. Para cada fracción proteica.

Las diferentes fracciones caseínicas mostraron diferente cinética de degradación frente a cada una de las fitoproteasas ensayadas. Un análisis del comportamiento de cada fracción en particular se muestra en la figura 4.42.

Como puede observarse en la figura, las fracciones α_{S1} - y α_{S2} -CN, asociadas con la textura del queso, mostraron diferentes patrones de degradación. La mayor velocidad de degradación fue obtenida empleando philibertaina g, luego de 10 min de incubación (50 % de degradación), pero hieronymaina y balansaina mostraron un porcentaje similar de degradación (75-

80 %) para α_{S2} -CN luego de 90 min y para α_{S1} -CN luego de 180 min, mientras que asclepaína f alcanzó la máxima degradación (cerca del 50 %) a los 30 min (figuras 4.42 a y b).

La fracción β -CN, relacionada con el amargor (Visser, 1993), muestra una cinética de degradación similar (10 min) para balansaína y asclepaína f; la degradación fue mayor en el caso de philibertaína g y menor para hieronymaína. La máxima degradación (15 % de proteína) fue alcanzada luego de 30 min para philibertaína g y luego de 90 min para balansaína. Para el caso de hieronymaína la máxima degradación (25 % de proteína remanente) fue alcanzada luego de 180 min, y para asclepaína f la máxima degradación fue alcanzada a los 30 min aunque el 50 % de la proteína permaneció sin degradar (figura 4.42 c).

Para el caso de la fracción κ -CN (relacionada con la coagulación) el comportamiento mas importante fue para hieronymaína, debido a que la banda no se detectó luego de los 10 min de incubación. Philibertaína g y balansaína mostraron similares patrones de hidrólisis, mientras que asclepaína f alcanzó el máximo % de degradación (55 %) luego de los 30 min (figura 4.42 d).

4.9.3.3. Análisis de los productos de hidrólisis de β -CN pura por extractos de balansaína

Para estudiar el comportamiento hidrolítico de balansaína sobre la fracción β -CN, se procedió a aislar dicha fracción según el protocolo descrito en 3.7.3.1.3. La hidrólisis se realizó como en los ítems anteriores y los productos obtenidos se analizaron por SDS-Tricina-PAGE empleando un gel de separación (16,5%T, 3%C) y un gel de stacking (4%T, 3%C) según el protocolo descrito en 3.6.3. En la figura 4.42 se muestran los densitogramas correspondientes a los diferentes tiempos de hidrólisis.

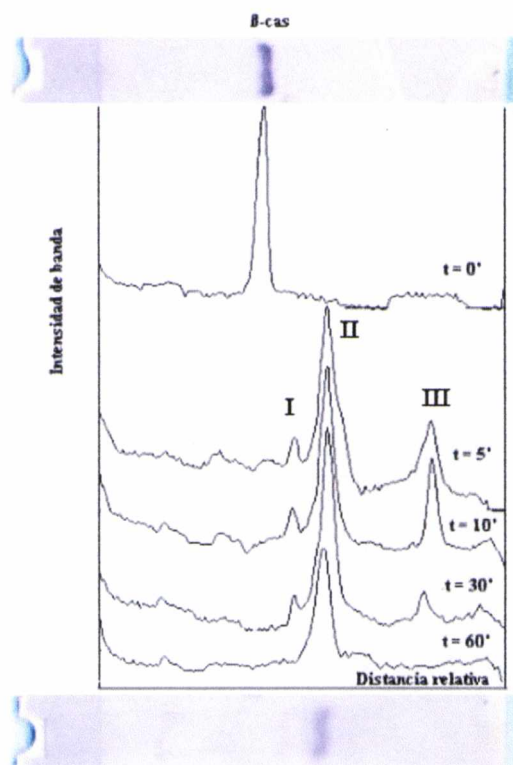


Fig. 4.42. Densitogramas de SDS-Tricina-PAGE correspondientes a la hidrólisis de β -Caseína.

Como puede observarse en la figura, a los 5 min de hidrólisis la β -CN es degradada rápidamente en 3 fracciones principales I, II y III que poseen un PM de 25, 20 y 9 kDa, respectivamente. A partir de los 5 min la velocidad de hidrólisis de los productos se hace más lenta. Luego de 60 min de hidrólisis las fracciones I y III son degradadas por completo. Una comparación de la velocidad de hidrólisis de la β -CN pura respecto a la velocidad de degradación de la misma cuando se encuentran presentes en el medio de reacción el resto de las fracciones de caseína (ver figura 4.39) muestra que en este último caso se produce un cierto retardo en la velocidad de digestión de la β -CN ya que este polipéptido aún persiste al menos hasta los 10 minutos de hidrólisis.

4.9.3.4. Análisis de los productos de hidrólisis de β -Lactoglobulina

La hidrólisis enzimática de las proteínas de suero de leche producen péptidos con nuevas propiedades que los hacen utilizables, reduciéndose así el grado de contaminación que dichas proteínas producen cuando son vertidas al medio ambiente (Lamas *et al.*, 2001). Balansaina probó ser capaz de degradar las proteínas de suero de leche, principalmente la β -LG que es la más abundante

de ellas en las condiciones de ensayo (3.7.3.2.). Los productos de hidrólisis de una muestra rica en β -LG se muestra en la figura 4.43.

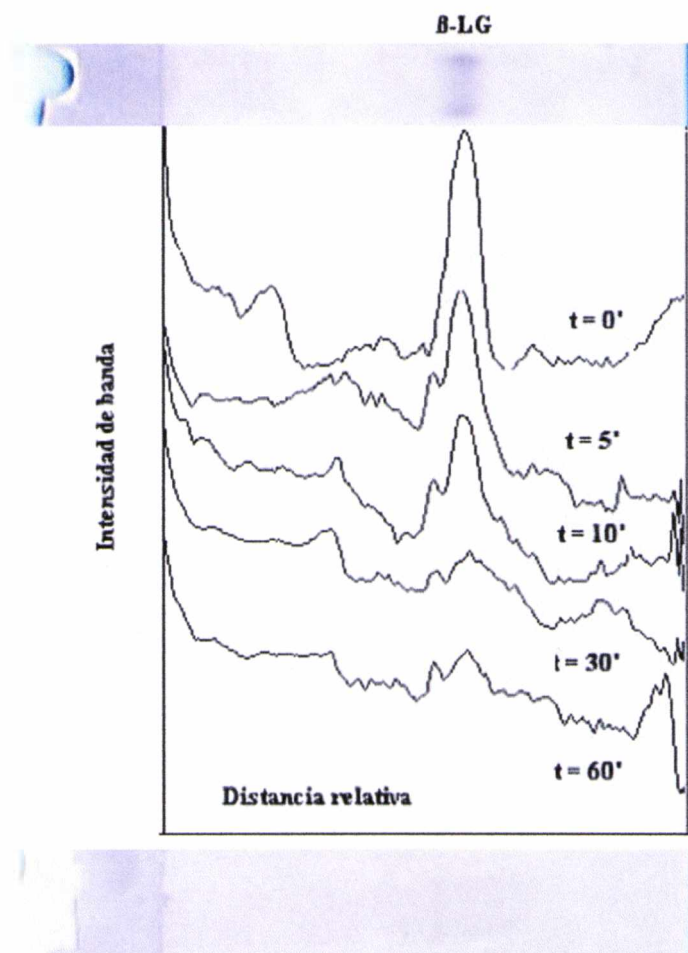


Fig. 4.43. Densitogramas de SDS-Tricina-PAGE correspondientes a la hidrólisis de concentrados de β -LG.

Como puede observarse en la figura, a los 10 minutos de hidrólisis la β -Lactoglobulina se encuentra degradada en un 50 %, observándose una degradación del 85 % a los 60 min.

4.10. ACTIVIDAD COAGULANTE DE BALANSAINA SOBRE LECHE BOVINA

Se comprobó la presencia de actividad coagulante sobre leche en los dos tipos de extractos de balansaina ensayados, tanto en los provenientes de frutos inmaduros como en los de maduros, sin hallar diferencias significativas entre ambos (datos no mostrados). Para determinar el efecto de la variación de

la relación sustrato-enzima sobre la capacidad coagulante, se empleó el protocolo descrito en 3.8.4. Los resultados se muestran muestra en la figura 4.46.

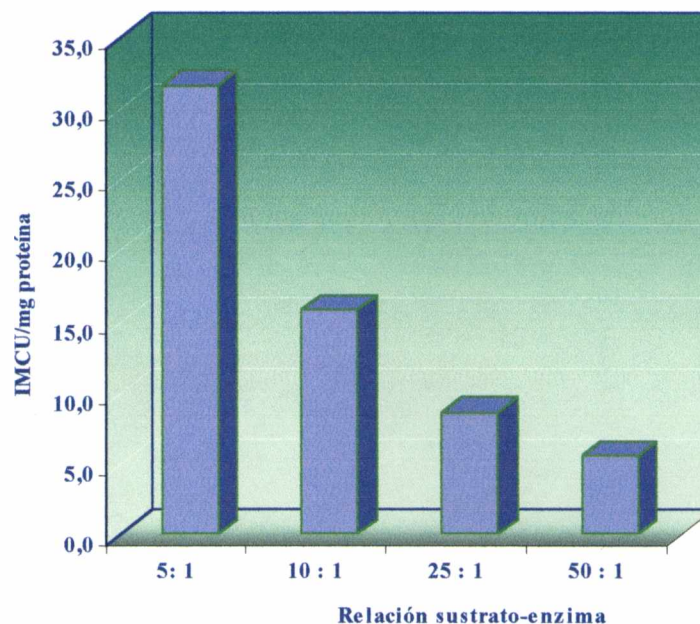


Fig. 4.44. Efecto de la variación de la relación sustrato : enzima.

Como puede observarse en la figura, utilizando una relación sustrato-enzima de 5:1 a 30 °C se obtuvo una actividad coagulante de 31,8 IMCU (International Milk Clotting Units) /mg proteína en el extractivo, lo que representa el 29,5 % de la actividad que posee el cuajo patrón (quimosina). Si bien la mencionada actividad de balansaina fue casi tres veces menor a la del cuajo de ternero mamón, estos extractivos poseen una actividad coagulante del mismo orden que los extractos de flores de *Cynara scolymus* (Llorente *et al.*, 1999) los que contienen proteasas aspárticas aptas para la elaboración de quesos. Al aumentar la relación sustrato-enzima, la actividad coagulante fue disminuyendo (Eck & Gillis, 1997) hasta llegar a valores inadecuados para su uso industrial al superar dicha relación el valor de 50:1. La figura 4.45 corresponde a un densitograma de la electroforesis realizada con muestras de leche y del sobrenadante y el coágulo obtenidos por tratamiento de la leche con balansaina en una relación sustrato-enzima de 10:1, según el protocolo descrito en 3.8.3.

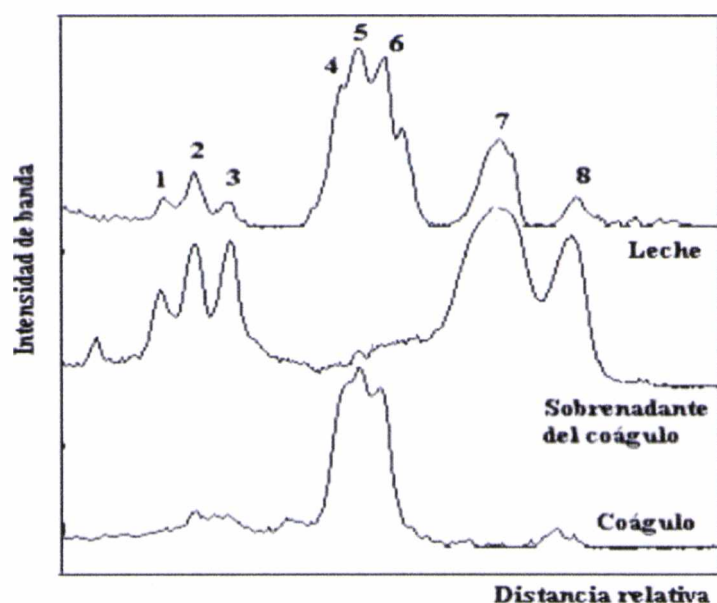


Fig. 4.45. Densitograma de la electroforesis de leche, sobrenadante y coágulo obtenidos con balansaína. 1: lactoferrina, 2: seroalbúmina bovina, 3: inmunoglobulinas, 4: α_{s2} -caseína, 5: α_{s1} -caseína, 6: β -caseína, 7: β -lactoglobulina, 8: α -lactalbúmina.

Como puede observarse en la figura, el coágulo formado se encuentra compuesto por las fracciones caseínicas principales (α_{s1} -, α_{s2} - y β -), no reteniendo éste prácticamente nada de la fracción sérica de la leche, la cual se separa en el proceso de coagulación.

Se analizó también el efecto de la concentración de calcio agregado al sustrato sobre el tiempo de coagulación según el protocolo descrito en 3.8.5, empleando una relación de sustrato-enzima de 10:1 v/v. Los resultados del experimento se describen en la figura 4.46.

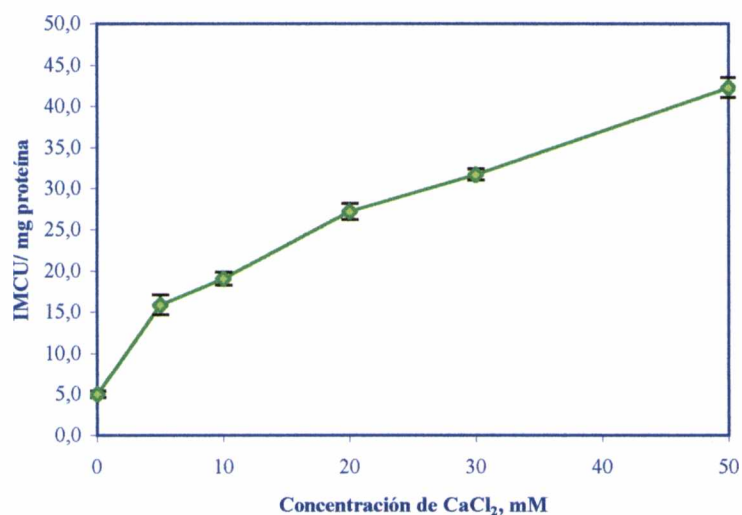


Fig. 4.46. Efecto de la concentración de calcio sobre la coagulación.

En la figura se observa de qué modo se incrementa la actividad coagulante al aumentar la concentración de calcio en el medio de reacción, siendo el comportamiento similar al descrito para el cuajo animal y para *Mucor miehei* (Uhlig, 1998).

El efecto de la temperatura en el proceso de coagulación se analizó empleando el protocolo descrito en 3.8.6, a una concentración de CaCl_2 de 20 mM y una relación v/v de sustrato-enzima de 10:1. Los resultados del experimento se describen en la figura 4.47.

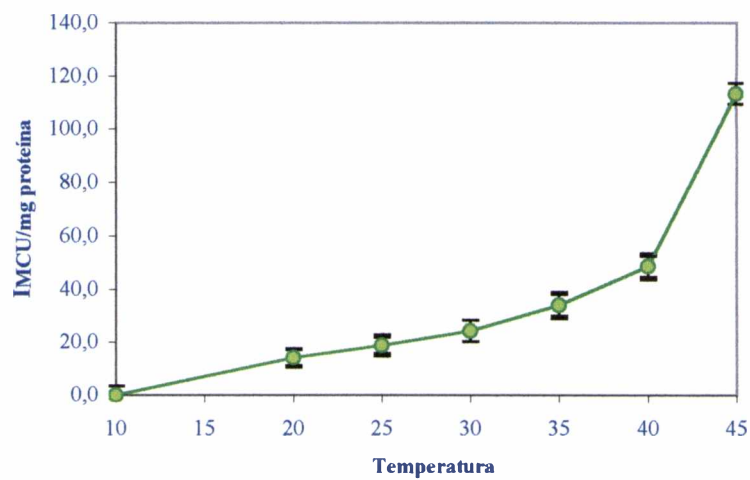


Fig. 4.47. Efecto de la temperatura sobre la coagulación.

En la figura se observa el modo en que la temperatura del ensayo incrementa la actividad coagulante. A 10 °C la coagulación no se produce, tal como ocurre también empleando cuajo bovino (Eck & Gillis, 1997). En el intervalo 20-40 °C la actividad coagulante aumenta progresivamente y por sobre esta temperatura el gel resultó más blando, haciéndose inadecuado para procesos industriales de fabricación de quesos (Uhlig, 1998).

5. CONCLUSIONES

5.1. OBTENCION DE BALANSAINA

En el presente trabajo se han estudiado las proteasas presentes en frutos en distintos estadios de maduración de *Bromelia balansae* Mez (*Bromeliaceae*), especie autóctona conocida en nuestro país como “caraguatá”, provenientes de Posadas, Pcia. de Misiones.

Con el objeto de establecer una correlación entre la madurez de los frutos (medido por colorimetría triestímulo) y su contenido de proteínas (estimado por IEF), se procedió a separar los frutos en diferentes estadios. En una primera etapa, y en base a los parámetros colorimétricos obtenidos, los frutos se clasificaron en cinco grupos con diferente grado de madurez. El isoelectroenfoque de los cinco extractivos evidenció que a medida que avanza el proceso de maduración existe un aumento en el número de proteínas con diferentes valores de pI, así como en el contenido de proteínas totales y que solamente los estadios extremos muestran patrones de bandas netamente diferentes. En base a estos resultados se decidió continuar los estudios solamente con los extractivos de frutos inmaduros (ECI) y los de frutos maduros (ECM).

Al proseguir con el análisis de los extractos crudos correspondientes a los frutos inmaduros (ECI) y maduros (ECM) se observó un notorio incremento en el contenido de azúcares solubles entre el ECI (17 mg/g fruto) y el ECM (136 mg/g fruto), así como en el contenido en proteínas (35 y 75 mg/g de fruto para ECI y ECM, respectivamente). Por otra parte se verificó una sensible disminución en el contenido de fenoles al pasar de ECI a ECM. En cuanto a la actividad caseinolítica, ésta es mayor en los estadios de menor madurez (10 y 6,5 U_{cas} por gramo de fruto para ECI y ECM, respectivamente) ocurriendo lo propio con la actividad específica.

Con el objeto de eliminar los compuestos fenólicos y obtener preparaciones con un grado de purificación adecuado tanto para su uso en diferentes aplicaciones tecnológicas como para su posterior purificación final, se sometió a los extractos crudos a precipitación fraccionada empleando solventes orgánicos polares (acetona y etanol). Dado que no se presentaron diferencias significativas entre los dos solventes ensayados en cuanto a la

recuperación de proteínas activas, se seleccionó el etanol para la purificación parcial de los extractos crudos, dado que es un solvente más inocuo en el caso en que esta preparación sea destinada a su uso en la industria alimentaria.

Por precipitación etanólica se pudieron obtener extractos parcialmente purificados a los que se denominó genéricamente *balansaina*. La preparación de *balansaina* proveniente de frutos inmaduros (BI) retuvo el 92% de la actividad enzimática y el 83% de las proteínas iniciales, eliminándose el 45% de los azúcares contenidos en el extracto crudo. Por su parte la *balansaina* obtenida a partir de frutos maduros (BM) retuvo el 90% de la actividad enzimática y el 80% de las proteínas contenidas en el ECM, en tanto que se eliminaron el 81% de los azúcares presentes en el correspondiente extracto crudo.

Ambas preparaciones de *balansaina* fueron caracterizadas exhaustivamente en diferentes aspectos. El conocimiento obtenido es fundamental para la posible utilización de la enzima en diferentes procesos industriales, en tanto que algunos de los resultados (PM, pI, estabilidad) resultaron de gran utilidad para diseñar la estrategia de purificación de *balansaina* I.

Las electroforesis en distintos sistemas revelaron que las principales bandas proteicas correspondientes a los extractos parcialmente purificados de frutos maduros e inmaduros se encuentran comprendidas en la región de 20-30 kDa, valores que son del mismo orden que los encontrados en endopeptidasas de diferentes especies de *Bromeliaceae*, aunque la correspondiente a frutos maduros presenta un número mayor de polipéptidos.

Mediante isoelectroenfoque se determinó que una sola banda activa (pI 5,5) se encuentra presente en cantidades apreciables durante todo el proceso de maduración de los frutos. La segunda banda activa (pI 8,7) sólo puede encontrarse en cantidades apreciables en *balansaina* proveniente de frutos maduros.

Si bien el mantenimiento de la enzima a -20°C es una alternativa válida para su conservación (retiene el 90% de actividad luego de seis meses en esas condiciones), la liofilización fue el método de elección, ya que un liofilizado redisolto es capaz de retener prácticamente la misma actividad en igual período.

La aplicación de inhibidores específicos de grupo demostró que la enzima es una cisteinendopeptidasa, 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 completamente cuando la concentración de cisteína es 25 mM.

El perfil de pH de balansaina muestra que la preparación exhibe una elevada actividad en un rango de pH muy amplio (5,8-10), con un valor óptimo aparente a pH 8,7. Por su parte, la estabilidad a la fuerza iónica fue elevada, ya que no hubo disminución apreciable de la actividad proteolítica luego de 24 horas en NaCl 1M. En cuanto a la estabilidad térmica fue buena, reteniendo un 80% de la actividad luego de haber sido incubada durante 2 horas a 45 °C. La enzima puede ser inactivada casi por completo por calentamiento a 75 °C durante una hora.

5.2. PURIFICACION DE BALANSAINA

La purificación de la principal endopeptidasa presente en las preparaciones de balansaina provenientes de frutos inmaduros se logró por optimización de la cromatografía de intercambio aniónico.

En la separación cromatográfica se obtuvo una fracción no retenida constituida por dos componentes, sólo uno de ellos con una pequeña actividad proteolítica. La aplicación de un gradiente lineal (0-0,25 M) permitió la separación de otras tres fracciones de las cuales sólo una presentó actividad caseinolítica, siendo ésta muy elevada. La recromatografía de la fracción activa permitió obtener balansaina I en forma pura empleando diferentes criterios: SDS-PAGE, IEF y espectrometría de masas.

Balansaina I mostró una marcada actividad endoesterásica relativa al utilizar derivados N- α -CBZ-L-amino ácidos de alanina y glutamina.

Por espectrometría de masas se obtuvo un único pico a los 23,2 kDa, que muestra una buena concordancia con los resultados obtenidos para SDS-PAGE ($25 \pm 0,5$ kDa). Estos valores, sumados al valor de pI (5,5) se corresponden con los obtenidos para algunas otras cisteínproteasas de frutos de varias especies de *Bromeliaceae*.

Balansaina I presentó un rango de pH óptimo (mayor al 90% de la actividad máxima) similar al obtenido con las preparaciones de la preparación de balansaina de frutos verdes.

Los ensayos con inhibidores específicos de grupo demostraron que balansaína I es, indudablemente, una endopeptidasa cisteínica, dado que el efecto de los inhibidores específicos de peptidasas aspárticas, serínicas y metalopeptidasas fue prácticamente nulo y que por su parte el ácido iodoacético, el cloruro mercúrico y el E-64, inhibidores de proteasas cisteínicas, produjeron la desaparición prácticamente total de la actividad caseinolítica.

No se ha podido comprobar glicosilación de la proteína por ninguna de las técnicas ensayadas. Esta característica no se presenta en todas las fitoendopeptidasas; más aún: de tres proteasas del mismo material vegetal (tallos de *Ananas comosus* L.) dos de ellas –bromelaína y comosaína– son glicosiladas, en tanto que la tercera (ananaína) no lo es.

La secuencia N-terminal de la enzima purificada fue comparada con las de otras 66 endopeptidasas vegetales, presentando el mayor porcentaje de identidad (entre 81 y 90,5%) con otras seis endopeptidasas de *Bromeliaceae*, resultados que parecerían confirmar la hipótesis de Rowan y Buttle (1994) de que las endopeptidasas de *Bromeliaceae* están fuertemente relacionadas unas a otras más que con el resto de los miembros de la familia de la papaína. Sin embargo hieronymaína I, una endopeptidasa de *Bromelia hieronymi*, especie perteneciente al mismo género que la especie estudiada en este trabajo, presentó una identidad algo menor (71,4%). Otro aspecto destacable es el elevado grado de conservación de algunos motivos de los extremos N-terminales analizados.

5.3. APLICACIONES DE BALANSAINA

A pesar del constante incremento de los cultivos de soja, recién en los últimos años esta leguminosa ha comenzado a incluirse en la dieta de las culturas occidentales, a pesar de que el perfil de aminoácidos de sus proteínas es muy adecuado. En la casi totalidad de las aplicaciones de estas proteínas se requiere realizar una hidrólisis controlada de las mismas, para lo que se puede recurrir a enzimas proteolíticas.

En este trabajo se ha ensayado balansaína sobre concentrados de soja para evaluar su posible aplicación en este sentido. Se obtuvieron los valores del grado de hidrólisis de balansaína, los que fueron comparados con los de otras proteasas vegetales, además de alcalasa, una enzima utilizada frecuentemente en procesos industriales. El grado de hidrólisis alcanzado (180 min) fue similar al de las otras dos proteasas de tipo cisteínico (hieronymaína y macrodontaína),

aunque menor al de alcalasa (proteasa serínica). Por su parte, en el patrón de péptidos obtenidos por electroforesis de los hidrolizados obtenidos con balansaína pudo observarse una degradación preferencial de algunas de las fracciones proteicas respecto a otras: a los 2 min de hidrólisis se observó la degradación parcial de las bandas α' , α y β de la fracción 7S y del polipéptido A, en tanto que a los 180 min se verificó la aparición de polipéptidos menores a 15 kDa y la degradación del polipéptido B (fracción 11S) en un 65%. Dadas las características de los hidrolizados obtenidos podría resultar de interés analizar la modificación de las propiedades funcionales de las mencionadas proteínas para su posible uso en la industria alimentaria.

Teniendo en cuenta la importancia de los hidrolizados enzimáticos de las proteínas lácteas, en particular para la obtención de fórmulas hipoalérgicas, se ensayó la capacidad hidrolítica de balansaína sobre las principales proteínas de la leche. En el caso de las caseínas bovinas el patrón de hidrólisis obtenido por SDS-PAGE demostró una degradación preferencial de las fracciones α con respecto a las β , a un determinado tiempo de hidrólisis.

En esta etapa debió realizarse una revisión de los distintos sistemas electroforéticos para hallar el que permitiese una mejor separación de las bandas y la visualización de los péptidos de menor PM, ya que el sistema electroforético habitualmente empleado en el análisis de las caseínas (Urea-PAGE) careció de una adecuada resolución en las condiciones de ensayo. Comparando los tres sistemas electroforéticos principales (SDS-PAGE, Urea-PAGE y SDS-Tricina-PAGE) se estableció que SDS-Tricina-PAGE fue el más adecuado para analizar la degradación de las diferentes fracciones de caseínas y las proteínas de suero y SDS-Tricina PAGE de alta resolución para hacer lo propio con los polipéptidos producto de la hidrólisis enzimática.

Al comparar la capacidad proteolítica sobre caseínas bovinas de distintas fitoproteasas cisteínicas aisladas en el LIPROVE (asclepaína f, hieronymaína y philibertaína g) respecto al comportamiento de balansaína, se observó que cada una de ellas muestra un patrón de hidrólisis característico y distintivo para todas las fracciones de caseína ensayadas. Con respecto a los polipéptidos formados en los hidrolizados producidos por las cuatro enzimas, también se hallaron patrones característicos para las diferentes enzimas, siendo necesaria su purificación por HPLC y posterior secuenciamiento de los péptidos obtenidos para realizar un análisis más exhaustivo.

La hidrólisis producida por balansaina de la fracción β -CN cuando ésta se encuentra como único sustrato mostró que ya a los 5 min esta fracción fue degradada en 3 fracciones principales, originando polipéptidos con un PM de 25, 20 y 9 kDa. Luego de 60 min de hidrólisis las fracciones de mayor PM son degradadas por completo.

Al analizar la acción de balansaina sobre las proteínas de suero de leche, pudo comprobarse la capacidad de esta enzima para degradar principalmente la β -LG (85% de degradación a los 60 min).

En cuanto a la capacidad para coagular la leche, balansaina demostró poseer prácticamente un tercio (31,8 IMCU por mg proteína en el extractivo) de la actividad de la quimosina comercial. Al analizar el coágulo formado por electroforesis se comprobó que está compuesto por las fracciones caseínicas principales (α_{s1} -, α_{s2} - y β -), no reteniéndose prácticamente nada de la fracción sérica de la leche, la cual se separa en el proceso de coagulación. Al estudiar el efecto de la relación sustrato-enzima, la concentración de calcio y la temperatura se observó que los resultados son en principio satisfactorios para la realización de futuros ensayos de la enzima en la fabricación de quesos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adams, C.A. & Rinne, R.W. (1981) "The occurrence and significance of dispensable proteins in plants", *New Phytol.* **89**: 1 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.

Adler-Nissen, J. (1986) "Enzymic hydrolysis of food proteins", Elsevier, London & NY.

Agundis, C., Reyes, M. & Córdoba, F. (1977) "Hemisphaericin-D, a dialyzable and polymerizable protease found in *Bromelia hemisphaerica*", *Experientia* **33**: 867-9.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.* **215**: 403-10.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids. Res.* **25**: 3389-402.

Anderson, J.W. (1968) "Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues", *Phytochemistry* **7**: 1973-88.

Andrews, A.T. (1983) "Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins", *J. Dairy Res.* **50**: 45-55.

Anson, M.L. (1938) "The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin", *J. Gen. Physiol.* **22**: 79-89.

Arcus, A.C. (1959) "Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*", *Biochim. Biophys. Acta* **33**: 242 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.

Arribère, M.C., Cortadi, A.A., Gattuso, M.S., Bettiol, M.P., Priolo, N.S. & Caffini, N.O. (1998) "Isolation and biochemical characterization of latex comparison of *Asclepiadaceae* latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. Cysteine peptidases", *Phytochemical Analysis* **9**: 267-73.

Arribère, M.C., Vairo Cavalli, S.E., Priolo, N.S., Caffini, N.O., Gattuso, M.S. & Cortadi, A.A. (1999) "Proteolytic enzymes from the latex of *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)", *Acta Horticulturae* **501**: 259-68.

Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K. & Arai, S. (1997) "Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization, and application to milk clotting", *J. Agric. Food Chem.* **45**: 1070-5.

Asenjo, C.F. & Fernández, M. del C. (1942) *Science* **95**: 48 en Toro-Goyco *et al.*, 1968.

Asenjo, C.F., Goyco, J.A. & Fernández, M.d.C. (1944) "A note on the presence of calcium oxalate in the maya fruit", *J. Am. Pharm. Ass. (Sci. Ed.)* **33**: 344-5.

Avrova, A.O., Stewart, H.E., De Jong, W.D., Heilbronn, J., Lyon, G.D. & Birch, P.R.

(1999) "A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*", *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 1114-9.

Aword, O.C. & Muller, H.G. (1987) "Cheese-making properties of vegetable rennet from Sodom apple (*Calotropis procera*)", *Food Chem.* **26**: 71-9.

Aword, O.C. & Nakai, S. (1986) "Extraction of milk clotting enzyme from Sodom apple (*Calotropis procera*)", *J. Food Sci.* **51**: 1569-70.

Barberis, S., Quiroga, E., Arribere, M.C. & Priolo, N. (2002) "Peptide synthesis in aqueous-organic biphasic systems catalyzed by a protease isolated from *Morrenia brachystephana* (Asclepiadaceae)", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **17**: 39-47.

Barret, A.J. (1999) "Peptidases: a view of classification and nomenclature", en "Proteases: a new perspective", (V. Turk, ed.). Ed. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. (págs. 1-12).

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.

Barret, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. (1998) "Handbook of Proteolytic Enzymes", Academic Press, London, págs. 545-71.

Bartholomai, G.B. & Pilosof, A.M. (2000) "Caracterización funcional y estructural de proteínas", Ed. Universitaria de Buenos Aires, pág. 15.

Basch, J.J., Douglas, F.W., Procino, L.G., Holsinger, V.H. & Farrel, H.M. (1985) "Quantitation of caseins and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Answorth procedure", *J. Dairy Sci.* **68**: 23-31.

Becker, C., Fischer, J., Nong, V.H. & Munitz, K. (1994) "PCR cloning and expression analysis of cDNAs encoding cysteine proteinases from germinating seeds of *Vicia sativa* L.", *Plant Mol. Biol.* **26**: 1207-12.

Becker, C., Senyuk, V.I., Shutov, A.D., Nong, V.H., Fischer, J., Horstmann, C. & Muntz, K. (1997) "Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage-protein mobilization", *Eur. J. Biochem.* **248**: 304-12.

Benot López, S. (2000) "Alergia a las proteínas de la leche de vaca: edad límite de uso apropiado. Informe de evaluación de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía", Ed. Luis Montoto, Sevilla, España.

Bernholdt, H.F. (1982) "The use of enzymes in the tenderization of meat", en "Use of enzymes in food technology" (P. Dupuy, ed.), Technique et Documentation Lavoisier, Paris, págs. 395-8.

Biesboer, D.D. & Mahlberg, P.G. (1978) "Accumulation of non-utilizable starch in laticifers of *Euphorbia heterophylla* and *E. myrsinites*", *Planta* **143**: 5 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.

- Black, R.J. & Dehgan, B.** (2003) "Bromeliad Encyclopedia Florida Council of Bromeliad Societies" (URL: <http://www.fcbs.org/>) Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville FL 32611.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J.** (1987) "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels", *Electrophoresis* **8**: 93-9.
- Bongiorno de Pfirter, G.M. & Buttazzoni de Cozzarin, M.S.** (1976) "Balansain: a new proteolytic enzyme separated from the fruit of *Bromelia balansae* Mez (*Bromeliaceae*)", *Rev. Farm. (Buenos Aires)* **118**: 41-6.
- Boylan, M.T. & Sussex, I.M.** (1987) "Purification of an endopeptidase involved with storage-protein degradation in *Phaseolus vulgaris* L4 cotyledons", *Planta* **170**: 343-52.
- 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.
- Brady, M.S., Rickard, K.A., Fitzgerald, J.F. & Lemons, J.A.** (1986) "Specialized formulas and feedings for infants with malabsorption or formula intolerance", *J. Am Diet Assoc.* **86**: 191-200.
- Brockbank, W.J. & Lynn, K.R.** (1979) "Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed)", *Biochim. Biophys. Acta* **578**: 13 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.
- Brocklehurst, K., Baines, B.S. & Malthouse, J.P.G.** (1981) "Differences in the interactions of the catalytic groups of the active centers of actinidin and papain", *Biochem. J.* **197**: 739 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.
- 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.
- 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**: 127-34.
- Businco, L., Dreborg, S., Einarsson, R., Giampietro, P.G., Høst, A., Keller, K.M., Strobel, S. & Wahn, U.** (1993) "Hydrolysed cow's milk formulae", *Pediatric Allergy and Immunology* **4**: 101-11.
- Buttazzoni de Cozzarin, M.S. & Bongiorno de Pfirter, G.M.** (1980) "Dos nuevas enzimas proteolíticas halladas en plantas del género *Bromelia*", *Rev. Farm. (Buenos Aires)* **123**: 3-7.
- Buttazzoni, M.S., & Caffini, N.O.** (1982) "Panorama actual de las enzimas proteolíticas vegetales", *Acta Farm. Bonaerense* **1**: 23-38.
- Buttazzoni, M.S., Caffini, N.O., Natalucci, C.L. & Priolo, N.S.** (1984) "Proteasas de *Bromeliaceae* I. Estudio preliminar de la fracción proteolíticamente activa presente en

frutos de *Bromelia laciniosa* Mart.", *Acta Farm. Bonaerense* **3**: 33-8.

Buttle, D.J., Ritonja, A., Pearl, L.H., Turk, V. & Barrett, A.J. (1990) "Selective cleavage of glycol bonds by papaya proteinase IV", *FEBS Lett.* **260**: 195-7.

Caffini, N.O., Natalucci, C.L., Priolo, N.S. & Buttazzoni, M.S. (1988) "Proteasas de *Bromeliaceae* IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrilica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb.", *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 9-14.

Camacho-Hernandez, I.L., Chavez-Velazquez, J.A., Uribe-Beltran, M.J., Rios-Morgan, A. & Delgado-Vargas, F. (2002) "Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromelia pinguin*", *Fitoterapia* **73**: 411-3.

Castellanos, A. (1945) "*Bromeliaceae*", en "*Genera et Species Plantarum Argentinae*" (H.R. Descolle, dir.), Argentina.

Charney, J. & **Tomarelli**, R.M. (1947) "A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice", *J. Biol. Chem.* **171**: 501-5.

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**: 1516-26.

Cohen, L.W., Coghlan, V.M. & Dihel, L.C. (1986) "Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA", *Gene* **48**: 219-27.

Cooreman, W.M., Scharpé, S., Demeester, J. & Lauwers, A. (1976) "Bromelain, biochemical and pharmacological properties", *Pharm. Acta Helv.* **51**: 73 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.

Cordeiro, M.C., Xue, Z.T., Pietrzak, M., Pais, M.S. & Brodelius, P.E. (1993) "Proteases from cell suspension cultures of *Cynara cardunculus*", *Phytochemistry* **33**: 1323-6.

Cordle, C.T. (1994) "Control of food allergies using protein hydrolysates", *Food Technol.* **48**: 72-6.

Cortadi, A., Scandizzi, A., Gattuso, S., Priolo, N., Caffini, N. & Gattuso, M. (1999) "Estudio morfoanatómico de especies de los géneros *Araujia* y *Morrenia* (*Asclepiadaceae*) utilizadas en medicina popular", *Rojasiana* **5**: 15-36.

Creamer, L.K. & **Richardson**, T. (1984) "Anomalous behavior of bovine α 1- and β -caseins on gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffers", *Arch. Biochem. Biophys.* **234**: 476-86.

Creamer, L.K. (1991) "Electrophoresis of cheese", *International Dairy Federation Bulletin* **261**: 14-28.

Cruz, M.T., Oliver, M.d.C., del Castillo, L.M. & Castañeda-Agulló, M. (1974) "Proteinasas de plantas mexicanas. I. Determinación de pesos moleculares de proteinasas cisteínicas por concentración de grupos tioles", *Rev. Latinoamer. Quím.* **5**: 18-25.

- Cusack, M., Stephen, A.G., Powls, R. & Beynon, R.J.** (1991) "Purification and characterization of thaumatopain, a cysteine protease from the arils of the plant *Thaumatococcus daniellii*", *Biochem. J.* **274**: 231-6.
- Dagleish, D.G.** (1992) "The enzymatic coagulation of milk", en: *Advanced Dairy Chemistry I: Proteins* (P.F. Fox, ed.), Elsevier Applied Science. Elsevier Science Publishers Ltd., England, págs. 579-619.
- Dalling, M.J.** (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.
- Dianda, M.A.** (2002) "Elaboración de quesos artesanales", 1ra ed., Editorial Hemisferio Sur, Argentina, págs. 5-6.
- Dimitri, M.J.** (1978) "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería", Editorial Acme, Buenos Aires, Tomo I, pág. 215-6.
- Domoto, C., Watanabe, H., Abe, M., Abe, K. & Arai, S.** (1995) "Isolation and characterization of two distinct cDNA clones encoding corn seed cystein proteinases", *Biochim. Biophys. Acta* **1263**: 241-2.
- Drake, R., John, I., Farrell, A., Cooper, W., Schuch, W. & Grierson, D.** (1996) "Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence", *Plant Mol. Biol.* **30**: 755-67.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** (1956) "Colorometric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.* **28**: 350-6.
- Dubray, G. & Bezdard, G.** (1982) "A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels", *Anal. Biochem.* **119**: 325-9.
- Dunn, B.M., Kay, J., Gustchina, A. & Wlodawer, A.** (1994) "Subsite preferences of retroviral proteinases", *Meth. Enzymol.* **241**: 254-78.
- Eck, A. & Gillis, S.J.D.** (1997) "Le fromage" (3e. edition). Eds. Technique et Documentation. 866 pp.
- Engwerda, C.R., Andrew, D., Ladhams, A. & Mynott, T.L.** (2001a) "Bromelain modulates T cell and B cell immune responses in vitro and in vivo", *Cell. Immunol.* **210**: 66-75.
- Engwerda, C.R., Andrew, D., Murphy, M. & Mynott, T.L.** (2001b) "Bromelain activates murine macrophages and natural killer cells in vitro", *Cell. Immunol.* **210**: 5-10.
- Erdman, J.W. & Fordyce, E.J.** (1989) "Los productos de soya y la dieta humana", *Ann. J. Clin. Nutr.* **49**: 725-37.
- Fahrney, D.E. & Gold, A.M.** (1963) "Sulfonyl Fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, a-chymotrypsin and trypsin", *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 997-9.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F.H.** (1971) "Electrophoretic analysis of the

major polypeptides of the human erythrocyte membrane”, *Biochem.* **10**: 2606-17.

Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Andrade, R., Verissimo, P., Lin, X., Tang, J. & Pires, E. (1999) “Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase”, *J. Biol. Chem.* **274**: 28724-9.

Fernández-Salguero, J. & Sanjuán E. (1999) “Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes’ milk cheese”, *Food Chem.* **64**: 177-83.

Firsthoefel, N.R., Cushman, M.A.F., Ostrem, J.A. & 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.

Fox, P.F. & Stepaniak, L. (1993) “Enzymes in cheese technology”, *Int. Dairy J.* **3**: 509-30.

Frøkjær, S. (1994) “Use of hydrolysates for protein supplementation”, *Food Technol.* **48**: 86-8.

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.

Gallagher, J., Kanekanian, A.D. & Evans, E.P. (1994) “Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps”, *Int. J. Food Sci. Technol.* **29**: 279-85.

Garduño, R., Soriano, M., Chávez, E., Cruz, M.T., del Castillo, L.M. & Castañeda-Agulló, M. (1974) “Proteinasas de plantas mexicanas II. Puntos isoeléctricos y caracterización de formas moleculares múltiples en enzimas de Bromeliáceas”, *Rev. Latinoamer. Quím.* **5**: 243-8.

Goetting-Minesky, M.P. & Mullin, B.C. (1994) “Differential gene expression in an actinorhizal symbiosis: evidence for a nodule-specific cysteine proteinase”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 9891-5.

Good, N.E. & Izawa, S. (1972) “Hydrogen ion buffers”, *Meth. Enzymol.* **24**: 53-5.

Granell, A., Harris, N., Pisabarro, A.G. & Carbonell, J. (1992) “Temporal and spatial expression of a thiolprotease gene during pea ovary senescence, and its regulation by gibberellin”, *Plant J.* **2**: 907-15.

Grasselli, M., Navarro del Cañiso, A.A., Fernández Lahore, H., Miranda, M.V., Camperi, S.A. & Cascone, O. (1997) “¿Que Hacer con el Suero del Queso?”, *Ciencia Hoy. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy*, Vol. **8**: 12-7.

Green, J.R. (1901) “Die Enzyme”, Parey, Berlin.

Greenberg, D.M. & Winnick, T. (1940) “Plant proteases I. Activation-inhibition reactions.” *J. Biol. Chem.* **135**: 761 en Dalling, M.J. (1986) “Plant proteolytic enzymes”, Vol I. CRC Press, Inc., Florida.

- Guerrero, F.D., Jones, J.T. & Mullet, J.E.** (1990) "Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes.", *Plant Mol. Biol.* **15**: 11-26.
- Gupta, C.B. & Eskin, N.A.M.** (1977) "Potencial use of vegetable rennet in the production of cheese", *Food Technol.* **77**: 62-5.
- Hames, B.D.** (1990) "One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis", en "Gel electrophoresis of proteins. A practical approach" (B.D Hames & D. Rickwood, eds.) IRL Press at Oxford University Press, Oxford, págs. 1-144.
- Haq, S.K., Rasheedi, S. & Khan, R.H.** (2002) "Characterization of a partially folded intermediate of stem bromelain at low pH", *Eur. J. Biochem.* **269**: 47-52.
- 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.
- Harrak, H., Azelmat, S., Baker, E.N. & Tabaeizadeh, Z.** (2001) "Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*)", *Genome* **44**: 368-74.
- Hartley, B.S.** (1960) "Proteolytic enzymes", *Ann. Rev. Biochem.* **29**: 45-72.
- Hashimoto, F., Horigome, T., Kanbayashi, M., Yoshida, K. & Sugano, H.** (1983) "An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel", *Anal. Biochem.* **129**: 192-9.
- Hatano, K., Kojima, M., Tanokura, M. & Takahashi, K.** (1996) "Solution structure of bromelain inhibitor VI from pineapple stem: structural similarity with Bowman-Birk trypsin/chymotrypsin inhibitor from soybean", *Biochemistry* **35**: 5379-84.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Da Silva Figueredo, A.C. & Pais, M.S.S.** (1990) "Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*", *Phytochemistry* **29**: 1405-10.
- Hensel, L.L., Grbic, V., Baumgarten, D.A. & Bleecker, A.B.** (1993) "Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in arabidopsis", *Plant Cell* **5**: 553-64.
- Ho, S.L., Tong, W.F. & Yu, S.M.** (2000) "Multiple mode regulation of a cysteine proteinase gene expression in rice", *Plant Physiol.* **122**: 57-66.
- Hubbard, S. & Beynon, R.J.** (2001) en "Proteolytic enzymes: a practical approach" (Beynon & Bond, eds.), Second Edition, Oxford University Press, capítulo 10.
- Inei-Shizukawa, G.M., Oliver, M.T., Cruz, M.T., del Castillo, L.M. & Castañeda-Agulló, M.** (1976) "Proteinasas de plantas mexicanas V. Investigaciones acerca de la actividad de la mexicaína y la hemisfericina", *Rev. Latinoamer. Quím.* **87**: 131-6.
- Jaffé, W.G.** (1943) "Sobre un nuevo fermento proteolítico vegetal de la clase de las papainasas", *Rev. Bras. Biol.* **3**: 149-51.

- Janzen, D.H. & Martin, P.S.** (1982) "Neotropical anachronisms: the fruits the gomphotheres ate", *Science* **215**: 19-27.
- Jaziri, M., Kleinschmidt, T., Walraevens, V., Schneck, A.G. & Looze, Y.** (1994) "Primary structure of CC-III, the glycosylated cysteine proteinase from the latex of *Carica candamarcensis* Hook", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**: 379-85.
- Jones, M.L., Larsen, P.B. & Woodson, W.R.** (1995) "Ethylene-regulated expression of a carnation cysteine proteinase during flower petal senescence", *Plant. Mol. Biol.* **28**: 505-12.
- Kaneda, M. & Tominaga, N.** (1975) "Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit", *J. Biochem.* **78**: 1287 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.
- Kaneda, M. & Tominaga, N.** (1977) "Isolation and characterization of a proteinase from white gourd", *Phytochemistry* **16**: 345 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.
- Kaneda, M., Nagatome, S. & Uchikoba, T.** (1995) "Comparison of phytolacain R, a cysteine protease from *Phytolacca americana*, with papain", *Phytochemistry* **39**: 997-9.
- Kato, H. & Minamikawa, T.** (1996) "Identification and characterization of a rice cysteine endopeptidase that digests glutelin", *Eur. J. Biochem.* **239**: 310-6.
- Kimmel, J.R. & Smith, E.L.** (1971) "The properties of papain", *Adv. Enzymol.* **19**: 267-71.
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H. & Shinozaki, K.** (1993) "Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*", *Gene* **129**: 175-82.
- Kruger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M., Tang, S., Mulder, L. & Jones, J.D.** (2002) "A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis", *Science* **296**: 744-7.
- Laemmli, U.K.** (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* **227**: 680-5.
- Lahl, W.J. & Brown, S.D.** (1994) "Enzymatic production of protein hydrolyzates for food use", *Food Technol.* **48**: 68-71.
- Laidler, K.J. & Cornish-Bowden, A.** (1997) "Elizabeth Fulhame and the discovery of catalysis: 100 years before Buchner", en "New beer in an old bottle: Eduard Buchner and the growth of biochemical knowledge" (Cornish-Bowden, A., ed.), Universitat de València, Valencia, España, págs. 123-26.
- Lamas, E.M., Barros, R.M., Balcão, V.M., & Malcata, F.X.** (2001) "Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports", *Enzyme Microb. Technol.* **28**: 642-652
- 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., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000) "Principles of Biochemistry", 3rd ed., Worth, Publishers, New York, págs. 243-4.

Lemieux, L., Puchades, R. & Simard, R.E. (1989) "Size-exclusion HPLC separation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese made with added *Lactobacillus* strains to accelerate ripening", *J. Food Sci.* **54**: 1234-7.

León-Alcalá, F., Rivas-Rueda, L.A., Cruz, M.T., Castañeda-Agulló, M. & del Castillo, M.L. (1989) "Enzymes of mexican plants XV. Separation of multiple molecular forms of hemisphaericin and palmerin", *Rev. Latinoamer. Quím.* **20**: 133-6.

Li, Q., Bettany, A.J., Donnison, I., Griffiths, C.M., Thomas, H. & Scott, I.M. (2000) "Characterisation of a cysteine protease cDNA from *Lolium multiflorum* leaves and its expression during senescence and cytokinin treatment", *Biochim. Biophys. Acta* **1492**: 233-6.

Linthorst, H.G., van der Does, C., Brederode, F.T. & Bol, J.F. (1993) "Circadian expression and induction by wounding of tobacco genes for cysteine proteinase", *Plant Mol. Biol.* **21**: 685-94.

Llorente, B., Brutti, C., Cimino, C., Vairo Cavalli, S., Natalucci, C.L. & Caffini, N.O. (1999) "Presence of milk clotting proteinases in *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe (*Asteraceae*)", *Acta Horticulturae* **501**: 249-57.

Llorente, B.E., Brutti, C.B., Natalucci, C.L. & Caffini, N.O. (1997) "Partial characterization of a milk clotting proteinase isolated from artichoke (*Cynara scolymus* L., *Asteraceae*)", *Acta Farm. Bonaerense* **16**: 37-42.

Loomis, W.D. & Battaile, J. (1966) "Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes", *Phytochemistry* **5**: 423-38.

López, L.M.I. (1995) "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (*Moraceae*)". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

López, L.M.I., Brullo, A., Natalucci, C.L., Caffini, N.O., Sorgentini, D., & Wagner, J. (1998) "Thermal behavior, solubility and structural properties of soy concentrate hydrolyzed by new plant proteases", *J. Food Biochem.* **22**: 125-41.

López, L.M.I., Natalucci, C.L., Caffini, N.O. & Curotto, E. (1993) "Isolation and partial purification of serine proteinases present in the latex of *Maclura pomifera* ("osage orange") fruits", *Acta Aliment. (Budapest)* **22**: 131-42.

López, L.M.I., Sequeiros, C., Natalucci, C.L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D. & Caffini, N.O. (2000) "Purification and characterization of macradontain I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas Macrodonates* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)", *Protein Expression and Purification* **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 macrodonates*

- (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **382**: 875-8.
- Lozano de la Torre, M.J. & Lorente Toledano, F.** (1999) "Mesa Redonda: Alergia e intolerancia alimentaria. Aspectos Terapeuticos", *Biol. Pediatr.* **39**: 172-80.
- Luther, H.E. & Sieff, E.** (1991) "An alphabetical list of Bromeliad binomials", 1st. Ed., Bromeliad Society International, Orlando, Florida.
- Lynn, K.R. & Clevette-Radford, N.A.** (1987) "Biochemical properties of latices from the *Euphorbiaceae*", *Phytochemistry* **26**: 939-44.
- Lynn, K.R. & Clevette-Radford, N.A.** (1988) "Proteases of *Euphorbiaceae*", *Phytochemistry* **27**: 45-50.
- 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., London, págs. 211-2.
- Maubois, J.L., Pierre, A., Fauquant, J. & Piot, M.** (1988) "Industrial fractionation of main whey proteins", *Bulletin of the IDF* **212**: 154-9.
- Mbeguie-A-Mbeguie, D., Gomez, R.M. & Fils-Lycaon, B.** (1997) "Sequence of AFTP1, a cysteine proteinase from apricot fruit (Accession No. U93166). Gene expression during fruit ripening. (PGR97-179)", *Plant Physiol.* **115**: 1730-5.
- McKenzie, H.A.** (1971), en "Milk proteins. Chemistry and molecular biology," Vol. 2, Academic Press, New York.
- Messing, R.A.** (1960) "Properties of the protease pinguinain", *Enzymologia* **22**: 117 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.
- Messing, R.A., Santoro, A.F. & Block, A.** (1960) "Preparation and purification of pinguinain", *Enzymologia* **22**: 110-6.
- Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., Bernier-Vadnais, N., Faye, L. & Yelle, S.** (1994) "Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber", *Physiologia Plantarum* **90**: 497-503.
- Mikkonen, A., Porali, I., Cercos, M. & Ho, T.H.** (1996) "A major cysteine proteinase, EPB, in germinating barley seeds: structure of two intronless genes and regulation of expression", *Plant Mol. Biol.* **31**: 239-54.
- Montes Horcasitas M.C. & Magaña Plaza, I.** (2002) "Enzimas con aplicación industrial", *Avance y Perspectiva* **21**: 279-82.
- Montes, C., Amador, M., Cuevas, D. & Córdoba, F.** (1990) "Subunit structure of karataasin, the proteinase isolated from *Bromelia plumieri* (karatas)", *Agric. Biol. Chem.* **54**: 17-24.
- Murachi, T.** (1970) "Bromelain enzymes", *Meth. Enzymol.* **19**: 273-84.

Murachi, T. (1976) "Bromelain enzymes", *Methods Enzymol.* **45**: 475 en Dalling, M.J. (1986) "Plant proteolytic enzymes", Vol I. CRC Press, Inc., Florida.

Muta, E., Okamoto, Y. & Ota, S. (1997) "Cloning and sequencing of cysteine proteinases in *Ananas comosus*"; Submitted (OCT-1997) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, URL: <http://www.expasy.ch>.

Naito, Y., Fujie, M., Usami, S., Murooka, Y. & Yamada, T. (2000) "The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. *renger*", *Plant Physiol.* **124**: 1087-96.

Napper, A.D., Bennett, S.P., Borowski, M., Holdridge, M.B., Leonard, M.J.C., Rogers, E.E., Duan, Y., Laursen, R.A., Reinhold, B. & Shames, S.L. (1994) "Purification and characterization of the pineapple stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain", *Biochem. J.* **301**: 727-35.

Natalucci, C.L., Brullo, A., López, L.M.I., Hilal, R.M. & Caffini, N.O. (1996) "Macrodonin, a new protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)", *J. Food Biochem.* **19**: 443-54.

Natalucci, C.L., Priolo, N.S., Buttazzoni, M.S. & Caffini, N.O. (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., Priolo, N.S., Caffini, N.O. & López, L.M.I. (1988) "Proteasas de *Bromeliaceae* V. Separación y purificación de sulfhidrilproteasas de frutos de *Bromelia balansae* Mez", *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 179-85.

Noh, Y.S. & Amasino, R.M. (1999) "Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus*", *Plant Mol. Biol.* **41**: 195-206.

Nong, V.H., Becker, C., & Muntz, K. (1995) "cDNA cloning for a putative cysteine proteinase from developing seeds of soybean", *Biochem. Biophys. Acta* **1261**: 435-8.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. & Morris, N.R. (1980) "A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels", *Anal. Biochem.* **105**: 361-3.

Obregón, W.D., Arribére, M.S., 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", *Journal of Protein Chemistry* **20**: 317-25.

Ochoa, N., Agundis, C. & Córdoba, F. (1987) "Isolation and partial characterization of *Bromelia hemisphaerica* protease by affinity chromatography", *Prep. Biochem.* **17**: 337-47.

Okamoto, T., Toyooka, K. & Minamikawa, T. (2001) "Identification of a membrane-associated cysteine protease with possible dual roles in the endoplasmic reticulum and protein storage vacuole", *J. Biol. Chem.* **276**: 742-51.

Ota, S., Moore, S. & Stein, W.H. (1964) "Preparation and properties of purified stem and fruit bromelains", *Biochemistry* **3**: 180-5.

Ota, S., Muta, E., Katanita, Y. & Okamoto, Y. (1985) "Reinvestigation of the

fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelains”, *J. Biochem. (Tokyo)* **98**: 219-28.

Padmanabhan, S., Chitre, A. & Shastri, N. (1993) “Milk clotting protease isolated from *Dieffenbachia maculata*”, *Die Nahrung* **37**: 99-101.

Pal, G.P. & Sinha, N.K. (1980) “Isolation, cristallization, and properties of calotropins DI and DII from *Calotropis gigantea*”, *Arch. Biochem. Biophys. Acta* **2020**: 321-9.

Pardo, M.F. & Natalucci, C.L. (2002) “Electrophoretic Analysis (Tricine SDS-PAGE) of bovine caseins”, *Acta Farm. Bonaerense* **21**: 57-60.

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. Hoppe-Seyler* **382**: 871-4.

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.

Park, Y.W. (2001) “Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese” *J. Dairy Sci.* **84**: 84-92.

Pechan, T., Jiang, B., Steckler, D., Ye, L., Lin, L., Luthe, D.S. & Williams, W.P. (1999) “Characterization of three distinct cDNA clones encoding cysteine proteinases from maize (*Zea mays* L.) callus”, *Plant Mol. Biol.* **40**: 111-9.

Pedersen, B. (1994) “Removing bitterness from protein hydrolysates”, *Food Technol.* **48**: 96-8.

Perelló, M., Arribére, M.C., Caffini, N.O. & Priolo, N.S. (2000) “Proteolytic enzymes from the latex of *Ficus pumila* L. (*Moraceae*)”, *Acta Farm. Bonaerense* **19**: 257-62.

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., Arribére, M.C., Caffini, N., Barberis, S., Nieto Vázquez, R. & Luco, J. (2001) “Isolation and purification of three cysteine peptidases from the latex of *Araujia hortorum* fruits. Study of their esterase activities using partial least-squares (PLS) modeling”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **15**: 177-89.

Priolo, N., Arribére, M.C., Cortadi, A., Gattuso, M., Vairo Cavalli, S. & Caffini, N.O. (2003). "Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)", *Journal of Protein Chemistry* **22**: 15-22.

Priolo, N.S., Buttazzoni, M.S., Caffini, N.O. & Natalucci, C.L. (1986) "Proteasas de *Bromeliaceae* III. Condiciones óptimas de acción, estabilidad y purificación de la proteasa aislada de frutos de *Bromelia laciniosa* Mez", *Acta Farm. Bonaerense* **5**: 159-64.

Priolo, N.S., López, L.M.I., Arribére, M.C., Natalucci C.L. & Caffini, N.O. (1991) "New purified plant proteinases for the food industry", *Acta Aliment. (Budapest)* **20**: 189-96.

- Priolo, N.S., Morcelle del Valle, S., Arribére, C., López, L.M.I. & Caffini, N.O.** (2000) "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits", *Journal of Protein Chemistry* **19**: 39-49.
- Rawlings, N.D. & Barret, A.J.** (1994a) "Families of serine peptidases", *Meth. Enzymol.* **244**: 19-61.
- Rawlings, N.D. & Barret, A.J.** (1994b) "Families of cysteine peptidases", *Meth. Enzymol.* **244**: 461-86.
- Rawlings, N.D. & Barret, A.J.** (1995a) "Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism", *Meth. Enzymol.* **248**: 105-20.
- Rawlings, N.D. & Barret, A.J.** (1995b) "Evolutionary families of metallopeptidases", *Meth. Enzymol.* **248**: 183-228.
- Reisner, W.** (1981) *Röhm Spektrum*, **27**: 48, en **Uhlig, H.** (1998) "Industrial enzymes and their applications", Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., NY, Toronto, pág. 2.
- Revell, D.F., Cummings, N.J., Baker, K.C., Collins, M.E., Taylor, M.A., 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.
- Ríos-Mercadillo, V., Orozco, M., Rodríguez, A., Hernández, A., Oliver, M.d.C., Castañeda-Agulló, M. & del Castillo, L.M.** (1978) "Proteinasas de plantas mexicanas VIII. Actividad de la mexicaína y la hemisfericina inmovilizadas en geles de agarosa", *Rev. Latinoamer. Quím.* **9**: 55-60.
- Ritonja, A., Rowan, A.D., Buttle, D.J., Rawlings, N.D., Turk, V. & Barrett, A.J.** (1989) "Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin", *FEBS Lett.* **247**: 419-24.
- Rogers, J.C., Dean, D. & Heck, G.R.** (1985) "Aleurain: a barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 6512-6.
- Rotari, V., Senyuk, V., Horstmann, C., Jivotovskaya, A. & Vaintraub, I.** (1997) "Proteinase A - like enzyme from germinated kidney bean seeds. Its action on phaseolin and vicilin", *Physiologia Plantarum* **100**: 171-7.
- Rowan, A.D. & Buttle, D.J.** (1994) "Pineapple cysteine endopeptidases", *Meth. Enzymol.* **244**: 555-68.
- 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.** (1990a) "The cysteine proteinases of the pineapple plant", *Biochem. J.* **266**: 869-75.
- Rowan, A.D., Christopher, C.W., Kelly, S.F., Buttle, D.J. & Ehrlich, H.P.** (1990b) "Debridement of experimental full-thickness skin burns of rats with enzyme fractions

derived from pineapple stem”, *Burns* **16**: 478-84.

Salvesen, G. & H. Nagase (2001) "Inhibition of proteolytic enzymes", en "Proteolytic enzymes, a practical approach", 2ª. Ed. (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.) Oxford University Press, Oxford, págs. 105-30.

Sarath, G., Zeece, M.G. & Penheiter, A.R. (2001) "Protease assay methods", en "Proteolytic enzymes, a practical approach", 2ª. Ed. (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.), Oxford University Press, Oxford, pág. 48.

Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Katoh, T., Asamizu, E. & Tabata, S. (2000) "Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3. I. Sequence features of the regions of 4,504,864 bp covered by sixty P1 and TAC clones”, *DNA Res.* **7**: 131-5.

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987) "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa”, *Anal. Biochem.* **166**: 368-79.

Schechter, I & Berger, A. (1967) "On the size of the active site in proteases”, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **27**: 157-62.

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 rinosoma, a putative lytic compartment”, *Planta* **206**: 466-75.

Schmidl, M.K., Taylor, S.L. & Nordlee, J.A. (1994) "Use of hydrolysate-based products in special medical diets”, *Food Technol.*, **48**: 77-85.

Scopes, R.K. (1984) "Protein purification. Principles and practice", Springer-Verlag, N.Y., pág. 219.

Sequeiros, C., López, L.M.I., Caffini, N.O. & Natalucci, C.L. (2003) "Proteolytic activity in some patagonian plants from Argentina”, *Fitoterapia* **74**: 569-76

Sgarbieri, V.C., Gupte, S.M., Kramer, D.E., Whitaker, J.R. (1964) "Ficus enzymes I. Separation of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* latices”, *J. Biol. Chem.* **239**: 2170-5.

Shalabi, S.I. & Fox, P. (1987) "Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods”, *Irish Journal of Food Science and Technology* **11**: 135-51.

Sicard, P. (1982) "Applications industrielles des enzymes", en "Les enzymes. Productions et utilisations industrielles" (G. Durand y P. Monsan, eds.), Gauthier-Villars, Paris, págs. 121-64.

Silva, S.V. & Malcata, F.X. (1999) "On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase on ovine caseins”, *Food Chem.* **67**: 373-8.

Skelton, G.S. (1969) "Development of proteolytic enzymes in growing papaya fruit”, *Phytochemistry* **8**: 57-9.

Sousa, M.J. & Malcata, F.X. (1997) "Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of

Cynara cardunculus”, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **205**: 97-103.

Steinke, F.H., Waggle, D.H. & Volgarev, M.N. (1992) “New protein foods in human health: nutrition, prevention and therapy”, CRC Press., Florida.

Strange, E.D., Malin, E.L., Van Hekken, D.L. & Basch, J.J. (1992). “Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins”, *Journal of Chromatography* **624**: 81-102.

Sumner, J.B. (1926) “The isolation and crystallization of the enzyme urease”, *J. Biol. Chem.* **69**: 435-41.

Tamer, I.M. (1993) “Identification and parcial purification of a novel milk enzyme from *Onopordum turcicum*”, *Biotechnol. Lett.* **15**: 427-32.

Tanaka, T., Yamauchi, D. & Minamikawa, T. (1991) “Nucleotide sequence of cDNA for an endopeptidase (EP-C1) from pods of maturing *Phaseolus vulgaris* fruits”, *Plant Mol. Biol.* **16**: 1083-4.

Tavaria, F.K., Souza, M.J., Domingos, A., Malcata, F.X., Brodelius, P., Clemente, A. & Pais, M.S. (1997) “Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*”, *J. Agric. Food Chem.* **45**: 3760-5.

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.

Tooke, H.L. & **Gentry**, H.S. (1969) “Proteinase of *Jarilla chocolla*, a relative of papaya”, *Phytochemistry* **8**: 989-91.

Toro-Goyco, E., Maretzki, A. & Matos, M.L. (1968) “Isolation, purification and partial characterization of pinguinain, the proteolytic enzyme from *Bromelia pinguin* L.”, *Arch. Biochem. Biophys.* **126**: 91-104.

Toro-Goyco, E., Rodríguez-Costas, I. & Ehrig, H. (1980) “Structural studies on pinguinain. Changes induced by carboxamidomethylation” *Biochim. Biophys. Acta* **622**: 151-9.

Tranbarger, T.J. & **Misra**, S. (1996) “Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotzain) from Douglas fir”, *Gene* **172**: 221-6.

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 the latex of *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*)”, *Journal of Protein Chemistry* **20**: 445-53.

Ueda, T., Seo, S., Ohashi, Y. & Hashimoto, J. (2000) “Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene”, *Plant Mol. Biol.* **44**: 649-57.

Uhlig, H. (1998) “Industrial enzymes and their applications”, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., NY, Toronto, págs. 1-6; 146-51.

Vairo Cavalli, S., Arribére, M.C., Cortadi, A., Caffini, N. & Priolo, N. (2003) "Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)", *Journal of Protein Chemistry* **22**: 15-22.

Vairo Cavalli, S.E., Cortadi, A., Arribére, M.C., Conforti, P., Caffini, N.O. & Priolo, N.S. (2001) "Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **382**: 879-83.

Verissimo, P., Ramalho-Santos, M., Faro, C. & Pires, E. (1998) "A comparative study on the aspartic proteinases from different species of *Cynara*", en: *Aspartic Proteinases* (N.M.G. James, ed.), Plenum Press, New York, USA, págs. 459-63.

Visser, S. (1993) "Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview", *J. Dairy Sci.* **76**: 329-50.

Walraevens, V., Jaziri, M., Van Beeumen, J., Schneck, A.G., Kleinschmidt, T. & Looze, Y. (1993) "Isolation and preliminary characterization of the cysteine proteinases of the latex of *Carica candamarcensis* Hook", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**: 501-6.

Walter, W.G. & Khanna, P.N. (1972) "Chemistry of the Aroids. I. *Dieffenbachia seguine, amoena* and *picta*", *Econ. Bot.* **26**: 364-72.

Wan, L., Xia, Q., Qiu, X. & Selvaraj, G. (2002) "Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument", *Plant J.* **30**: 1-10.

Watanabe, H., Abe, K., Emori, Y., Hosoyama, H. & Arai, S. (1991) "Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains)", *J. Biol. Chem.* **266**: 16897-902.

Watson, D.C., Yaguchi, M. & Lynn, K.R. (1990) "The amino acid sequence of chymopapain from *Carica papaya*", *Biochem. J.* **266**: 75-81.

Westergaar, J.L., Hackbarth, C., Treuhaft, M.W. & Roberts, M.C. (1980) "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures", *J. Immunol. Meth.* **34**: 167-75.

Whitaker, J.R. (1982) "Enzymes of importance in high protein foods", en "Use of enzymes in food technology" (P. Dupuy, ed.), Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, págs. 329-58.

Williams, J., Bulman, M., Huttly, A., Phillips, A. & Neill, S. (1994) "Characterization of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* encoding a potential thiol-protease whose expression is induced independently by wilting and abscisic acid", *Plant Mol. Biol.* **25**: 259-70.

Wu, W. & Welsh, M.J. (1996) "A method for rapid Coomassie Blue staining and destaining of polyacrylamide gels", *Biotechnology* **20**: 386-8.

X-Rite (2002). URL: http://www.xrite.com/documents/literature/en/L10-001_Understand_Color_en.pdf

- Xu, F.X. & Chye, M.L.** (1999) "Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal", *Plant J.* **17**: 321-7.
- Yamada, F., Takahashi, N. & Murachi, T.** (1976) "Purification and characterization of a proteinase from pineapple fruit, fruit bromelain FA2", *J Biochem (Tokyo)* **79**: 1223-34.
- Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, Y. & Kiso, H.** (1982) "Proteolytic enzymes in green asparagus, kiwi fruit and miut: occurrence and partial characterization", *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1983-6.
- Yamuchi, D., Akasofu, H. & Minamikawa, T.** (1992) "Cysteine endopeptidase from *Vigna mungo*. Gene structure and expression", *Plant Cell Physiol.* **33**: 789-97.
- Ye, Z.H. & Varner, J.E.** (1996) "Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*", *Plant Mol. Biol.* **30**: 1233-46.
- Yu, W.J. & Greenwood, J.S.** (1994) "Purification and characterization of a cysteine proteinase involved in globulin hydrolysis in germinated *Vicia faba* L", *J. Exp. Bot.* **45**: 261-8.