

Aspartilendopeptidasas de *Silybum marianum* (L.)
Gaertn. con potencial aplicación en la industria láctea



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



TESIS
N.º 1064

LIPROVE - Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas – Universidad Nacional de La Plata

Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas
Año 2005

Sandra E. Vairo Cavalli

Directora de Tesis: Dra. Nora S. Priolo

Co-directora de Tesis: Dra. Claudia L. Natalucci

A mis padres

A Luis, a nuestros hijos

Agradecimientos

Al CONICET por permitirme emprender y desarrollar este trabajo de investigación.

A la comunidad universitaria de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, que se esmeró por brindarme una formación profesional.

A la Dra. Nora S. Priolo y la Dra. Claudia L. Natalucci por iniciarme en el camino de la investigación, por su comprensión y amistad.

Al LIPROVE por haber sido un segundo hogar.

Al Dr. Néstor O. Caffini por ser más que el director de un laboratorio el padre de una familia.

A la Qca. Cecilia Cimino, a los Sres. Santiago Claver y Francisco Spina y al Bqco. David Obregón que llevaron a cabo distintas determinaciones.

Al CYTED por permitirme realizar el tan ansiado viaje de estudios.

Al Dr. Carlos Faro y la Dra Paula Veríssimo por guiarme con tanto esmero durante mi trabajo en Portugal.

Al Dr. Euclides Pires y su esposa Regina por hacer más comfortable nuestra estadia en Coimbra.



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

TESIS
Nº 1064

| | |
|----------------------------|--|
| COLECCIÓN..... | |
| | |
| FECHA 07.04.05 | |
| INV. Nº..... INV. Nº 97390 | |

| | |
|---|----|
| Objetivos generales | 1 |
| CAPITULO I | |
| Introducción | 2 |
| 1. Enzimas proteolíticas: generalidades | 2 |
| 1.1. Interacción peptidasa-sustrato | 2 |
| 2. Nomenclatura y clasificación de las enzimas proteolíticas | 3 |
| 2.1. El sistema de clasificación de peptidasas EC | 4 |
| 2.2. El sistema de clasificación de peptidasas MEROPS | 5 |
| 3. Los tipos catalíticos de las endopeptidasas | 6 |
| 3.1. Peptidasas cisteínicas | 7 |
| 3.2. Peptidasas serínicas | 7 |
| 3.3. Peptidasas treonínicas | 8 |
| 3.4. Metalopeptidasas | 8 |
| 3.5. Peptidasas aspárticas | 8 |
| 3.5.1. Aspectos estructurales | 10 |
| 3.5.2. Mecanismo catalítico | 10 |
| 3.5.3. Peptidasas aspárticas de plantas | 12 |
| 3.5.3.1. Organización de la estructura primaria | 12 |
| 3.5.3.1. Estructura terciaria de las peptidasas aspárticas de plantas | 14 |
| 3.5.3.2. Funciones biológicas | 15 |
| 3.5.3.3. Peptidasas aspárticas en la familia Asteraceae | 15 |
| 3.5.3.3.1. Género <i>Cynara</i> L. | 15 |
| 3.5.3.3.1.1. <i>Cynara cardunculus</i> L. | 15 |
| 3.5.3.3.1.1.1. Cyprosinas | 16 |
| 3.5.3.3.1.1.2. Cardosinas | 17 |
| 3.5.3.3.1.2. <i>Cynara humilis</i> L. | 18 |
| 3.5.3.3.1.3. <i>Cynara scolymus</i> L. | 18 |

| | |
|--|----|
| 3.5.3.3.2. Género <i>Centaurea</i> L. | 18 |
| 3.5.3.3.3. Género <i>Onopordum</i> L. | 19 |
| 3.5.3.3.4. Género <i>Silybum</i> Adans. nom. cons | 19 |
| Objetivos específicos | 20 |
| Materiales y Métodos | 21 |
| 1. Material Vegetal | 21 |
| 2. Obtención del extracto crudo | 22 |
| 3. Determinación del contenido en proteínas | 22 |
| 3.1. Método de Bradford | 22 |
| 3.1.1. Macrométodo | 23 |
| 3.1.2. Micrométodo | 23 |
| 3.2. Método del ácido bicinconínico | 23 |
| 4. Determinación de la actividad proteolítica con distintos sustratos | 24 |
| 4.1. Actividad coagulante de leche | 24 |
| 4.2. Actividad sobre azocaseína | 24 |
| 4.3. Actividad sobre hemoglobina | 25 |
| 4.4. Actividad sobre caseína | 25 |
| 5. Efecto del tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas | 26 |
| 6. Selección del método para la eliminación de pigmentos | 26 |
| 6.1. Tratamiento con carbón activado | 26 |
| 6.2. Tratamiento en columna de Sephadex G-25 | 27 |
| 6.2.1. Preparación del gel y armado de la columna | 27 |
| 6.2.2. Siembra y desarrollo del cromatograma | 27 |
| 6.2.3. Análisis de los extractivos parcialmente purificados | 28 |
| 6.2.3.1. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica empleando hemoglobina como sustrato | 28 |
| 7. Liofilización de las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas | 28 |
| 8. Métodos de concentración de las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas | 29 |

| | |
|--|----|
| 8.1. Precipitación con acetona y redisolución en buffer | 29 |
| 8.2. Eliminación de agua por hidratación de Sephadex G-25 | 30 |
| 8.3. Liofilización | 30 |
| 9. Electroforesis desnaturante - discontinua (SDS-PAGE) | 30 |
| 9.1. Electroforesis desnaturante – discontinua en condiciones reductoras (método con Tris-Glicina) | 30 |
| 9.1.1. Preparación de las muestras | 30 |
| 9.1.2. Preparación de los geles | 31 |
| 9.1.3. Aplicación de las muestras | 32 |
| 9.1.4. Condiciones de corrida | 33 |
| 9.1.5. Fijación y coloración | 33 |
| 9.1.6. Adquisición de imágenes y deshidratación de los geles | 33 |
| 9.1.7. Estimación de los pesos moleculares | 34 |
| 9.2. Electroforesis desnaturante – discontinua en condiciones reductoras y no reductoras (método con Bicina) | 34 |
| 9.2.1. Preparación de las muestras | 34 |
| 9.2.2. Preparación de los geles | 35 |
| 9.2.3. Aplicación de las muestras | 35 |
| 9.2.4. Condiciones de corrida | 36 |
| 9.2.5. Fijación, coloración y secado de geles | 36 |
| 9.2.5.1. Método de tinción con plata | 36 |
| 9.2.5.1.1. Fijación | 37 |
| 9.2.5.1.2. Lavado y sensibilización de los geles | 37 |
| 9.2.5.1.3. Tratamiento con plata | 37 |
| 9.2.5.1.4. Desarrollo de la coloración | 37 |
| 9.2.6. Estimación de los pesos moleculares | 38 |
| 10. Isoelectroenfoque | 38 |
| 10.1. Preparación de las muestras | 38 |
| 10.2. Preparación de los geles | 39 |
| 10.3. Aplicación de las muestras | 40 |

| | |
|---|----|
| 10.4. Desarrollo del IEF | 40 |
| 10.5. Fijación, coloración y secado de geles | 40 |
| 10.6. Estimación de los puntos isoelectricos | 41 |
| 11. Zimograma | 41 |
| 11.1. Preparación de las placas agarosa-hemoglobina | 42 |
| 11.2. Desarrollo del zimograma | 42 |
| 11.3. Fijación | 42 |
| 11.4. Coloración | 42 |
| 11.5. Decoloración | 43 |
| 12. Purificación cromatográfica | 43 |
| 12.1. Cromatografía de afinidad | 43 |
| 12.1.1. Preparación de la columna cromatográfica | 43 |
| 12.1.2. Siembra y desarrollo de la cromatografía | 44 |
| 12.1.3. Reconstitución y conservación de la columna | 44 |
| 12.2. Cromatografía de exclusión molecular | 45 |
| 12.2.1. Preparación de la columna cromatográfica | 45 |
| 12.2.2. Acondicionamiento de la muestra | 45 |
| 12.2.3. Siembra y desarrollo de la cromatografía | 45 |
| 12.2.4. Reconstitución y conservación de la columna | 45 |
| 12.3. Cromatografía de intercambio aniónico | 46 |
| 12.3.1. Preparación de la columna cromatográfica | 46 |
| 12.3.2. Siembra y desarrollo de la cromatografía | 46 |
| 12.3.3. Regeneración y conservación de la columna | 46 |
| 13. Determinación de la actividad endopeptidásica sobre un sustrato sintético | 47 |
| 13.1. Detección de actividad enzimática | 47 |
| 13.2. Determinación del pH óptimo | 47 |
| 13.3. Estabilidad a la temperatura | 48 |
| 13.4. Determinación de la actividad enzimática en Unidades Internacionales | 48 |
| 13.5. Determinación de parámetros cinéticos | 48 |
| 14. Degradación de la cadena β de la insulina | 49 |
| 14.1. Hidrólisis | 49 |
| 14.2. Separación de los fragmentos peptídicos | 49 |

| | |
|---|----|
| 14.3. Análisis de la secuencia aminoacídica N-terminal de los péptidos obtenidos | 50 |
| 15. Ensayos de inhibición | 50 |
| Resultados y Discusión | 52 |
| 1. Fuente de peptidasas | 52 |
| 2. Obtención del extracto crudo | 53 |
| 2.1. Caracterización del extracto crudo | 54 |
| 2.1.1. Actividad endopeptidásica del extracto crudo | 54 |
| 2.1.2. Inhibición de la actividad endopeptidásica del extracto crudo | 55 |
| 2.1.3. Determinación del pI de las peptidasas con actividad proteolítica | 56 |
| 2.1.4. Conservación de las preparaciones enzimáticas crudas | 56 |
| 2.1.5. Espectro UV-Visible del extracto crudo | 57 |
| 3. Purificación parcial del extracto crudo | 57 |
| 3.1. Eliminación de pigmentos y otros compuestos fenólicos | 57 |
| 3.1.1. Tratamiento con carbón activado | 57 |
| 3.1.2. Tratamiento en columna de Sephadex G-25 | 58 |
| 3.2. Caracterización de los extractivos parcialmente purificados | 60 |
| 3.2.1. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica | 60 |
| 3.2.2. Efecto de inhibidores de peptidasas sobre las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas | 61 |
| 3.2.3. Liofilización de las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas | 62 |
| 3.2.4. Métodos de concentración de las preparaciones enzimáticas despigmentadas | 63 |
| 4. Purificación cromatográfica | 64 |
| 4.1. Estrategia 1: Cromatografía de afinidad | 64 |
| 4.2. Estrategia 2: Cromatografía de intercambio iónico por FPLC | 66 |
| 4.2.1. Cromatografía de exclusión molecular | 66 |

| | |
|---|----|
| 4.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico | 67 |
| 4.2.3. Esquema de purificación | 71 |
| 5. Caracterización de silprosina | 72 |
| 5.1. Hidrólisis de la cadena β oxidada de insulina por silprosina | 72 |
| 5.1.1. Efecto del pH | 72 |
| 5.1.2. Efecto de inhibidores específicos de grupo | 75 |
| 5.1.3. Identificación por secuenciación automática de los enlaces peptídicos hidrolizados | 78 |
| 5.2. Hidrólisis del péptido sintético MCA-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu-DNP | 82 |
| 5.2.1. Perfil de pH de silprosina | 82 |
| 5.2.2. Estabilidad a la temperatura | 83 |
| 5.2.3. Determinación de parámetros cinéticos | 83 |
| Bibliografía | 85 |

CAPITULO 2

| | |
|--|-----|
| Introducción | 91 |
| 1. Las peptidasas en la industria | 91 |
| 2. Leches | 93 |
| 2.1. Las caseínas | 94 |
| 2.1.1. Descripción de las micelas de caseína | 96 |
| 3. Transformación de la leche en quesos | 98 |
| 3.1. Coagulación enzimática de la leche para la producción de quesos | 98 |
| 3.2. Sinéresis de la cuajada | 100 |
| 3.3. Maduración | 101 |
| 3.3.1. Importancia de los procesos proteolíticos durante la maduración de los quesos | 101 |
| 3.3.1.1. Estudio de la proteólisis primaria y secundaria | 102 |
| 3.4. Cuajos | 103 |
| 3.4.1. Cuajo de ternero | 104 |
| 3.4.2. Cuajos alternativos al de ternero | 105 |
| 3.4.2.3. Cuajos vegetales | 106 |

| | |
|--|-----|
| Objetivos | 108 |
| Materiales y Métodos | 109 |
| 1. Determinación de la actividad coagulante de leche | 109 |
| 1.1. Efecto del NaCl sobre la actividad coagulante | 109 |
| 1.2. Efecto del CaCl ₂ sobre la actividad coagulante | 109 |
| 1.3. Estabilidad de la preparación enzimática a 37°C | 109 |
| 2. Hidrólisis de caseínas | 110 |
| 2.1. Preparación de caseinatos | 110 |
| 2.2. Desarrollo de la hidrólisis | 110 |
| 3. Electroforesis desnaturante- discontinua con urea en geles de poliacrilamida | 111 |
| 3.1. Preparación de las Muestras | 111 |
| 3.2. Preparación de los geles | 111 |
| 3.2.1. Cálculo de la composición de las mezclas de acrilamida-bisacrilamida (A-B): | 112 |
| 3.2.2. Gel de resolución | 112 |
| 3.2.3. Gel de "stacking" | 113 |
| 3.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida | 114 |
| 3.4. Fijación, coloración y secado de los geles | 114 |
| 3.4.1. Secado y almacenamiento de geles | 115 |
| 4. Electroforesis desnaturante-discontinua con tricina- SDS en geles de poliacrilamida para la separación de proteínas en el rango 1-100 kDa | 115 |
| 4.1. Preparación de los geles | 116 |
| 4.2. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida | 117 |
| 4.2.5. Condiciones de corrida | 118 |
| 4.3. Fijación, Coloración y Secado de los geles | 118 |
| 5. Tratamiento Analítico de Datos por Densitografía | 118 |
| 5.1 Captura y procesamiento preliminar de los datos | 118 |
| 5.2 Análisis de los datos por densitografía | 119 |
| Resultados y Discusión | 120 |
| 1. Actividad coagulante de leche de las preparaciones enzimáticas de <i>S. marianum</i> | 120 |
| 1.1. Efecto del NaCl | 120 |

| | |
|--|-----|
| 1.2. Efecto del CaCl_2 | 121 |
| 1.3. Estabilidad de la enzima a 37 °C | 122 |
| 2. Hidrólisis de caseínas | 123 |
| 2.1. Hidrólisis de caseínas bovinas | 124 |
| 2.1.1. Análisis por urea-PAGE | 124 |
| 2.1.1.1. Comparación del comportamiento con cuajo bovino comercial | 128 |
| 2.1.2. Análisis por tricina SDS-PAGE | 129 |
| 2.2. Hidrólisis de caseínas caprinas | 130 |
| 2.2.1. Análisis por urea-PAGE | 130 |
| 2.2.1.1. Comparación del comportamiento con cuajo bovino comercial | 133 |
| 2.2.2. Análisis por tricina SDS-PAGE | 134 |
| 2.3. Hidrólisis de Caseinato Ovino | 135 |
| 2.3.1. Análisis por urea-PAGE | 135 |
| 2.3.1.1. Comparación del comportamiento con cuajo bovino comercial | 138 |
| 2.3.2. Análisis por tricina SDS-PAGE | 140 |
| Bibliografía | 142 |
| Conclusiones | 145 |
| 1. Obtención de silprosina | 145 |
| 2. Actividad coagulante de leche e hidrólisis controlada de caseínas | 146 |
| 3. Purificación | 148 |
| 4. Caracterización de silprosina | 148 |



Silybum marianum (L.) Gaertn. Cardo mariano

-  Card maria, Cartxofa de burmo
-  Asta-li-kardo, Maria'ren kardia
-  Cardo-de-santa-Maria
-  Milk Thistle, St. Mary's thistle
-  Chardon Marie
-  Cardo mariano
-  Mariendistel

Cuenta la leyenda que las hojas de este cardo se mancharon de blanco gracias a la leche derramada por la Virgen María, que estaba amamantando al niño Jesús y que el cardo quedó bendecido y lleno de virtudes, por eso, su nombre en los diversos idiomas hace referencia a la leche y a María.

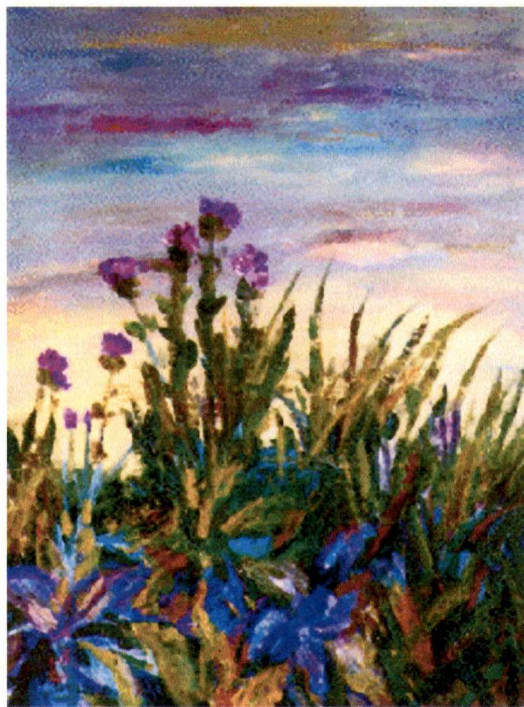
Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo fue aislar, purificar y caracterizar peptidasas aspárticas presentes en flores de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Asteraceae*) y estudiar su potencial aplicación como “cuajo vegetal”.

A partir de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener preparaciones enzimáticas crudas de flores de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. y caracterizar los extractivos obtenidos.
 2. Purificar parcialmente los extractos crudos y caracterizar las preparaciones parcialmente purificadas.
 3. Determinar la actividad coagulante de leche bovina de las preparaciones parcialmente purificadas.
 4. Obtener hidrolizados parciales de proteínas de leche bovina, caprina y ovina y realizar el análisis electroforético de los mismos.
 5. Purificar la enzima de interés a partir de los extractivos de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. y caracterizar la enzima purificada.
-

Capítulo 1



La luna y los cardos (Osvaldo Monteverde)

1. Enzimas proteolíticas: generalidades

La importancia y ubicuidad de las enzimas proteolíticas en la naturaleza es casi incomparable. Aproximadamente un 2% de los genes en la mayoría de los organismos codifican para proteasas, secundados en número sólo por los correspondientes a factores de transcripción. Puede decirse que este tipo de enzimas están involucradas virtualmente en cada uno de los procesos fisiológicos (Hedstrom, 2002a).

Su acción puede ser dividida en dos categorías diferentes:

1) proteólisis limitada, en la cual una proteasa cliva sólo uno o un número limitado de uniones peptídicas de la proteína blanco produciendo la activación o maduración de la proteína previamente inactiva, este es el caso de la conversión de prohormonas en hormonas (Green, 1984), el clivaje de péptidos señal de proteínas de secreción o de proteínas asociadas a membranas (Lively & Ashwell, 1999) o la activación de zimógenos (Stennicke & Salvesen, 2000);

2) proteólisis ilimitada, en la que las proteínas son degradadas hasta sus aminoácidos constituyentes. Las proteínas a ser degradadas son usualmente conjugadas a múltiples moléculas del polipéptido ubiquitina. Esta modificación implica una señal para que luego sean rápidamente hidrolizadas dentro del proteasoma en presencia de ATP (Amerik & Hochstrasser, 2004). Otra vía de degradación consiste en la compartimentalización de las proteasas dentro de lisosomas donde las proteínas transferidas a este compartimento son rápidamente degradadas (Gáborik & Hunyady, 2004).

1.1. Interacción peptidasa-sustrato

Las proteasas se unen al sustrato apropiado a través de los denominados sitios activos para luego catalizar la hidrólisis de la unión peptídica específica (McDonald, 1985).

En 1967 Schechter & Berger introdujeron una nomenclatura para describir las interacciones entre un sustrato y una proteasa que hoy en día es ampliamente usada en la literatura. En este sistema se considera que los residuos aminoácidos del sustrato polipeptídico se unen con la enzima en subsitios del sitio activo. Por convención, estos subsitios en la peptidasa se nombran S (inicial de subsitio) y los

residuos aminoacídicos del sustrato se nombran P (inicial de péptido). Los residuos aminoacídicos hacia el N-terminal del enlace escindible se numeran P₁, P₂, P₃ ... y aquéllos hacia el C-terminal se numeran P'₁, P'₂, P'₃.... Los residuos P₁ y P'₁ corresponden al enlace escindible. Los subsitios en la peptidasa que complementan los sitios de unión del sustrato se numeran ... S₃, S₂, S₁, S'₁, S'₂, S'₃...

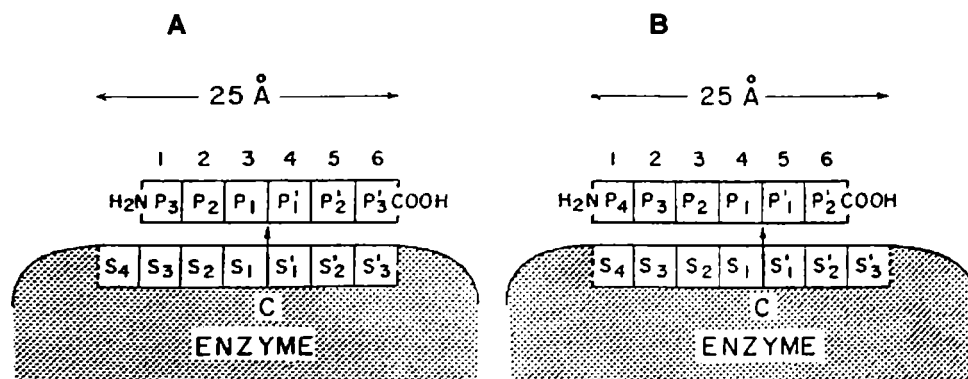


Figura 1. Interacción enzima-sustrato. **A.** El complejo enzima-sustrato liberará como producto dos tripéptidos. **B.** Este complejo liberará un tetrapéptido y un dipéptido. (Schechter & Berger, 1967).

2. Nomenclatura y clasificación de las enzimas proteolíticas

El primer término con el que se denominó a las enzimas proteolíticas fue *proteasas* y surgió a finales del siglo diecinueve como un término general que abarcaba a todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Más adelante un grupo de investigadores alemán sugirió el término *proteinasas* para denominar a aquellas proteasas que tienen como sustrato a las proteínas y *peptidasas* a aquellas enzimas que tienen como sustrato a los péptidos de menor peso molecular. Sin embargo también fue utilizado el término *peptidasa* en un sentido más amplio, abarcando a todas las hidrolasas del enlace peptídico (Barrett, 2001). Dado que el uso del término *peptidasa* en un sentido amplio y otro estrecho ha generado confusión, el Comité de Nomenclatura de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) ha recomendado el uso de este término en un sentido general para todas las hidrolasas del enlace peptídico.

La aceleración de las investigaciones en el campo de las peptidasas y la consiguiente velocidad de expansión del conocimiento en dicho campo no era imaginable años atrás. Ya en 1999 Barrett menciona que al momento pueden

reconocerse unas 600 peptidasas diferentes y que nuevas peptidasas se descubren día a día. Actualmente en MEROPS 6.90 (<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>) encontramos más de dos mil peptidasas con número de identificación y cerca de 25000 secuencias.

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

2.1. El sistema de clasificación de peptidasas EC

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) ha indexado las enzimas con números en un sistema que se conoce como EC (del inglés: Enzyme Commission) agrupándolas en seis clases: Oxidorreductasas (1), Transferasas (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5) y Ligasas (6).

Dentro de este sistema a las peptidasas le corresponde el número 3.4 dentro de la clase 3 de las enzimas hidrolíticas o hidrolasas. Las peptidasas en la lista EC se dividen en 13 subclases (Tabla 1).

| Subclase | Tipo de peptidasa |
|----------|--|
| 3.4.11 | Aminopeptidasas |
| 3.4.13 | Dipeptidasas |
| 3.4.14 | Dipeptidil-Peptidasas y Tripeptidil-Peptidasas |
| 3.4.15 | Peptidil-Dipeptidasas |
| 3.4.16 | Carboxipeptidasas tipo serínico |
| 3.4.17 | Metalocarboxipeptidasas |
| 3.4.18 | Carboxipeptidasas tipo cisteínico |
| 3.4.19 | Omega peptidasas |
| 3.4.21 | Endopeptidasas serínicas |
| 3.4.22 | Endopeptidasas cisteínicas |
| 3.4.23 | Endopeptidasas aspárticas |
| 3.4.24 | Endopeptidasas metálicas |
| 3.4.99 | Endopeptidasas de tipo no conocido |

Tabla 1. Sistema EC de clasificación de peptidasas.

Se reconocen dos grupos principales las *exopeptidasas* (3.4.11-19) que son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos y que actúan preferentemente o sólo si existe un grupo terminal libre y las *endopeptidasas* (3.4.21-25 y 3.4.99) que actúan sólo lejos del final de las cadenas polipeptídicas (URL: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34>). Dentro de las exopeptidasas las *oligopeptidasas* (3.4.19) son un grupo de enzimas cuya especificidad es dependiente del tamaño del sustrato.

2.2. El sistema de clasificación de peptidasas MEROPS

El sistema EC tiene la desventaja de no tener en cuenta la existencia de grupos estructurales que reflejen las relaciones evolutivas de las peptidasas miembro de cada clase; por esta causa en 1992 Rawlings & Barrett comenzaron el diseño de un sistema de clasificación de peptidasas que salva esa deficiencia y agrupa las peptidasas teniendo en cuenta esta fundamental característica. El sistema se va perfeccionando durante algunos años (Rawlings & Barrett, 1994 a,b y 1995 a,b) hasta que en 1996 fue publicada en la WWW (URL: <http://www.merops.co.uk>) como la base de datos de proteasas MEROPS. Este sistema de clasificación tiene en cuenta los conceptos de *tipo catalítico*, *clan*, *familia* y *peptidasa* (Tabla 2).

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

Tabla 2. Sistema MEROPS de clasificación de peptidasas.

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

En los clanes y familias se agrupan peptidasas homólogas. Un clan contiene una o más familias de peptidasas que muestran tener un origen común, es decir que están relacionadas evolutivamente. La evidencia más clara de homología en el

nivel de clan está dada por la similitud en la estructura terciaria. En las familias, las peptidasas están agrupadas en base a la homología de su secuencia aminoacídica, particularmente en la zona de la molécula responsable de la actividad enzimática (Barrett *et al.*, 2004a).

La mayoría de los clanes están formados por peptidasas de un solo tipo catalítico, por ejemplo el clan AA está formado por varias familias de peptidasas aspárticas. Sin embargo algunos clanes pueden contener dos o más tipos catalíticos, por ejemplo el clan PA contiene a la familia S1 que incluye la mayoría de las proteasas serínicas y la enzima tripsina 2, que contiene un residuo de His en lugar de Ser (Powers *et al.*, 2002).

3. Los tipos catalíticos de las endopeptidasas

Las endopeptidasas se clasifican en base al mecanismo catalítico en *endopeptidasas aspárticas* (A), *metaloendopeptidasas* (M), *endopeptidasas cisteínicas* (C), *endopeptidasas serínicas* (S) *endopeptidasas treonínicas* (T) esta clasificación coincide con el sistema EC y las subclases 3.4.23, 3.4.24, 3.4.22, 3.4.21 y 3.4.25 respectivamente, además existen un grupo de las endopeptidasas aún no clasificadas (U, EC 3.4.99).

En los dos primeros grupos - peptidasas aspárticas y peptidasas metálicas - el nucleófilo que ataca la unión peptídica es una molécula de agua unida al sitio catalítico, los grupos funcionales que hacen posible la catálisis no se unen directamente con el sustrato. Por el contrario en las peptidasas del tipo cisteínico, serínico y treonínico el grupo nucleofílico que inicia el ataque del enlace peptídico es un átomo de oxígeno o de azufre de la cadena lateral de un aminoácido de la estructura de la peptidasa (Barrett, 1999).

Es posible realizar una clasificación inicial de una peptidasa recientemente descubierta utilizando un grupo reducido de inhibidores de la actividad proteolítica como el siguiente: PMSF (inhibidor de serinpeptidasas), E64 (inhibidor de peptidasas cisteínicas), pepstatina A (inhibidor de aspartilpeptidasas), 1,10-fenantrolina (inhibidor de metalopeptidasas). Luego de esta primera aproximación existen numerosos protocolos para obtener datos mecanísticos tales como estudios de dependencia de la actividad con el pH, estudios cinéticos, determinación de la especificidad primaria de la proteasa usando la cadena β de la insulina y otros (Dunn, 2001).

3.1. Peptidasas cisteínicas

Las peptidasas cisteínicas están ampliamente distribuidas en la naturaleza proviniendo de distintas líneas evolutivas. Se las encuentra en animales, bacterias, plantas y virus donde cumplen una amplia gama de funciones. Entre los ejemplos mejor conocidos se encuentran la papaína, la catepsina B, y las caspasas humanas.

Estas peptidasas hidrolizan la unión peptídica mediante el ataque del enlace por un sulfidrilo de un residuo de cisteína (Cys25 del sistema de numeración de la papaína) que actúa como nucleófilo, para esto se requiere además un protón donador (base general) que es aportado por un residuo de histidina (His159 del sistema de numeración de la papaína). En algunas familias sólo esta tríada catalítica parece ser esencial, mientras que en otras existe evidencia de que se requiere un tercer residuo para orientar el anillo imidazólico de la histidina (Rawlins & Barrett, 2004 a). Este tercer miembro es un residuo de asparagina para el clan de la papaína (CA), mientras que otros clanes tienen un residuo de ácido glutámico. Continúan sin dilucidarse importantes rasgos del mecanismo catalítico de este tipo de peptidasas y todavía no se le ha asignado un papel preciso al tercer residuo de la tríada (Polgár, 2004 a). Se sabe sin embargo que el mecanismo implica dos pasos: A) formación (ácido-catalizada) de un tioéster de la acil-enzima intermediario (estado de transición tetraédrico) y lanzamiento concomitante de la amina clivada. Este intermediario tetraédrico se forma cuando el grupo tiol nucleofílico de la cisteína del sitio activo ataca el carbonilo del grupo amida del sustrato. B) hidrólisis (base-catalizada) del tioéster con el subsiguiente lanzamiento del ácido carboxílico y la regeneración de la enzima libre (Giles *et al.*, 2003).

3.2. Peptidasas serínicas

Las peptidasas serínicas han sido las enzimas proteolíticas más extensamente estudiadas, ejemplo de estas son la quimotripsina y la subtilisina. Se las puede encontrar en eucariotas, procariotas, arqueobacterias y virus. Los diversos procesos fisiológicos en los que actúan requieren enzimas con amplia especificidad de sustrato como las enzimas digestivas, enzimas que reconocen una secuencia específica como un conjunto de cinco aminoácidos particulares o enzimas que reconocen y actúan sobre una única proteína (Hedstrom, 2002 b).

En estas peptidasas el mecanismo catalítico depende del grupo hidroxílico de un residuo de serina (Ser195 del sistema de numeración de la quimotripsina) que

actúa como nucleófilo y ataca el enlace peptídico (Dunn, 2001). El sitio activo está compuesto en algunos clanes por una tríada catalítica Asp-His-Ser que, como en el caso de las peptidasas cisteínicas, incluye un donador de protones del residuo de histidina. Esta tríada se ha encontrado en al menos cuatro contextos diferentes indicando que esta maquinaria catalítica evolucionó como mínimo en cuatro oportunidades. Más recientemente se han descubierto otras serinpeptidasas que requiere de una díada catalítica Ser-Lys o Ser-His o las tríadas Ser-His-Glu, His-Ser-His (Hedstrom, 2002 b; Rawlings & Barrett, 2004 b).

3.3. Peptidasas treonínicas

Las endopeptidasas treonínicas comparten un plegamiento característico y un novedoso mecanismo catalítico con un residuo de treonina N-terminal que actúa como nucleófilo (Ntn hidrolasas). La más intrigante de estas Ntn peptidasas es constituyente del proteosoma (presente en células eucariotas, archaeobacterias y bacterias) que es un complejo cilíndrico con subunidades catalíticas y no catalíticas que reconoce proteínas mal plegadas y las digiere hasta péptidos pequeños cuando han sido marcadas con ubiquitina (Rivett & Mason, 1999, Polgár, 2004 b). Todas las proteasas treonínicas están incluidas en el clan mixto PA.

3.4. Metalopeptidasas

Muchas de las enzimas que contienen sitios metalo-activos catalíticos desempeñan papeles importantes en procesos celulares tales como reparación de tejidos, maduración de proteínas, regulación de los niveles hormonales, control del ciclo celular y degradación de proteínas (Holz *et al.*, 2003). Las metalopeptidasas pueden ser divididas en dos grandes grupos teniendo en cuenta si requieren uno o dos átomos de metal para producir la catálisis. En este último caso se habla de que los dos iones metálicos actúan co-catalíticamente (Barrett *et al.*, 2004b)

3.5. Peptidasas aspárticas

Las peptidasas aspárticas (PAs) han sido extensamente estudiadas y caracterizadas y están ampliamente distribuidas entre vertebrados, plantas, levaduras, nematodos, parásitos, hongos y virus (Dunn, 2002).

| Clan AA | Residuos catalíticos Asp, Asp (o His) | Plegamiento doble barril β (o dímeros de barriles β simples) |
|---------------------------------|--|---|
| Familias | A1 | Pepsina A (<i>Homo sapiens</i>) |
| | A2 | Retropepsina de HIV-1 |
| | A3A | Endopeptidasa del virus del mosaico del coliflor |
| | A3B | Proteasa putativa del virus baciliforme |
| | A9 | Spumapepsina (spumaretrovirus humano) |
| | A11 | Transposon copia (<i>Drosophila melanogaster</i>) |
| | A12 | Endopeptidasa del retrotrasposon bs1 (<i>Zea mays</i>) |
| | A16 | Peptidasa Tas de retrotrasposon (<i>Ascaris lumbricoides</i>) |
| | A17 | Peptidasa Pao de retrotrasposon (<i>Bombyx moris</i>) |
| | A18 | Proteinasa putativa del retrotrasposon Skippy (<i>Fusarium oxysporum</i>) |
| Clan AB | Residuos catalíticos Asp (o Glu), Asn | Plegamiento "sandwich" β |
| Familias | A6 | Endopeptidasa de Nodavirus |
| | A21 | Endopeptidasa de Tetravirus |
| Clan AC | Residuos catalíticos Asp, Asp | Plegamiento Desconocido |
| Familia | A8 | Peptidasa señal II (<i>Escherichia coli</i>) |
| Clan AD | Residuos catalíticos Asp, Asp | Plegamiento Desconocido |
| Familias | A22 | Presenilina 1 (<i>Homo sapiens</i>) |
| | A24A | Peptidasa tipo M1 prepilina tipo IV (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) |
| | A24B | Peptidasa preflagelinica (<i>Methanococcus maripauldis</i>) |
| Clan AF | Residuos catalíticos Asp, Asp, Asp, His | Plegamiento cilindro β |
| Familia | A26 | Omptina (<i>Escherichia coli</i>) |
| Otras familias (clan A-) | | |
| | A4 | Aspergillopepsina II |
| | A5 | Thermopepsina (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>) |

Tabla 3. Clanes y familias de las peptidasas aspárticas. Para cada clan los residuos descritos como "residuos catalíticos" deberían nombrarse como ligandos de la molécula de agua nucleofílica. Para cada familia la peptidasa citada es la peptidasa ejemplo típica usada para crear la familia en la base de datos MEROPS

De acuerdo con la base de datos MEROPS, las PAs se agrupan en 19 familias diferentes (Tabla 3), sobre la base de la homología de su secuencia aminoacídica, las cuales están dentro de seis clanes diferentes según sus relaciones evolutivas y su estructura terciaria (Rawlings & Barrett, 2004c).

3.5.1. Aspectos estructurales

Las peptidasas aspárticas pueden ser descritas como proteínas bilobadas con el sitio activo entre los dos dominios, la estructura terciaria de ambos dominios es bastante similar aunque la secuencia aminoacídica muestra limitadas similitudes. Las dos mitades de la enzima actúan como estructuras de plegado independiente moviéndose una respecto a la otra, cada mitad aporta un Asp de la díada catalítica (ver más adelante). La estructura de cada dominio puede ser descrita como una serie de elementos de estructura secundaria que se repiten (Dunn, 2002; Rawlings & Barrett, 2004c). Las peptidasas de virus RNA o de retrotrasposones son proteínas monoméricas no bilobadas y se cree que requieren dimerizarse para ser activas (Rawlings & Barrett, 2004c).

3.5.2. Mecanismo catalítico

En la gran mayoría de las peptidasas aspárticas son dos los residuos de ácido aspártico (Asp32 y Asp215 en la numeración de la pepsina) que actúan juntos para unir y activar la molécula de agua (díada catalítica), pero en algunas enzimas otro residuo reemplaza al segundo Asp (Rawlings & Barrett, 2004c). El mecanismo de la hidrólisis del enlace peptídico (Fig. 2) ha sido establecido mediante estudios estructurales de estas enzimas unidas a compuestos que mimetizan estados de transición al unirse al sitio activo. El nucleófilo que escinde la unión peptídica es una molécula de agua activada a ion hidróxido por el carboxilato, base general, del Asp215; el carboxilo protonado del Asp33 presta asistencia electrofílica a través de un puente de hidrógeno. Los grupos carboxílicos de los dos residuos aspartato se encuentran aproximadamente coplanares y la molécula de agua unida yace entre los dos en ese plano común. Como consecuencia del ataque nucleofílico se forma un intermediario tetraédrico. A continuación se protona el N del $-NH_2$ saliente conjuntamente con la regeneración del estado protonado del Asp33, esto está acoplado a la liberación de los nuevos grupos amino y carboxilo.

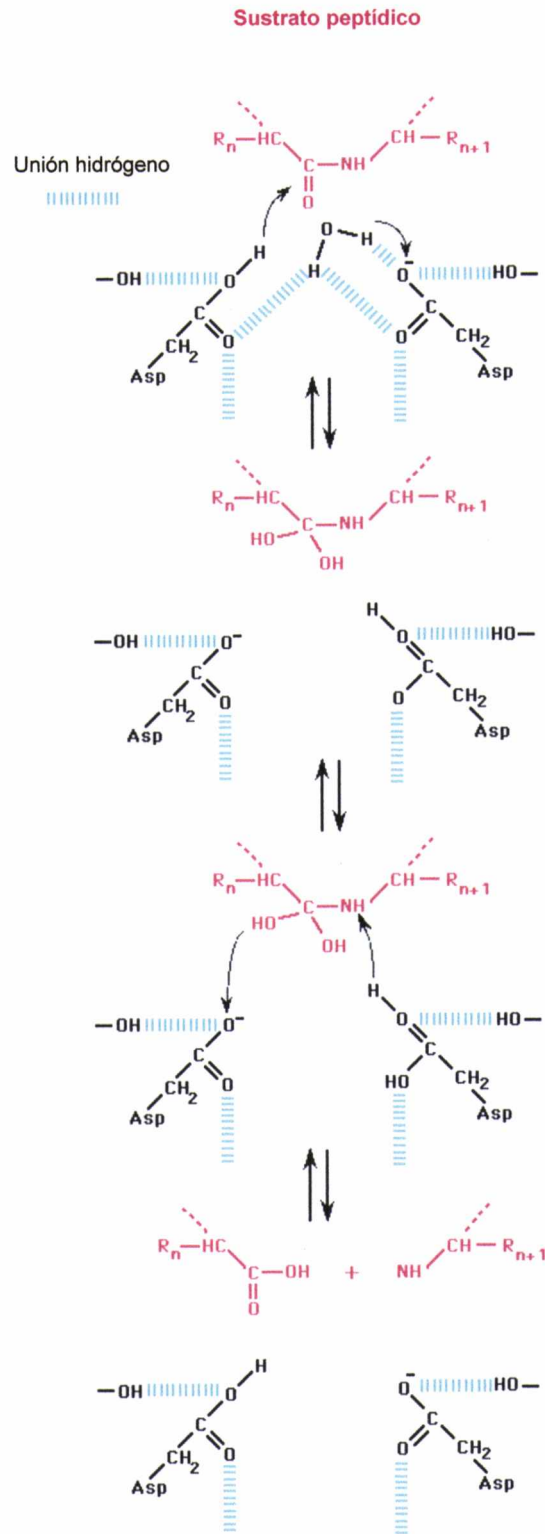


Figura 2. Mecanismo catalítico de petidasas aspárticas

Finalmente se reasocian los grupos carboxilos del sitio activo con una nueva molécula de agua (James, 2004).

En las peptidasas de la familia A1 del clan AA la hendidura de unión al sustrato abarca 7 u 8 aminoácidos (P5 a P3') con los Asp en posición central. Esta hendidura se forma donde se encuentran los dominios N y C terminales. Los dos residuos de Asp comunmente se encuentran en el motivo Asp-Thr-Gly-Thr/Ser esto es importante para establecer y mantener el ambiente del grupo carboxílico (James, 2004).

3.5.3. Peptidasas aspárticas de plantas

Las PAs de plantas están distribuidas entre las familias A1, A3, A11 y A12 del clan AA, y la familia A22 del clan AD. La mayoría de las PAs de plantas pertenecen a la familia A1, junto con las enzimas similares a pepsina de diversos orígenes (Rawlings & Barrett, 2004c). Han sido detectadas o purificadas de especies de monocotiledóneas (por ejemplo: cebada, maíz, arroz y trigo) y de diversas especies de dicotiledóneas (por ejemplo: *Arabidopsis thaliana*, *Brasica sp.*, cardos, cacao, naranja, espinaca, tabaco, tomate), también han sido encontradas en Gimnospermas y en algas verdes unicelulares (Mutlu & Gal, 1999; Simões & Faro, 2004). Estudios de localización *in situ* han revelado que las PAs no se distribuyen al azar dentro de la planta, sino que están muy específicamente localizadas en diferentes tejidos según la especie (Simões & Faro, 2004).

En común con otros miembros de la familia A1, las PAs de plantas son activas a pH ácido, son inhibidas específicamente por pepstatina y tienen dos residuos de ácido aspártico responsable de la actividad catalítica. Sin embargo existen varios rasgos estructurales y funcionales que hacen únicas a las PAs de plantas dentro de las peptidasas aspárticas (Simões & Faro, 2004).

3.5.3.1. Organización de la estructura primaria

La gran mayoría de las PAs de plantas identificadas se sintetizan como preproenzimas de cadena simple (Fig. 3) y son subsecuentemente convertidas a enzimas maduras que pueden ser tanto monoméricas como heterodiméricas (Mutlu & Gal, 1999). Los precursores se caracterizan por la presencia de una secuencia señal o péptido señal N-terminal hidrofóbico, responsable de la traslocación al retículo endoplasmático rugoso, seguido por un prosegmento de alrededor de 40 aminoácidos, un dominio N-terminal y un dominio C-terminal

separados por un inserto de aproximadamente 100 aminoácidos, llamada inserto específico de planta, PSI (Dunn, 2002; Simões & Faro, 2004).

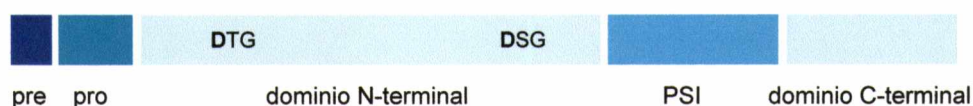


Figura 3. Representación esquemática del cDNA de la peptidasa aspártica de semillas de cebada. Los rectángulos coloreados representan la región “pre” (péptido señal), la región “pro” (propéptido), el PSI (inserto específico de plantas); en celeste se observan los dos dominios de la enzima activa. Las posiciones de los Asp del sitio catalítico están señaladas como DTG y DSG (Mutlu & Gal, 1999)

El prosegmento está presente en todas las PAs y está involucrado tanto en evitar su actividad como en su plegado, además de actuar en la estabilización de la enzima madura y en la localización intracelular de varios zimógenos.

El PSI es un inserto sólo identificado en PAs de plantas, semejante a las saposinas y que normalmente se elimina durante la maduración de las PAs (Dunn, 2002; Simões & Faro, 2004). Egas *et al.* y colaboradores (2000) encontraron que el PSI recombinante es capaz de interactuar con las vesículas fosfolipídicas y de inducir la fusión de su contenido. Aún así, el rol del PSI no ha sido completamente esclarecido, Simões & Faro (2004) proponen que tomaría parte en los mecanismos de defensa contra patógenos y/o participaría en la muerte celular en base a su capacidad de interactuar con membranas lipídicas. Sin embargo White *et al.* (1999) encontraron que en la procyprosina recombinante el PSI tiene como función asegurar que el polipéptido naciente esté correctamente plegado y sea capaz de activarse hasta ser una enzima madura.

En general las APs vegetales comparten la característica de que los dominios N- y C- terminales tienen una elevada identidad (sobre el 60%). En todas las PAs de plantas que pertenecen a la familia A1 los dos motivos de secuencia catalítica son Asp-Thr-Gly (DTG) y Asp-Ser-Gly (DSG), con la excepción del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* donde los motivos son DTG/DTG (Simões & Faro, 2004).

3.5.3.1. Estructura terciaria de las peptidasas aspárticas de plantas

El conocimiento de las estructuras cristalinas de las peptidasas aspárticas es muy reducido. Sólo se han determinado dos de ellas (Fig. 4), Cardosina A madura de *Cynara cardunculus* (Frazão *et al.*, 1999) y el precursor de la fitepsina de cebada, profitepsina, conteniendo el prosegmento y el PSI (Kervinen *et al.*, 1999). Ambas PAs maduras están constituidas por dos cadenas polipeptídicas y presentan plegamientos similares o los que se encontraron para otras PAs. La estructura secundaria consiste esencialmente en filamentos β con muy un reducido porcentaje de α -hélice. El sitio activo está ubicado en una profunda hendidura entre los dos lóbulos de la molécula cada uno de los cuales contribuyen con una secuencia motivo catalítica (DTG/DSG). Tres puentes disulfuro estabilizan la estructura y ambas cadenas polipeptídicas se mantienen unidas por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (Simões & Faro, 2004).

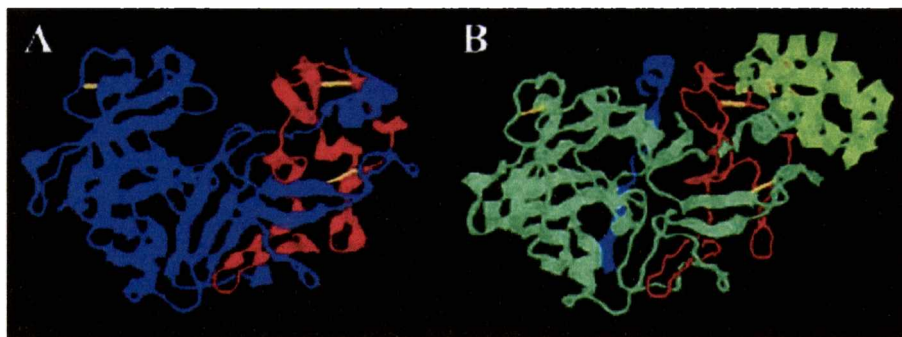


Figura 4. Representación de cintas de estructuras cristalinas de peptidasas aspárticas de plantas. **A.** Estructura de cardosina A madura (*C. cardunculus* L.), en azul se muestra la cadena pesada, la cadena liviana en rojo y los puentes disulfuro en amarillo. **B.** Estructura de profitepsina (*H. vulgare* L.), el propéptido se muestra en azul, la proteína madura en verde opaco (cadena pesada) y rojo (cadena liviana), el PSI en verde brillante y los los puentes disulfuro en amarillo.

Como en otras estructuras de PAs hay una región flexible conocida como “flap” (del inglés tapa, solapa) que se proyecta hacia afuera sobre la hendidura del sitio activo y encierra a los sustratos y a los inhibidores en el sitio activo (Rawlings & Barrett, 1995). El PSI constituye una subunidad independiente en la estructura de la profitepsina (Kervinen *et al.*, 1999), esta estructura tridimensional del PSI, como hemos mencionado, se parece a la de las proteínas semejantes a saposina, un grupo de proteínas que unen lípidos involucradas en diversos procesos fisiológicos (Egas *et al.*, 2000).

3.5.3.2. Funciones biológicas

Las funciones biológicas de las PAs aún no han sido bien establecidas, más bien son hipotéticas. Actualmente la mayor parte del conocimiento de las posibles funciones se basa en estudios de colocalización con sustratos proteicos putativos, en evidencias experimentales de procesamiento o degradación de esos sustratos *in vitro* y/o en la expresión específica en ciertos tejidos o en determinadas condiciones (Simões & Faro, 2004). En general las PAs de plantas han sido implicadas en el procesamiento y maduración de proteínas de reserva o en la degradación durante la movilización de estas proteínas; en plantas carnívoras han sido asociadas con la degradación de las proteínas de los insectos atrapados; en otras especies aparentemente participarían en senescencia, respuesta al stress, muerte celular programada y en la interacción polen-pistilo (Frazão *et al.*, 1999; Mutlu & Gal, 1999; Ramalho-Santos *et al.*, 1997; Simões & Faro, 2004).

3.5.3.3. Peptidasas aspárticas en la familia Asteraceae

Los extractos acuosos de flores secas del género *Cynara* de la familia *Asteraceae* Tribu XI. *Cardueae* Cass. (*Cynareae* Less.) han sido tradicionalmente utilizadas en Portugal en la manufactura artesanal de quesos blandos de oveja, como el Serra da Strela y el Serpa, altamente apreciados por su calidad (Barbosa *et al.*, 1981; Cordeiro *et al.*, 1992). Peptidasas aspárticas contenidas en estas flores son las responsables de iniciar la coagulación de la leche mediante el clivaje del enlace Phe105-Met106 de la κ -caseína (Faro *et al.*, 1995).

3.5.3.3.1. Género *Cynara* L.

Se han aislado PAs a partir de flores de varias especies del género *Cynara*, las más extensamente estudiadas han sido las de *Cynara cardunculus* L. (Heimgartner *et al.*, 1990; Veríssimo *et al.*, 1995). También se han encontrado PAs similares en las flores de *C. humilis* L. (Esteves, 1995), *C. algarbiensis* L. (Pires, 1998) y de *C. scolymus* L. (Pires, 1998; Llorente *et al.*, 2004)

3.5.3.3.1.1. *Cynara cardunculus* L.

La investigación de las flores de *Cynara cardunculus* L. (cardo de Castilla) ha mostrado que el tipo y la actividad de las fracciones en los extractos difiere

dependiendo de los métodos de extracción y de el tipo de material de partida (flores frescas o secas). Además extractos obtenidos de flores de plantas de diversas ubicaciones producen distinta actividad proteolítica y coagulante de leche (Cordeiro *et al.*, 1992). Por cultivo de suspensiones celulares establecidas a partir de hipocótilos de *C. cardunculus* también se han obtenido peptidasas, pero no se trató de peptidasas aspárticas sino de peptidasas del tipo cisteínico (Cordeiro *et al.*, 1991).

3.5.3.3.1.1.1. Cyprosinas

Heimgartner *et al.* (1990) aislaron a partir de extractivos de flores secas de *C. cardunculus* subsp. *flavescens* Wikl. realizados a pH 8,3 tres peptidasas con actividad coagulante de leche que llamaron cynarasas 1, 2 y 3. El nombre cynarasa fue reemplazado más tarde por el de cyprosina, más adecuado según las convenciones de nomenclatura de las peptidasas aspárticas (Cordeiro *et al.*, 1998a). Las tres enzimas diméricas resultaron estar compuestas por una subunidad pequeña y otra mayor: 32,5 + 16,5 kDa, 33,5 + 16,5 kDa y 35,5 + 13,5 kDa, respectivamente (Heimgartner *et al.*, 1990); las tres están glicosiladas con cadenas que contienen manosa (Cordeiro *et al.*, 1998a). Las peptidasas purificadas muestran microheterogeneidad (especies proteicas de diferente pI, todos cercanos a 4,0) al ser analizadas por electroforesis bidimensional: (Cordeiro *et al.*, 1994a). En lo que concierne a la especificidad, cyprosina 3 es la que más se asemeja a quimosina, la enzima animal más utilizada para coagular leche en la fabricación de quesos. Si bien presenta mayor actividad proteolítica sobre leche bovina, por lo que tiende a formar cuajadas más suaves, cuando cyprosina 3 actúa sobre leche de oveja muestra mayor actividad coagulante y especificidad de corte que quimosina (Cordeiro *et al.*, 1992). Como otras PAs las cyprosinas preferentemente clivan enlaces peptídicos entre residuos hidrofóbicos (Cordeiro *et al.*, 1998b), muestran mayor actividad a pH ácido (máximo a pH 5,1 con péptidos de caseína marcada con FITC) y son inhibidas por pepstatina A (Heimgartner *et al.*, 1990).

Las cyprosinas están específicamente localizadas en las células epidérmicas de los estilos de las flores (Cordeiro *et al.*, 1994 a).

Los genes que codifican para las cyprosinas se organizan como una familia de multigenes que se expresan en las etapas tempranas del desarrollo floral. Como hemos visto, se expresan como zimógenos con una secuencia señal, un

prosegmento, los dominios N- y C-terminales y el PSI (Cordeiro *et al.*, 1994b). Estas peptidasas han sido expresadas en *Pichia pastoris* y la enzima recombinante madura resultó ser una mezcla microheterogénea (White *et al.*, 1999) que se puede utilizar en la preparación de quesos de oveja (Fernandez-Salguero *et al.*, 2003).

3.5.3.3.1.1.2. Cardosinas

A partir de flores frescas de *C. cardunculus* han sido purificadas y caracterizadas dos peptidasas aspárticas: cardosina A y cardosina B (Faro *et al.*, 1995). Del total de la actividad enzimática extraída a pH ácido entre el 75 y el 90% corresponde a cardosina A, que en términos de especificidad y parámetros cinéticos es semejante a quimosina, mientras que cardosin B (10-25%) es semejante a pepsina (Veríssimo *et al.*, 1995). Ambas enzimas son activas a pH ácido y son inhibidas por pepstatina A. Tanto cardosina A como cardosina B son proteínas dimericas con una subunidad mayor de 31,0 y 34,0 kDa respectivamente y una subunidad menor de 15,0 y 14,0 kDa respectivamente (Veríssimo *et al.*, 1996). Cardosina A tienen ambas cadenas glicosiladas mientras que cardosina B sólo tiene glicosilada la cadena pesada (Pires, 1998). La secuencia aminoacídica de las dos cardosinas es similar pero no idéntica y difiere de la secuencia de las cyprosinas (Veríssimo *et al.*, 1996). Al comparar las secuencias derivadas del cADN de ambas cardosinas se obtiene un 73% de identidad (Vieira *et al.*, 2001). La estructura cristalográfica de cardosina A determinada por difracción de rayos X revela que posee el típico plegamiento de las PAs (Frazão *et al.*, 1999). Ambas enzimas se sintetizan como un precursor que por procesamiento proteolítico pierde el prosegmento N-terminal y la secuencia interna PSI; la procardosina A (64,0 kDa) ha sido aislada y caracterizada (Ramalho Santos *et al.*, 1998).

El ARNm de las cardosinas se detecta en inflorescencias jóvenes pero no en los pistilos de inflorescencias completamente abiertas (Faro *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2001). La expresión de cardosina A ocurre esencialmente en los pistilos, en las vacuolas de almacenamiento de proteínas de las papilas estigmáticas así como también en la gran vacuola central de las células del estilo desde el inicio del desarrollo floral (Ramalho Santos *et al.*, 1997). Cardosina B se acumula en los pistilos hasta las últimas etapas del desarrollo floral localizándose en las paredes

de las células y en la matriz extracelular del tejido de transmisión floral (Vieira *et al.*, 2001).

3.5.3.3.1.2. *Cynara humilis* L.

En España flores de *C. humilis* L. son usadas en la manufactura de quesos tales como Serena, Torta del Casar, Pedroches y Grazalema (Cordeiro *et al.*, 1994a). A partir de flores frescas de esta especie por extracción ácida Esteves (1995) aisló una peptidasa aspártica semejante a cardosina A. Diversos autores han comparado con la quimosina y con las peptidasas de *C. cardunculus* la utilidad de las peptidasas de *C. humilis* como “cuajo” sobre leche de oveja y/o cabra (Vioque *et al.*, 2000; Silva y Malcata, 2000; Esteves *et al.*, 2003).

3.5.3.3.1.3. *Cynara scolymus* L.

En el alcaucil se ha encontrado una peptidasa semejante a cardosina B (Esteves, 1995). Sin embargo tanto Llorente *et al.* (2004) como Sidrach *et al.* (2004) estudiando esta variedad han encontrado tres enzimas glicosiladas, todas peptidasas aspárticas; estos últimos investigadores las denominaron cynarasas A, B y C.

3.5.3.3.2. Género *Centaurea* L.

A partir de flores secas de *Centaurea calcitrapa* L se aisló una peptidasa heterodimérica glicosilada (30,0 + 16,0 kDa) que se inhibe con pepstatina A y que expresa mayor actividad enzimática entre pH 4,0 y 5,0 (Domingos *et al.*, 1998). Una peptidasa aspártica denominada cenprosina se expresa en flores frescas de la misma especie, aunque también se expresa en menor medida en semillas y hojas. La secuencia primaria del zimógeno, deducida a partir del cADN, presenta una secuencia señal, un prosegmento y la secuencia de la enzima madura, además del PSI típico de las PAs de plantas. El mencionado zimógeno (procenprosina) posee 50 kDa y se autoprocresa por proteólisis a pH 3,0 dando la peptidasa bicatenaria madura (Domingos *et al.*, 2000).

Lourenço *et al.* (2002) lograron la expresión de PAs en cultivo de pelos de raíz de *C. calcitrapa* establecidos por infección con *Agrobacterium rhizogenes*.

3.5.3.3.3. Género *Onopordum* L.

Tamer (1993) extrajo a pH 5,0 una fracción activa de alrededor de 20 kDa a partir de semillas y flores de *Onopordum turcicum* L., la que fue purificada siguiendo una estrategia que incluyó: precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión molecular e intercambio aniónico. La actividad enzimática de esta enzima es máxima a pH 5,0; pequeñas cantidades de CaCl₂ aumentan su actividad coagulante de leche, mientras que altas concentraciones de CaCl₂ así como de NaCl la inhiben (Tamer, 1993). A partir de callos y suspensiones celulares establecidos a partir de semillas germinadas Tamer y Mavituna (1996) obtuvieron la expresión de proteasas pero no analizaron si se trataba de peptidasas aspárticas o de otro tipo catalítico.

También ha sido reportada actividad coagulante de leche debida a peptidasas aspárticas en extractos obtenidos a pH 3,0 de flores frescas de *O. acanthium* L. (Vairo Cavalli *et al.*, 2002).

3.5.3.3.4. Género *Silybum* Adans. nom. cons

Se ha logrado coagular leche con protoplastos y células inmovilizadas (Cabral *et al.*, 1984) o células libres (Feverheiro *et al.*, 1986) obtenidas a partir de cultivo de callos y suspensiones celulares utilizando como explanto el segundo par de hojas de *S. marianum* (L.) Gaernt.. Ambos trabajos son preliminares desde el punto de vista enzimológico pues no ha sido caracterizado el mecanismo catalítico de las peptidasas responsables de la coagulación.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:

- a) Obtener preparaciones enzimáticas crudas de flores de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Asteraceae*) como nueva fuente de peptidasas aspárticas, caracterizarlas parcialmente.
- b) Purificar parcialmente los extractos crudos. Caracterizar las preparaciones parcialmente purificadas en cuanto al efecto del pH y el agregado de inhibidores sobre la actividad proteolítica. Determinar las mejores condiciones para su conservación y concentración.
- c) Purificar cromatográficamente la enzima de interés a partir de los extractivos de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Asteraceae*).
- d) Determinar la especificidad de la proteasa usando la cadena β de la insulina y el efecto del pH y de los inhibidores sobre la actividad con este sustrato. Analizar el efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad endoesterolítica empleando un sustrato sintético. Determinar los parámetros cinéticos de la enzima purificada con el sustrato sintético.

Materiales y Métodos

1. Material Vegetal

Silybum marianum (L.) Gaertn. (Fig. 1) conocida como cardo mariano, cardo asnal o cardo blanco es una planta que pertenece a la familia *Asteraceae* y, dentro de la misma, a la Tribu *Carduae*. Es una hierba anual de 1,0 a 2,2 m de altura, con tallos robustos y hojas glabras o casi glabras de color verde marmoreado con blanco y espinas aceradas en los márgenes; las hojas basales son subarrosetadas, grandes, lobuladas o pinatífidas, con lóbulos espinoso-dentados; las hojas caulinares son alternas, sésiles, oblongas, más o menos lobadas y con ápice y márgenes espinosos. Las flores son violáceas y se disponen en capítulos terminales, poco numerosos, largamente pedunculados, de 4 a 6 cm de diámetro; el involucre es globoso, de unos 3 a 4 cm de altura, con brácteas terminadas en una larga punta espinosa y extendida o dirigida hacia abajo. Los aquenios son ovado-oblongos, algo comprimidos, estriados, más o menos rugosos, con disco epígino notable, de unos 5 a 7 mm de largo; el papus posee 13 a 14 mm de largo, es blanco, caedizo y de pelos simples (Marzocca, 1957).

La especie es originaria del sur y sudoeste de Europa, oeste de Asia, norte de África, Islas Canarias y Azores; naturalizada en Argentina (Jujuy, Salta, Chaco, Corrientes, Santiago del Estero, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa, Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Río Negro y Tierra del Fuego). Es frecuente encontrarla en cultivos y ambientes modificados.



Figura 1. *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Se recolectaron inflorescencias en los partidos de Tandil y La Plata (Pcia. de Buenos Aires) durante los meses de octubre y noviembre de los años 2000 a 2003. El material recolectado fue caracterizado taxonómicamente por la Dra. Nancy Apóstolo y la Ing. Agr. Cristina Brutti, de la Universidad Nacional de Luján.

Se seleccionaron las inflorescencias maduras y se cortaron con tijera las partes de las flores de color violeta. Dicho material se pesó y rápidamente se utilizó en la preparación de los extractos crudos, como se detalla a continuación.

2. Obtención del extracto crudo

A fin de seleccionar el mejor método de extracción de proteínas se trató el material vegetal mediante dos métodos diferentes: a) trituración de las flores en homogenizador con buffer de extracción y b) congelación de las flores con N₂ líquido en mortero seguido de trituración hasta obtener un polvo fino al cual se le agregó inmediatamente el buffer de extracción.

En ambos casos la suspensión obtenida se agitó en baño de hielo durante 30 minutos para favorecer la extracción de las proteínas. La relación volumen de buffer/peso de flores fue igual a tres. Las suspensiones así obtenidas se clarificaron por centrifugación durante 20 minutos a 5000 g y 4 °C para eliminar los restos vegetales; a las soluciones resultantes se las denominó extractos crudos.

Como buffer de extracción se probaron dos sistemas previamente empleados por distintos autores para extraer proteasas aspárticas de flores: a) cítrico-citrato 0,1 M de pH 3,0 (Faro *et al.*, 1992) y b) fosfatos 0,1 M de pH 7,0 (Llorente *et al.*, 1999). Ambos sistemas contuvieron EDTA 1,0 mM como protector.

3. Determinación del contenido en proteínas

3.1. Método de Bradford

La determinación de proteínas por este método (Bradford, 1976) permite la valoración de proteínas en extractos vegetales que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica e interfieren con el clásico método de Lowry (Peterson, 1979). El mecanismo implica la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas, esta unión produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína), por lo que las lecturas se realizan a esta última longitud de onda.

La composición del reactivo se indica en la siguiente tabla:

| Reactivo de Bradford | |
|----------------------------|---------|
| Coomasie Brilliant Blue -G | 100 mg |
| Etanol | 50 ml |
| Acido fosfórico 85% p/v | 100 ml |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 ml |

Tanto los ensayos como los respectivos blancos de reactivos se realizaron por triplicado. La concentración de proteínas de la muestra se determinó empleando una curva de calibración realizada empleando albúmina bovina (Sigma Chemical Co.) como patrón.

3.1.1. Macrométodo

Se mezclaron 50 μ l de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm.

El rango de detección de proteínas de este método es de 100-900 μ g de proteína/ml.

3.1.2. Micrométodo

Se mezclaron 250 μ l de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm.

El rango de detección de proteína de este método es de 10-100 μ g de proteína/ml.

3.2. Método del ácido bicinconínico

En algunos casos se utilizó el ensayo colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA) para la cuantificación de proteínas; este método combina la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} , causada por las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret), con la altamente selectiva y sensible reacción colorimétrica de detección del catión cuproso por el ácido bicinconínico (Smith *et al.*, 1985). El complejo coloreado exhibe una alta absorbancia a 562 nm, que es lineal con la concentración de proteínas dentro del rango de aplicación del método.

Se mezclaron entre 50 y 100 μ l de muestra con 2,0 ml de reactivo (BCA Protein Assay Reagent, Pierce) completando con agua destilada hasta un volumen final de

2,1 ml por tubo de reacción, se agitó en vórtex, se incubó durante 30 minutos a 37°C y se leyó la absorbancia a 562 nm. Los ensayos y los respectivos blancos de reactivo se realizaron por triplicado. La cantidad de proteínas se determinó empleando una curva de calibración en la que se utilizó albúmina bovina como patrón. El rango de detección de proteínas por este método es de 20 a 2000 µg/ml.

4. Determinación de la actividad proteolítica con distintos sustratos

4.1. Actividad coagulante de leche

Se preparó una solución con leche descremada al 10% (Sam Regim) en solución de CaCl₂ 10 mM. Se ensayaron distintas proporciones de extracto enzimático y de leche hasta encontrar la proporción óptima que resultó de 100 µl de muestra por cada ml de leche. La mezcla de reacción se incubó a 30 °C hasta observar la formación de un coágulo macroscópico. Se emplearon extractivos de *Cynara scolymus* (Llorente *et al.*, 2004) para realizar los controles positivos de coagulación y buffer de extracción para los controles negativos.

4.2. Actividad sobre azocaseína

El sustrato consistió en una solución al 2% (p/v) de azocaseína en buffers de Good de pH 6,0 y 8,0, tanto en presencia como en ausencia de cisteína (20 mM). La reacción se inició por el agregado de 0,25 ml de azocaseína a 0,15 ml de la preparación enzimática, incubándose la mezcla a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA al 10%, que precipita las proteínas. Luego de centrifugar los tubos de reacción durante 15 minutos a 4.000 g se tomaron 0,9 ml del sobrenadante, se le añadió 1,0 ml de NaOH 1,0 M y se midió la absorbancia a 440 nm. Los ensayos en blanco se realizaron agregando en primer término el ácido tricloroacético.

Siguiendo el criterio de Sarath *et al.* (1989) para expresar la actividad enzimática cuando se utilizan sustratos proteicos, se definió una unidad arbitraria (Unidad de azocaseína, U_{azocas}) que corresponde a la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 440 nm por minuto, en las condiciones del ensayo.

4.3. Actividad sobre hemoglobina

Se utilizó la técnica de Anson (1938) ligeramente modificada (Vairo Cavalli *et al.*, 2005). Para obtener el sustrato (hemoglobina desnaturalizada por acción de HCl) se agitó durante 30 minutos una solución conteniendo 0,5 g de hemoglobina bovina (Sigma) en 20 ml de agua destilada con 2,5 ml de HCl aproximadamente 0,6 N. El pH deseado se obtuvo mediante la adición de la cantidad necesaria de NaOH al 2%. La solución se llevó a volumen con agua destilada para obtener una concentración final de 2% en hemoglobina (Hb); esta preparación puede ser almacenada a 4 °C luego de ser estabilizada con timerosal al 2% (p/v).

La mezcla de reacción conteniendo 0,1 ml de la preparación enzimática y 0,5 ml de la solución de hemoglobina desnaturalizada fue incubada durante 2, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos a 30 °C y la reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético al 5%. La mezcla se mantuvo en reposo durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó durante 20 minutos a 5.000 g. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 280 nm. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco agregando en primer término el ácido tricloroacético.

Al igual que con azocaseína para el uso de Hb como sustrato, se definió una unidad arbitraria (Unidad hemoglobinolítica, U_{Hb}), que corresponde a la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm por minuto, en las condiciones del ensayo.

4.4. Actividad sobre caseína

El sustrato se preparó suspendiendo 1 g de caseína tipo Hammarsten (Research Organics) en 100 ml de solución buffer. Luego de homogeneizar la suspensión se la colocó en un baño de agua fría que fue llevado a ebullición y mantenido en esas condiciones durante 20 minutos. La solución resultante se filtró en caliente por papel y se utilizó el mismo día en que fue preparada.

La mezcla de reacción consistió en 1,1 ml de solución de caseína al 1% y 0,1 ml de la preparación enzimática, ambas disueltas en buffer cítrico-fosfato 0,1 M de pH 6,6. La reacción fue llevada a cabo a 30 °C y detenida por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético al 5% luego de lo cual los tubos fueron centrifugados durante 20 minutos a 5.000 g, determinándose posteriormente la absorbancia de

los sobrenadantes a 280 nm. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco agregando en primer término el ácido tricloroacético.

5. Efecto del tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas

Extractos crudos de flores trituradas en mortero en presencia de N₂ líquido extraídas a pH 3,0, según se indicó en el ítem 2, fueron fraccionados en alícuotas de 0,5 ml que se guardaron a -20 °C para determinar su estabilidad durante la conservación. Durante los 2 primeros meses se descongelaron 2 muestras cada 7 días y luego de este período se descongelaron 2 muestras cada 30 días durante un año; en cada caso se determinó la actividad coagulante de leche residual como se indicara en 4.1.

6. Selección del método para la eliminación de pigmentos

Con el fin de eliminar pigmentos y otros compuestos de naturaleza fenólica presentes en abundancia en el extracto crudo se ensayaron dos métodos: a) tratamiento con carbón activado y b) cromatografía de exclusión molecular.

La elección del método se basó en la mejor recuperación de actividad coagulante de leche luego de la eliminación de los pigmentos.

6.1. Tratamiento con carbón activado

Se empleó el método utilizado por Llorente *et al.* (2004). El carbón se activó en estufa a 180°C durante 2 h y la cantidad empleada fue el 10% p/v del extracto crudo a clarificar.

El carbón activado se puso en contacto con el extractivo en cinco ciclos de 30 segundos de agitación en vórtex y 30 segundos de reposo en baño de hielo, hasta completar 5 minutos totales de tratamiento luego de los cuales se dejó sedimentar el carbón durante 30 minutos a 4 °C. Las muestras se centrifugaron durante 60 minutos a 16000 g y 4 °C.

6.2. Tratamiento en columna de Sephadex G-25

6.2.1. Preparación del gel y armado de la columna

Se pesaron 10,5 g de Sephadex G-25 F (Pharmacia) y se le agregaron 100 ml de H₂O. El gel se dejó hinchar 1 hora a baño de María, descartando el sobrenadante acuoso y agregando luego un volumen de buffer cítrico-citrato 50 mM de pH 3,0 para resuspender el gel. Para el empaquetado de la columna (K15/30 Pharmacia) se dispuso la misma verticalmente dentro de una cámara fría y se vertió cuidadosamente la suspensión del gel previamente desgasificado. Se abrió la salida de la columna para permitir la decantación del gel y se conectó un reservorio con buffer cítrico-citrato 50 mM de pH 3,0 desgasificado, haciendo pasar el volumen necesario para equilibrar el gel al pH seleccionado.

El correcto empaquetamiento de la columna se verificó sembrando y corriendo 1 ml de una solución de Blue Dextran disuelto en el mismo buffer. El colorante permitió además determinar el volumen muerto de la columna por ser una molécula de peso molecular muy elevado que queda excluida de las partículas del gel.

6.2.2. Siembra y desarrollo del cromatograma

Se sembraron 10 ml de muestra (menos del 30% del volumen de columna) con bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 0,45 ml/min. Se conectó la salida de columna a un colector automático de fracciones (Gilson) y se recolectaron fracciones de 1,8 ml de muestra por tubo.

Luego de sembrada toda la muestra se eluyó con el mismo buffer (cítrico-citrato 50 mM de pH 3,0), empleando la bomba peristáltica a la misma velocidad de flujo.

A cada una de las fracciones colectadas se le determinó la absorbancia (260, 280, 330 y 535 nm), la actividad coagulante (ítem 4.1) y la actividad proteolítica con Hb a pH 4,0 (ítem 4.3). Las fracciones con actividad coagulante fueron reunidas y conservadas para su posterior uso y constituyeron el “extractivo enzimático parcialmente purificado”.

La regeneración de la columna se realizó pasando por la misma un volumen de NaCl 2 M y lavando luego con agua destilada (A.D.) hasta que el eluato no

presentara absorbancia a 280 nm. La columna se guardó en cámara fría con timerosal 0,02% en NaCl 0,5 M.

6.2.3. Análisis de los extractivos parcialmente purificados

Con el fin de evaluar el resultado del proceso de eliminación de los compuestos de naturaleza fenólica por cromatografía de exclusión molecular se determinaron los espectros ultravioleta y visible del extracto crudo y de la preparación enzimática despigmentada empleando un espectrofotómetro Agilent 8453 E (Agilent Technologies).

Por otra parte, la actividad enzimática residual de extractivo parcialmente purificado se determinó midiendo el tiempo de coagulación de leche (ítem 4.1) mientras que el contenido de proteínas luego del tratamiento se midió empleando el método de Bradford (ítem 3.1).

6.2.3.1. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica empleando hemoglobina como sustrato

El perfil de pH característico del extracto parcialmente purificado se determinó utilizando hemoglobina al 2% como sustrato empleando la técnica descrita en el ítem 4.3. El rango de pH ensayado fue 1,9 - 5,8 con intervalos de 0,5 unidades de pH. La amplitud del rango de trabajo estuvo definido por la solubilidad de la hemoglobina. En todos los casos se realizaron blancos de reacción.

7. Liofilización de las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas

Para seleccionar el buffer a emplear en el proceso de liofilización se ensayaron dos sistemas diferentes: a) ácido cítrico-citrato de sodio (50 mM) de pH 3,0 y b) ácido acético-acetato de amonio (50 mM) de pH 4,0. En el primer caso la muestra consistió en el extractivo enzimático parcialmente purificado tal como se indicó en el ítem 6.2 sin ninguna modificación y en el segundo caso la misma fue obtenida reemplazando en la cromatografía de exclusión molecular el buffer original por el buffer acetato.

En ambos casos las preparaciones se dividieron en alícuotas de 500 µl, se colocaron en tubos tipo eppendorf con las tapas perforadas y se congelaron a -80 °C. La liofilización se llevó a cabo en un equipo FD4 Heto (Lab Equipment).

Para reconstituir los extractivos se emplearon 500 µl de buffer cítrico-citrato (50 mM) de pH 3,0 cuando se trató de la muestra preparada en buffer acetato (ya que se trata de un sistema volátil que se elimina durante la liofilización), en tanto que la muestra que se encontraba disuelta en buffer cítrico-citrato se disolvió en igual volumen de agua destilada. Sobre los extractivos reconstituidos se determinó la actividad coagulante de leche (ítem 4.1) y la actividad enzimática residual empleando hemoglobina como sustrato (ítem 4.3).

8. Métodos de concentración de las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas

Para establecer la mejor técnica de concentración de la muestra se evaluaron tres métodos: a) precipitación con acetona y redisolución en buffer, b) eliminación de agua por hidratación de Sephadex G-25 seco y c) liofilización. En todos los casos la muestra de partida fue extracto enzimático parcialmente purificado de pH 3,0. La evaluación de los métodos se realizó por medida de actividad coagulante de leche (ítem 4.1), actividad hemoglobinolítica (ítem 4.3) y determinación de proteínas por el método de Bradford (ítem 3.1).

8.1. Precipitación con acetona y redisolución en buffer

Se precipitaron 4,0 ml de muestra mediante el agregado de 5 volúmenes de acetona fría (-20 °C). Se trabajó dentro de una cámara fría (4 °C) y la adición de acetona se realizó gota a gota y con agitación suave y permanente para evitar la elevación de la temperatura al diluirse la acetona lo que podría inactivar la enzima. Una vez concluido el agregado de acetona la suspensión se dejó decantar durante 30 minutos a -20 °C, luego se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 g y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se eliminó la acetona remanente en desecador al vacío durante 10 minutos. El precipitado así obtenido se redisolvió en 1 ml de buffer cítrico-citrato (50 mM) de pH 3,0.

8.2. Eliminación de agua por hidratación de Sephadex G-25

A 0,75 g de Sephadex G-25 F (Pharmacia) se le agregaron 4,0 ml de muestra, se mezcló y se mantuvo en baño de hielo durante 45 min. Luego se centrifugó durante 5 min a 5.000 g y 4 °C, recuperándose el sobrenadante.

8.3. Liofilización

Las muestras disueltas en buffer cítrico-citrato obtenidas por liofilización según se indicó en 7 se reconstituyeron con 125 µl de A.D.

9. Electroforesis desnaturalizante - discontinua (SDS-PAGE)

9.1 Electroforesis desnaturalizante – discontinua en condiciones reductoras (método con Tricina)

Para la realización de estas electroforesis se empleó el método de Laemmli (1970) con algunas modificaciones.

9.1.1. Preparación de las muestras

Alicuotas (200 µl) de las preparaciones enzimáticas colocadas en baño de hielo se precipitaron agregando 5 volúmenes de acetona fría (-20 °C). Las suspensiones obtenidas se dejaron toda la noche a -20 °C para favorecer la sedimentación y luego se centrifugaron durante 20 minutos a 10.000 g y 4 °C. El sobrenadante se descartó y la acetona remanente se eliminó en desecador con vacío durante 10 minutos. Los precipitados así obtenidos se redisolviéron en 50 µl de buffer de muestra conteniendo SDS y β- mercaptoetanol como agentes desnaturalizantes.

| Buffer de muestra | |
|-------------------------------------|---------|
| Tris | 0,787 g |
| Glicerol | 8 ml |
| SDS | 2 g |
| β-mercaptoetanol | 5 ml |
| Azul de bromofenol | 2 mg |
| <i>Se lleva a pH 6,8 con HCl 1N</i> | |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

Las muestras se llevaron a ebullición durante 5 minutos en baño de María y se centrifugaron durante 3 minutos a 10.000 g y 4 °C para ser luego sembradas en un gel de poliacrilamida al 14%. Cuando las muestras se calientan en exceso de SDS y un reactivo tiólico como el β- mercaptoetanol, el SDS se une a la mayoría de los polipéptidos en una relación constante que depende del peso de dicho polipéptido. De esta forma la densidad de carga se hace prácticamente idéntica y la migración electroforética pasa a depender sólo del tamaño, permitiendo la determinación del peso molecular de los polipéptidos separados empleando patrones de PM.

9.1.2. Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad), en placas de vidrio de 7 cm x 8 cm y separadores de 0,75 mm de espesor. En un primer paso se permitió que polimerizara el gel de resolución y luego se hizo lo propio con el gel de "stacking" o apilamiento. La composición de las soluciones necesarias para la preparación de ambos geles y el desarrollo de la electroforesis se describen a continuación.

| Solución madre de Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8) | |
|---|--------|
| Acrilamida | 30 g |
| Bisacrilamida | 0,8 g |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

Esta solución, luego de filtrada, puede conservarse hasta 2 meses en frasco color caramelo y 4 °C.

| Buffer del gel de resolución | |
|-------------------------------------|--------|
| Tris | 36,3g |
| <i>Se lleva a pH 8,8 con HCl 1N</i> | |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

| Gel de resolución 14% | |
|--|------------|
| Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8) | 3,5 ml |
| Buffer del gel de resolución | 0,94 ml |
| SDS 10, p/v | 75 μ l |
| Agua destilada | 2,68 ml |
| <i>Se mezcla suavemente y se agregan los agentes polimerizantes:</i> | |
| TEMED | 4 μ l |
| Persulfato de Amonio 1,5%, p/v | 0,38 ml |

| Buffer del gel de stacking | |
|-------------------------------------|--------|
| Tris | 6,05 g |
| <i>Se lleva a pH 6,8 con HCl 1N</i> | |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

| Gel de stacking 5% | |
|---|------------|
| Acril-Bis (30:0,8) | 1,16 ml |
| Buffer de stacking | 0,87 ml |
| SDS 10%, p/v | 70 μ l |
| Agua destilada | 4,53 ml |
| <i>Se mezcla suavemente y se agregan los agentes polimerizantes</i> | |
| TEMED | 4 μ l |
| Persulfato de amonio 1,5% | 0,35ml |

9.1.3. Aplicación de las muestras

Las calles se lavaron dos veces con buffer de reservorio antes de la siembra y luego se aplicaron las muestras (5 a 10 μ l) con jeringa Hamilton.

| Buffer de reservorio (concentrado) concentrada | |
|--|--------|
| Tris | 3,0 g |
| Glicina | 14,4 g |
| SDS | 1,0 g |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

La solución obtenida se filtró y almacenó a 4 °C. Antes de usar se diluyó 1/10.

9.1.4. Condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean III Dual Slab Cell (Bio Rad). Los reservorios anódico y catódico se llenaron con buffer de reservorio de pH 8,3.

La corrida se realizó en dos etapas de intensidad de corriente constante; la primer etapa, a 20 mA por placa, finalizó cuando el frente de corrida abandonó el gel de stacking; la segunda etapa se corrió a 30 mA por placa evitando superar los 200 V. La electroforesis finalizó cuando el frente de corrida llegó al borde inferior del gel (aproximadamente 45 minutos).

9.1.5. Fijación y coloración

Una vez completada la corrida, los geles fueron sumergidos durante 2 h en la solución colorante de Coomassie Blue R-250 que actúa también como fijadora. Los geles teñidos fueron sometidos a sucesivos lavados con solución decolorante hasta obtener un fondo incoloro. La sensibilidad de la tinción es de hasta 0,2 –0,5 µg de proteína para las bandas muy agudas.

| Solución colorante | |
|--------------------------------|--------|
| Ácido acético glacial | 10 ml |
| Etanol | 40 ml |
| Coomassie brilliant Blue R-250 | 100 mg |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

La solución se filtró antes de ser usada.

| Solución decolorante | |
|-----------------------|--------|
| Ácido acético glacial | 10 ml |
| Etanol | 25 ml |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

9.1.6. Adquisición de imágenes y deshidratación de los geles

Los geles fueron escaneados empleando un escáner UMAX modelo Astra 610P. Con el objeto de lograr una buena conservación los geles se deshidrataron mediante inmersión en un recipiente con glicerol al 40% durante 1 h a temperatura ambiente luego de lo cual se colocaron entre films plásticos, evitando la

formación de burbujas; por fuera de los films se colocaron papeles de filtro formando un “sandwich”. Sobre el conjunto se colocó un peso tal que la presión ejercida fuera de aproximadamente $7,5 \text{ g/cm}^2$ y se mantuvo durante 3 días en esas condiciones. Cuando los geles estuvieron suficientemente deshidratados se sellaron los bordes de los films con cinta de enmascarar lo que permite su manipulación y conservación.

9.1.7. Estimación de los pesos moleculares

Para la determinación de los pesos moleculares se sembró en los geles una mezcla de proteínas estándar con pesos moleculares comprendidos entre 97,4 y 14,4 kDa (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, BioRad). Los geles fueron escaneados, obteniéndose los correspondientes densitogramas mediante el empleo del software Scion Image (Scion Corporation, <http://www.scioncorp.com>). Los pesos moleculares de los polipéptidos se estimaron empleando como curva de calibración el gráfico del \log_{10} del peso molecular de los patrones en función de la distancia relativa de corrida.

| Proteína | PM (kDa) |
|--------------------------|----------|
| Fosforilasa b | 97,4 |
| Albúmina sérica | 66,2 |
| Ovoalbúmina A | 45,0 |
| Anhidrasa carbónica | 31,0 |
| Inhibidor de la tripsina | 21,5 |
| Lisozima | 14,4 |

9.2. Electroforesis desnaturalizante – discontinua en condiciones reductoras y no reductoras (método con Bicina)

9.2.1. Preparación de las muestras

Alícuotas de 200 μl de las preparaciones enzimáticas se diluyeron con igual volumen de buffer de muestra tal como se describe en el ítem 9.1.1 pero con doble concentración para realizar las electroforesis en condiciones reductoras. Para preparar las muestras para la electroforesis en condiciones no reductoras se

empleó el mismo buffer sin β -mercaptoetanol. Todas las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 10.000 g y 4 °C.

9.2.2. Preparación de los geles

Se utilizó el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). Se preparó un gel de resolución al 12% en poliacrilamida con un gel de stacking al 4%. Las soluciones utilizadas para la obtención de los geles se prepararon como se indica a continuación.

| Solución madre de Acrilamida-Bisacrilamida (29:1) | |
|---|--------|
| Acrilamida | 29 g |
| Bisacrilamida | 1,0 g |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

| Gel de resolución 12% | |
|---|------------|
| Acril-Bisacrilamida (29:1) | 4,0 ml |
| Buffer de resolución (ítem 9.1.2) | 1,65 ml |
| SDS 20%, p/v | 0,1 ml |
| Agua destilada | 4,35 ml |
| <i>Se mezcla suavemente y se agregan los agentes polimerizantes</i> | |
| TEMED | 10 μ l |
| Persulfato de amonio 10%, p/v | 0,1 ml |

| Gel de stacking 4% | |
|---|------------|
| Acril-Bis (29:1) | 0,7 ml |
| Buffer de stacking (ítem 9.1.2) | 1,5 ml |
| SDS 20%, p/c | 50 μ l |
| Agua destilada | 2,8 ml |
| <i>Se mezcla suavemente y se agregar los agentes polimerizantes</i> | |
| TEMED | 5 μ l |
| Persulfato de amonio 10%, p/v | 50 μ l |

9.2.3. Aplicación de las muestras

Las calles se lavaron dos veces con buffer de reservorio antes de aplicar las muestras con jeringa Hamilton (volumen de siembra 18 μ l).

| Buffer de reservorio, solución concentrada (pH 8,3) | |
|---|---------|
| Tris | 12,11 g |
| Bicina | 16,32 g |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

La solución se filtró y almacenó a 20 °C. Antes de usar se diluyó 1/10.

9.2.4. Condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló en dos etapas de intensidad de corriente constante; la primer etapa, a 20 mA por placa, finalizó cuando el frente de corrida abandonó el gel de stacking; la segunda etapa se corrió a 30 mA por placa, evitando superar los 200 V, hasta que el frente alcanzó el borde inferior del gel (aproximadamente 45 minutos en total).

9.2.5. Fijación, coloración y secado de geles

Una vez completada la corrida los geles fueron sumergidos durante 2 horas en la solución colorante Coomassie Blue R-250 y luego fueron lavados con solución decolorante (ítem 9.1.5). En los casos en que fue necesario se coloreó mediante la tinción de plata que alcanza una sensibilidad hasta 100 veces mayor que la tinción de Coomassie Blue R-250 (Hames, 1996).

Luego de ser coloreados los geles se escanearon y se deshidrataron en la forma antes descripta (ítem 9.1.6).

9.2.5.1. Método de tinción con plata

Para realizar la coloración con plata se siguió el método de O'Connell y Stults (1997) que se basa en la unión de los iones plata a las proteínas y su posterior reducción; luego, gracias a las propiedades químicas del tiosulfato que forma complejos solubles de plata se elimina el color de fondo inespecífico "background" producido por precipitación de sales insolubles.

Q.2.5.1.1. Fijación

Las proteínas fueron fijadas por inmersión de los geles en solución fijadora durante 30 minutos, esta operación se repitió 3 veces. Esta etapa previene la difusión de las proteínas y remueve sustancias interferentes.

| Solución fijadora | |
|-------------------|--------|
| Ácido acético | 10 ml |
| Etanol | 30 ml |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

Q.2.5.1.2. Lavado y sensibilización de los geles

Luego de fijados los geles se lavaron en primer lugar con etanol al 20% durante 10 minutos y luego con agua destilada por otros 10 minutos para eliminar el ácido acético, cuya acidez interfiere en la siguiente etapa.

Con el fin de sensibilizar el gel, el mismo fue sumergido en una solución de tiosulfato de sodio (0,2 g/l) durante un minuto, luego de lo cual los geles se lavaron dos veces con agua destilada para remover el exceso de tiosulfato.

Q.2.5.1.3. Tratamiento con plata

Los geles previamente sensibilizados fueron sumergidos en una solución de AgNO_3 (2,0 g/l) y se mantuvieron en oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente fueron lavados con agua destilada 5 veces durante 10 segundos cada vez para remover el AgNO_3 en exceso.

Q.2.5.1.4. Desarrollo de la coloración

Los geles se sumergieron en la solución de desarrollo hasta que no se observó la aparición de nuevas bandas, evitando la sobrecoloración del gel por depósito de precipitados de AgS .

| Solución desamolladora | |
|---|------------|
| Formaldehído 37% | 70 μ l |
| Na ₂ CO ₃ anhidro | 3,0 g |
| Na ₂ S ₂ O ₃ | 1 mg |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

La reacción se detuvo sumergiendo los geles en solución de “stopping” durante 1 minuto.

| Solución de “stopping” | |
|------------------------|--------|
| Ácido acético | 2,5 ml |
| Tris | 5,0 g |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

9.2.6. Estimación de los pesos moleculares

Para la determinación de los pesos moleculares se utilizó como estándar una mezcla de proteínas de amplio rango de peso molecular (Precision Plus Prestained Protein Standards Broad Range, BioRad) conformada por proteínas recombinantes de pesos moleculares entre 10 y 250 kDa (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa).

10. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) es una técnica electroforética en la cual compuestos anfotéricos son fraccionados de acuerdo a sus puntos isoeléctricos (pI) a lo largo de un gradiente continuo de pH por lo que permite separar péptidos y proteínas (Righetti *et al.*, 1996).

10.1. Preparación de las muestras

Dado que las muestras a sembrar deben presentar una fuerza iónica muy reducida las mismas se desionizaron por precipitación de las proteínas con 5 volúmenes de acetona fría (-20 °C); las suspensiones fueron centrifugadas, el sobrenadante eliminado y el precipitado redisolto con agua nanopura. Dicho tratamiento se repitió dos veces.

10.2. Preparación de los geles

Se empleó la bandeja formadora de geles del equipo Mini IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). A cada placa de vidrio se le adhirió un soporte para geles de poliacrilamida (PAG film, BioWhittaker Molecular Application) y el conjunto fue colocado sobre la bandeja de armado de tal manera que el GelBond quede hacia abajo.

Se preparó la mezcla de monómeros como se indica en la tabla.

| Solución madre de Acrilamida-Bisacrilamida | |
|--|---------|
| Acrilamida | 24,25 g |
| Bisacrilamida | 0,75 g |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

| Gel al 5% (composición por placa) | |
|-----------------------------------|---------|
| Mezcla de monómeros (24,25:0,75) | 1,00 ml |
| Glicerol 25% (v/v) | 1,00 ml |
| Agua destilada | 2,75 ml |
| Anfolitos (Pharmalyte 3-10) | 0,25 ml |

La solución anterior se desgasificó durante 20 minutos con bomba de vacío y luego se le adicionaron los reactivos polimerizantes indicados en el cuadro inferior.

| | |
|---------------------------------|-------------|
| TEMED | 1,5 μ l |
| Persulfato de amonio 10% | 60 μ l |
| Rivoflavina (solución saturada) | 200 μ l |

La mezcla de los reactivos debe realizarse con suavidad para no incorporar aire que lentifica la polimerización. A continuación, utilizando una pipeta, se depositó la mezcla de poliacrilamida entre el Gel Bond y la base de la bandeja evitando la formación de burbujas. Luego se dejó polimerizar durante 1 hora bajo luz fluorescente.

10.3. Aplicación de las muestras

Se colocó la cantidad adecuada (2-10 μ l) de cada una de las muestras sobre el gel con jeringa Hamilton y se esperó 5 minutos para permitir que penetren en el mismo antes de iniciar la corrida.

10.4. Desarrollo del IEF

Los electrodos de grafito se mojaron con agua nanopura y se colocó el gel, con las muestras hacia abajo, apoyando la placa de poliacrilamida directamente sobre la superficie de los electrodos.

El enfoque fue llevado a cabo en tres etapas a voltaje constante: a) 100 V durante 15 minutos, b) 200 V durante 15 minutos y c) 450 V durante 60 minutos.

10.5. Fijación, coloración y secado de geles

Al finalizar la corrida electroforética se colocó la placa inmediatamente en baño fijador durante 30 minutos, luego se coloreó durante 1 hora eliminando el exceso de colorante con las soluciones decolorantes I y II (dos lavados de 15 minutos cada uno) hasta la obtención de un fondo incoloro. El gel fue secado con pistola de aire.

| Solución fijadora | |
|--------------------------------|--------|
| Ácido sulfosalicílico | 4 g |
| Metanol | 30 ml |
| Ácido tricloroacético | 12,5 g |
| Agua c.s.p. | 100 ml |
| Solución colorante | |
| Ácido acético glacial | 10 ml |
| Etanol | 27 ml |
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | 40 mg |
| CuSO ₄ | 500 mg |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

| Solución decolorante I | |
|------------------------|--------|
| Ácido acético glacial | 7 ml |
| Etanol | 12 ml |
| CuSO ₄ | 500 mg |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

| Solución decolorante II | |
|-------------------------|--------|
| Ácido acético glacial | 7 ml |
| Etanol | 12 ml |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

10.6. Estimación de los puntos isoelectrónicos

Para la determinación de los puntos isoelectrónicos (pI) se utilizó como estándar una mezcla de proteínas de amplio rango de pI (IEF-MIX 3,6-9,3, Sigma).

| Proteína | pI |
|---------------------------------|---------------|
| Amiloglucosidasa | 3,6 |
| Inhibidor de Tripsina | 4,6 |
| β-lactoglobulina A | 5,1 |
| Anhidrasa carbónica II (bovina) | 5,9 |
| Anhidrasa carbónica I (humana) | 6,6 |
| Mioglobinas (equinas) | 6,8; 7,2 |
| Lectinas | 8,2; 8,6; 8,8 |
| Tripsinógeno (bovino) | 9,3 |

Los geles fueron escaneados, se obtuvieron los correspondientes densitogramas empleando el programa Scion Image y se determinaron los valores de pI empleando una curva de calibración realizada graficando los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida desde el cátodo.

11. Zimograma

Esta técnica permite detectar cuál de las bandas enfocadas presenta actividad proteolítica poniendo en contacto, inmediatamente de corrido el IEF, los geles sin fijar sobre un gel de agarosa embebido en hemoglobina al 2% como sustrato al pH de máxima actividad enzimática. Para realizar el zimograma se siguió la técnica de Westergaar *et al.* (1980).

11.1. Preparación de las placas agarosa-hemoglobina

Las placas de agarosa se prepararon sobre una película de Gel-Bond para geles de agarosa (Pharmacia) de un tamaño apenas mayor al del gel de poliacrilamida del isoelectroenfoque. Sobre el lado hidrofílico del film se depositó una solución de agarosa al 1% en buffer cítrico-citrato 50 mM de pH 4,0 (0,15 ml/cm²). Una vez polimerizada la agarosa, la placa fue sumergida durante 20 minutos en una solución de hemoglobina al 2% del mismo pH (ítem 4.3); por último la placa fue enjuagada con agua destilada y se dejó escurrir durante 10 minutos.

11.2. Desarrollo del zimograma

El gel de poliacrilamida fue apoyado sobre la placa de agarosa-hemoglobina, evitando que se formen burbujas entre las superficies en contacto. El conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda y llevado a estufa a 37 °C durante 1 hora.

11.3. Fijación

Una vez transcurrida la incubación del zimograma los geles fueron separados y la placa de agarosa-hemoglobina sumergida durante 60 minutos en solución fijadora cuya composición se indica a continuación:

| Solución fijadora | |
|-----------------------|--------|
| Acido acético glacial | 10 ml |
| Metanol | 45 ml |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

11.4. Coloración

Una vez fijadas las proteínas, la placa de agarosa-hemoglobina fue deshidratada durante 20 minutos entre papeles de filtro Whatman 3MM bajo una presión de 7,5 g/cm², luego de lo cual fue secada con pistola de aire y sumergida durante 10-30 minutos en la siguiente solución colorante:

| Solución colorante | |
|--------------------------------|--------|
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | 250 mg |
| Solución fijadora c.s.p. | 100 ml |

La solución fue filtrada antes de su uso.

11.5. Decoloración

La decoloración se realizó por inmersión de la placa de agarosa-hemoglobina en la solución fijadora, que actúa también como decolorante, durante 10 minutos y luego se secó con pistola de aire.

12. Purificación cromatográfica

Con el fin de obtener las peptidasas aspárticas purificadas se ensayaron tres métodos cromatográficos basados en diferentes criterios: a) cromatografía de afinidad empleando pepstatina-agarosa, la que permite la adsorción selectiva de endopeptidasas aspárticas sobre la pepstatina, inhibidor específico de este grupo de proteasas, b) cromatografía de exclusión molecular que permite separar las proteínas activas de otras proteínas y péptidos de menor masa molecular y de pigmentos presentes en los extractivos y c) cromatografía de intercambio iónico mediante la cual se separan los polipéptidos según sus propiedades de carga.

12.1. Cromatografía de afinidad

12.1.1. Preparación de la columna cromatográfica

Se empleó una columna HR 5/5 (Amersham Bioscience) rellena con 1,0 ml de pepstatina-agarosa (Sigma). La agarosa de la matriz del gel posee una bajísima adsorción inespecífica y sus grupos hidroxilo derivatizados tienen pepstatina unida covalentemente. La estructura de la matriz, con un entrecruzamiento del 4%, presenta amplios poros que permiten la interacción con los ligandos aún en el caso de moléculas de gran tamaño.

La columna se preequilibró con buffer glicina-HCl (0,1 M) de pH 3,0.

12.1.2. Siembra y desarrollo de la cromatografía

Se sembraron 6,0 ml de muestra previamente despigmentada con Sephadex G-25 como se indicó en 6.2, empleando una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 0,45 ml/min.

La columna se lavó con 10 volúmenes de buffer glicina-HCl (0,1 M) de pH 3,0 para remover las sustancias no ligadas y luego se equilibró el gel con buffer glicina-NaOH (0,25 M) de pH 8,0.

El buffer alcalino se dejó en contacto con el relleno durante 30 min para lograr que las peptidasas aspárticas y sus precursores se separen de la pepstatina a la que quedaron unidas. La cromatografía de afinidad es de máxima eficiencia cuando el ligando tiene una constante de disociación en solución del orden de 10^{-4} a 10^{-8} M con la enzima, por este motivo cuando las sustancias están fuertemente unidas al adsorbente –como en el presente caso- se debe detener el flujo después de aplicar el eluyente para mejorar la recuperación.

La elución se llevó a cabo mediante el agregado de 3,0 ml de buffer glicina-NaOH (0,25 M) de pH 8,0 a una velocidad de flujo de 0,45 ml/min. El cambio de pH altera el grado de ionización de los grupos cargados tanto del ligando como de la proteína adsorbida lo que reduce la afinidad y permite la elución. Se colectaron en forma manual fracciones de 1,0 ml. El perfil de proteínas se monitoreó por medida de la absorbancia a 280 nm.

12.1.3. Reconstitución y conservación de la columna

Luego de la corrida cromatográfica la columna se lavó con 2 ml de urea 8 M, agente caotrópico, que permite eliminar moléculas que hubieran quedado fuertemente ligadas al relleno. Finalmente se aplicaron 10 volúmenes de agua destilada a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min y el relleno de la columna se conservó en una solución 0,5 M de NaCl conteniendo 0,02 % p/v de timerosal.

12.2. Cromatografía de exclusión molecular

12.2.1. Preparación de la columna cromatográfica

Se empleó una columna HiLoad 16/60 Superdex S200 (Amersham Bioscience), cuyo gel está compuesto por una matriz de agarosa donde las propiedades de exclusión están principalmente determinadas por cadenas de dextranos y fracciona proteínas globulares en un rango de 10 a 600 kDa.

La columna se adosó a un sistema FPLC (Pharmacia). Dicho sistema está compuesto por dos bombas P-500, una válvula de inyección V-7, una unidad de programación GP-250 Plus, un sistema de detección de proteínas por absorbancia a 280 nm (Control Unit UV-1 y Optical Unit UV-1) y un registrador (Rec 112).

La columna fue preequilibrada con 1 volumen de columna de buffer Tris-HCl 25 mM de pH 7,6 medido a 20 °C.

12.2.2. Acondicionamiento de la muestra

El extracto crudo obtenido por trituración con N₂ líquido a pH 3,0 (ítem 2 de esta sección) fue centrifugado durante 5 minutos a 2000 g y 4 °C y el sobrenadante se filtró por membrana de poro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell).

12.2.3. Siembra y desarrollo de la cromatografía

Se sembraron 4 ml de muestra a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La elución se realizó empleando 90 ml del mismo buffer con que fue preequilibrada la columna trabajando también a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Los picos eluidos que presentaron absorbancia a 280 nm fueron colectados en forma manual.

12.2.4. Reconstitución y conservación de la columna

Luego de la corrida cromatográfica la columna se lavó con 200 ml de NaOH 0,1 M y con 60 ml de agua destilada conteniendo 0,05 % de azida sódica a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min.

12.3. Cromatografía de intercambio aniónico

12.3.1. Preparación de la columna cromatográfica

Se utilizó una columna Mono Q HR 5/5 preempacada con MonoBeads (Amersham Bioscience); las pequeñas partículas perfectamente esféricas de poliestireno/divinil benceno hacen que este relleno tenga alta resolución; a esta ventaja se suma una elevada selectividad dada por el grupo intercambiador de aniones. La columna se adosó al sistema FPLC descrito previamente y se preequilibró con 5 ml de buffer Tris-HCl (25 mM) de pH 7,6 (determinado a 20 °C) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min.

12.3.2. Siembra y desarrollo de la cromatografía

El programa se desarrolló a una velocidad de flujo de 0,75 ml/min y constó de las siguientes etapas:

- a) siembra de 25 ml de la fracción activa obtenida de la cromatografía de exclusión molecular (ver ítem 12.2),
- b) lavado con 5 ml de buffer Tris-HCl 25 mM de pH 7,6 (a 20 °C), para eliminar las proteínas no retenidas y
- c) elución de las proteínas con 30 ml de un gradiente lineal (0,0-0,5 M) de NaCl en buffer Tris-HCl 25 mM de pH 7,6 (a 20 °C).

En un segundo programa utilizado se repitió la estrategia de purificación por cromatografía de intercambio aniónico, pero reduciendo el gradiente salino a 0,0-0,4M. Este fue el programa adoptado pues permitió una correcta purificación.

12.3.3. Regeneración y conservación de la columna

La regeneración del relleno cromatográfico constó de: a) un lavado con un volumen de columna (5 ml) de un gradiente lineal de NaCl disuelto en buffer Tris-HCl (25 mM) de pH 7,6 partiendo desde la mayor molaridad empleada en el gradiente (0,4 ó 0,5M) a 1,0 M; b) un segundo lavado con un volumen de columna de solución de NaCl 1,0 M en el mismo buffer; c) un tercer lavado con 1 ml de

gradiente lineal de NaCl de 1,0-0,0 M en el mismo buffer y d) un lavado final con 4 ml del buffer sin sal con el fin de obtener el relleno en su estado inicial.

13. Determinación de la actividad endopeptidásica sobre un sustrato sintético

13.1. Detección de actividad enzimática

Con el objeto de detectar las fracciones cromatográficas que contuvieran la enzima aspártica se determinó en las mismas su actividad endopeptidásica utilizando como sustrato el péptido sintético fluorogénico: MCA-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu-DNP (Genosphere Biotechnologies), donde MCA es un grupo 7- metoxicumaril y DNP es 2,4-dinitrofenilo. El péptido contenido en este sustrato ha demostrado ser muy específico para cardosina A y cardosina B, peptidasas aspárticas presentes en flores de *C. cardunculus* (Verísimo *et al.*, 1996).

La solución stock de la enzima se preparó en una concentración de 2,7 mg/ml en agua de calidad MilliQ y se almacenó a 4 °C; la concentración de trabajo fue de 27 µg/ml. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C en un espectrofluorómetro termostatzado (Luminiscence Spectrometer LS 50 B, Perkin Elmer). Se empleó el protocolo de Verissimo y colaboradores (1996). Antes de agregar el sustrato se termostatzaron 10 µl de las muestras con 1950 µl de buffer acético-acetato (50 mM) de pH 4,7 conteniendo NaCl 140 mM durante un minuto a 37 °C. Luego se agregaron 40 µl de sustrato (27 µg/ml) a la mezcla termostatzada y se agitó rápidamente. El fluoróforo se excitó a 328 nm y se detectó la luz emitida a 393 nm. Las lecturas se tomaron con intervalos de 10 segundos durante 300 segundos.

13.2. Determinación del pH óptimo

Con el fin de conocer el pH óptimo de la enzima cuando se emplea el sustrato fluorogénico citado en el ítem 13.1 se determinó el perfil de pH empleando los siguientes sistemas buffer: a) acético-acetato (50 mM) en presencia de NaCl 140 mM de pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 y 5,6; b) MES – NaOH (50 mM) en presencia de

NaCl 140 mM de pH 6,0 y 6,6 y c) Tris-HCl (25 mM) de pH 7,6 en presencia de NaCl 140 mM. Se preincubaron 25 μ l de la preparación enzimática con 1950 μ l de cada uno de los buffers de los diferentes valores de pH durante un minuto a 37 °C. Luego se agregó a cada mezcla 40 μ l del sustrato (27 μ g/ml) y se prosiguió con el ensayo como se describe más arriba. Se midieron las velocidades iniciales y la máxima velocidad se consideró el 100% de actividad para graficar el % de actividad vs el pH.

13.3. Estabilidad a la temperatura

Se incubó la enzima purificada durante 15 y 120 minutos a 20 °C y luego se determinó la actividad endoesterolítica residual sobre el sustrato sintético fluorogénico que contiene el péptido Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu, como se describió en el ítem 13.1.

13.4. Determinación de la actividad enzimática en Unidades Internacionales

Se utilizó el protocolo descrito anteriormente empleando buffer acético-acetato (50 mM) de pH 5,6 conteniendo NaCl 140 mM.

La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 μ l de cardosina A (230 μ g/ml), 1955 μ l del buffer de trabajo y 40 μ l de sustrato (27 μ g/ml), desarrollándose la reacción durante 60 segundos a 37 °C.

En todos los casos se realizaron controles negativos reemplazando la muestra por agua Milli Q, de esta manera se estableció la línea de base de intensidad de fluorescencia. El máximo de intensidad de fluorescencia se obtuvo degradando completamente el sustrato con cardosina A. La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (μ g de sustrato hidrolizado/min) determinada a 37 °C.

13.5. Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de la velocidad de reacción se llevó a cabo con el péptido sintético descrito en el inciso 13.1. Los ensayos se llevaron a cabo a la misma temperatura y con el mismo espectrofluorómetro.

Se termostataron 5, 10 ó 25 μl de la enzima purificada durante un minuto a 37 °C con buffer acético-acetato 50 mM de pH 5,6 conteniendo NaCl 140 mM en cantidad suficiente para que el volumen final en el tubo de reacción llegue a 2000 μl . Se trabajó con tres concentraciones diferentes de enzima con el fin de verificar que la actividad específica, expresada como ($\mu\text{moles de producto/min}$)/mg de enzima, se mantiene dentro de ese rango. Para lograr distintas concentraciones de sustrato en el tubo de reacción se agregó el sustrato (27 $\mu\text{g/ml}$) en volúmenes que fueron desde 20 a 100 μl .

El fluoróforo se excitó a 328 nm y se detectó la luz emitida a 393 nm. Las lecturas se tomaron con intervalos de 10 segundos durante 300 segundos.

Los parámetros cinéticos V_{MAX} y K_{M} se calcularon utilizando el módulo de cinética del programa Sigma Plot 2002 versión 8.02 para Windows (SPSS Inc.).

14. Degradación de la cadena β de la insulina

14.1. Hidrólisis

La cadena β oxidada de la insulina (Sigma) en una concentración de 1 mg/ml fue incubada con la preparación enzimática (relación enzima/sustrato 1:50) en ácido fórmico 0,1 M ajustado a pH 3,1 con NaOH ó en buffer cítrico-fosfato de pH 6,0. Las mezclas de reacción de pH 3,0 fueron incubadas durante 1; 3; 6; 12 y 18 horas, en tanto que las mezclas de reacción de pH 6,0 fueron incubadas 1 y 3 horas, todas las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta el momento en que se procedió a su análisis por RP-HPLC.

14.2. Separación de los fragmentos peptídicos

Las muestras obtenidas como se describe en el ítem anterior, fueron centrifugadas durante 2 minutos a 15000 g y el sobrenadante fue analizado por cromatografía en fase reversa. Se empleó un HPLC (Merck-Hitachi) compuesto por una bomba L-6200A, un detector L-4000 UV y un integrador D-2500. Para la separación de los péptidos se utilizó una columna C-18 modelo BioSil 318-10 (BioRad) de 250 x 4,6 mm.

La columna fue equilibrada con TFA 0,1% y los péptidos fueron eluidos a una velocidad de flujo de 1 ml/min utilizando un gradiente lineal de hidrofobicidad

creciente hasta alcanzar un 80% de acetonitrilo en TFA 0,1%. El eluato fue monitoreado constantemente a 215 nm.

14.3. Análisis de la secuencia aminoacídica N-terminal de los péptidos obtenidos

Para establecer la especificidad de corte de la enzima purificada se analizó la secuencia N-terminal de los péptidos separados por RP-HPLC mediante la degradación de Edman empleando un secuenciador Applied Biosystem 473-A.

15. Ensayos de inhibición

Con el fin de establecer el mecanismo proteolítico de las enzimas contenidas en las diferentes preparaciones enzimáticas se emplearon inhibidores específicos de grupo (Dunn, 2001) sobre la actividad coagulante de leche bovina; se hizo lo propio sobre la actividad peptidásica empleando la cadena β oxidada de la insulina.

En el primer caso las muestras se preincubaron durante 30 minutos a 37 °C con 2, 10, 50 y 100 μ M de pepstatina A (inhibidor de aspartilpeptidasas), con 100 μ M de E-64 (inhibidor de cisteinpeptidasas) y con 1 mM de PMSF y 20 μ M de aprotinina (inhibidores de serinpeptidasas). Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se sumergieron en baño de hielo y a continuación se determinó la actividad coagulante como se describe en el ítem 4.1.

En el segundo caso, como se ha indicado, el sustrato empleado fue la cadena β oxidada de la insulina. La enzima purificada se preincubó durante 15 min a temperatura ambiente con inhibidores de la actividad peptidásica: 70 μ M de pepstatina A, 24 μ M de E-64, 2,5 mM de PMSF y 12 mM de EDTA (inhibidor de metalopeptidasas). Las muestras así inhibidas (40 μ l) se incubaron durante 1 hora con 100 μ l de una solución que contuvo 1 mg/ml de sustrato en ácido fórmico 0,1 M ajustado a pH 3,1 con NaOH. Los fragmentos peptídicos fueron separados por RP-HPLC como se describió en 14.2. Del mismo modo se analizaron muestras conteniendo sólo los inhibidores y la insulina. En base a los resultados obtenidos, y con el fin de confirmar los mismos, se incubó la enzima purificada en presencia de pepstatina A 90 μ M durante 40 minutos a temperatura ambiente. Las

muestras inhibidas se utilizaron para degradar el mismo sustrato, empleando la metodología anteriormente descritas pero con un mayor tiempo de incubación (3 horas).

En todos los casos se tomó como control positivo la muestra en estudio sin inhibidor y se incubó en idénticas condiciones de tiempo y temperatura.

Resultados y Discusión

1. Fuente de peptidasas

Para la extracción de peptidasas se cortaron inflorescencias maduras de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. como la que se muestra en la Fig. 1a. Las flores (Fig. 1b) son isomorfas, perfectas, con corola tubulosa desigualmente 5-partida (con un lóbulo más largo que el resto). Las anteras tienen la base sagitada, los filamentos están engrosados y con pelos unidos entre sí. Las ramas estilares están unidas y tienen un anillo piloso por debajo del punto de bifurcación (Ariza Espinar & Delucchi, 1998).

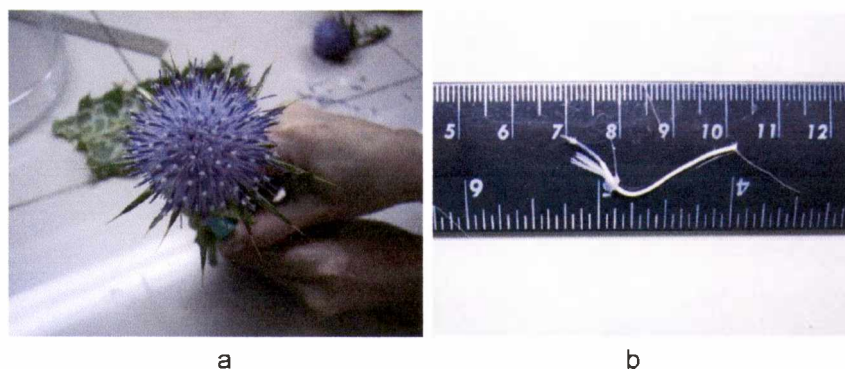


Figura 1. a. Inflorescencia de *S. marianum* (L.) Gaertn. **b.** Flor aislada

La expresión de las peptidasas aspárticas (PAs) en plantas no tiene una distribución aleatoria sino más bien tejido específica (Mutlu & Gal, 1999). Más aún algunas especies de plantas - *C. cardunculus*, *Aradidopsis*, *Hordeum vulgare* y *Nepenthes* - tienen múltiples genes de PAs que se expresan en distintos tejidos, lo que sugiere cierta especialización funcional (Simões & Faro, 2004).

Se han hallado peptidasas aspárticas como cardosina A y cardosina B, ciprosinas 1, 2 y 3, todas en flores de *Cynara cardunculus* L. y cenprosinas A y B en flores de *Centaurea calcitrapa*, especies pertenecientes a la familia *Asteraceae*. La expresión de cardosina A está restringida a los pistilos, esta peptidasa se acumula en las vacuolas de almacenamiento de proteínas de las papilas estigmáticas, en la superficie receptora del polen y, aunque en menor proporción, en las vacuolas de las células epidérmicas de los estilos (Ramalho-Santos *et al.*, 1997). Cardosina B por su parte se acumula en la pared celular y en la matriz extracelular del tejido de transmisión (Vieira *et al.*, 2001). La presencia de ciprosinas ha sido estudiada en distintos estadios de maduración floral revelando

que estas enzimas se encuentran en muy pequeña cantidad en flores muy jóvenes y que la cantidad de enzima se incrementa al aumentar la maduración floral. Por otro lado no se detectó su presencia en hojas o semillas sino sólo en las partes violeta de estilos y corolas (Cordeiro *et al.*, 1994a).

La razón de la elección de las flores como posible fuente de proteasas aspárticas (PAs) para este trabajo se basó en los datos antes mencionados obtenidos para *Cynara cardunculus* y *Centaurea calcitrapa* y a su proximidad taxonómica con *Sylibum marianum* ya que las tres especies pertenecen a la misma tribu (*Carduae*)

2. Obtención del extracto crudo

Con el objeto de seleccionar el método que permita obtener a partir de flores frescas de *S. marianum* el extracto crudo con mayor actividad coagulante de leche bovina, se realizaron cuatro tipos diferentes de extracciones empleando los procedimientos descritos en Materiales y Métodos (M&M), ítem 2, del presente capítulo. A cada extractivo (1 g de flores / 3ml de buffer) se le determinó la actividad coagulante de leche como se indica en el ítem 4.1 de M&M. Los extractivos obtenidos mediante trituración en homogenizador ya sea con buffer de pH 3,0 ó con buffer de pH 7,0 no presentaron actividad coagulante de leche hasta las 8 horas, por lo que se descartó este método y se continuó trabajando con los extractivos obtenidos por trituración de las flores con N₂ líquido por ser los que manifestaron mayor actividad coagulante.

Los extractivos fueron coloreados debido a la presencia de pigmentos florales del grupo de los flavonoides y, como es característico de las antocianidinas, el color varió con el pH: fue fucsia a pH 3,0 y color violeta a pH 7,0. En cuanto a la actividad coagulante de leche, el extractivo obtenido a pH 3 mostró mayor actividad con un tiempo de coagulación de 17 ± 1 min, mucho menor que el obtenido a pH 7 que demoró 240 ± 5 min en producir la coagulación.

Los extractivos obtenidos a pH 3,0 tienen además la ventaja de presentar una notoria disminución en la cantidad de impurezas de naturaleza proteica respecto a los extractivos obtenidos a pH 7,0, lo que fue demostrado por SDS-PAGE (M&M, ítem 9.1) como puede observarse en la Fig. 2.

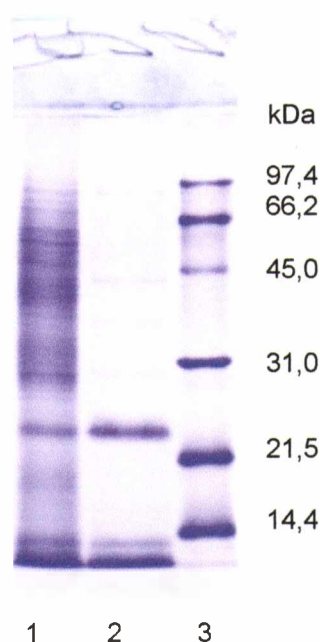


Figura 2. SDS-PAGE. Calle 1: extractivo de flores a pH 7,0; calle 2: extractivo de flores a pH 3,0; calle 3: marcadores de peso molecular.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Faro *et al.*, 1995, quienes obtienen a partir de flores frescas de *Cynara cardunculus* L., congeladas con nitrógeno líquido, un extractivo a pH 3,0 que presenta mayor actividad y menor cantidad de contaminantes proteicos que otro extractivo obtenido a pH 7,6.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, los homogenatos de pH 3,0 fueron seleccionados como material de partida para purificar y caracterizar las enzimas proteolíticas presentes en los mismos.

2.1. Caracterización del extracto crudo

2.1.1. Actividad endopeptidásica del extracto crudo

La actividad enzimática del extracto crudo se ensayó con azocaseína según la técnica descrita en el ítem 4.2. de M&M. Dicho extractivo no presentó actividad enzimática a pH 8,0 con el mencionado sustrato ni en presencia ni en ausencia de cisteína, conocido activador de peptidasas cisteínicas; por el contrario a pH 6,0 presentó actividad azocaseinolítica tanto en presencia como en ausencia de cisteína pero los valores fueron muy bajos: $0,0012 \pm 0,0004 U_{\text{azocas}}$. Otros métodos de determinación de la actividad proteolítica no pudieron ser ensayados ya que la

detección normalmente se realiza por medida de la absorbancia a 280 nm y la abundante presencia de compuestos de naturaleza fenólica en el extracto crudo, que absorben a 330 nm, produce una fuerte interferencia.

La actividad endopeptidásica del extracto crudo fue demostrada por su actividad coagulante de leche (a pH 6,5) tal como se ha mencionado en el inciso 1.2.

2.1.2. Inhibición de la actividad endopeptidásica del extracto crudo

Con el fin de determinar a qué grupo catalítico pertenecen las enzimas presentes en el extracto crudo se ensayaron inhibidores de endopeptidasas específicos de grupo. La actividad coagulante del extracto crudo fue totalmente inhibida por incubación del mencionado extractivo con pepstatina A como veremos más adelante (Fig. 8). Dicha inhibición fue completa para todas las concentraciones de inhibidor ensayadas (ver M&M, ítem 15). En contacto con inhibidores de otros grupos de peptidasas tales como E-64 (inhibidor de endopeptidasas cisteínicas), PMSF y aprotinina (inhibidores de endopeptidasas serínicas), la actividad coagulante de leche no fue inhibida. En esta etapa no se realizaron ensayos con un inhibidor específico de metalopeptidasas como es el EDTA ya que el extracto crudo lo contiene y esta actividad estaría inhibida desde el momento de la extracción. El motivo del empleo del EDTA en la preparación del extracto crudo es proteger a las proteínas, las que pueden ser inactivadas irreversiblemente por los productos de oxidación formados por las fenoloxidasas del extracto crudo en presencia de compuestos fenólicos. El EDTA impide la acción de las fenoloxidasas secuestrando el Cu^{+2} , esencial componente de su sitio activo (Anderson, 1968).

Los resultados obtenidos con los inhibidores de grupo demuestran que la actividad coagulante de leche del extracto crudo es debida a la presencia de aspartilendopeptidasas pues la pepstatina A, con alta selectividad por las peptidasas aspárticas, está considerado como uno de los inhibidores más específicos conocidos en enzimología (Dunn, 2001).

2.1.3. Determinación del pI de las peptidasas con actividad proteolítica

Para estimar el punto isoeléctrico de la o las fracciones activas se analizó el extracto crudo mediante isoelectroenfoque seguido de zimograma (M&M, ítems 10 y 11) empleando patrones de pI de amplio rango (3,6-9,3).

Como se observa en la Fig. 3a las proteínas presentes muestran en su mayoría puntos isoeléctricos menores a 7,0. En el zimograma (Fig. 3b) se observó una única banda polipeptídica activa que corresponde a la banda de pI 4,8.

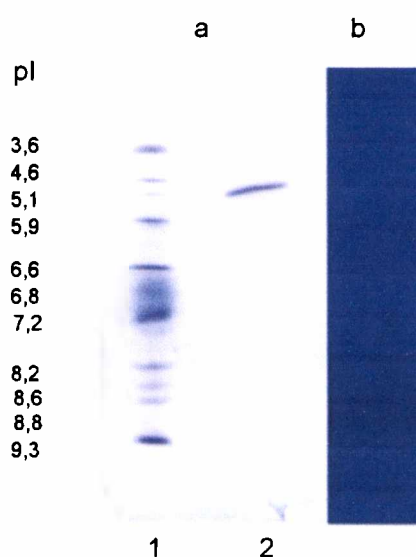


Figura 3. a Isoelectroenfoque. Calle 1: marcadores de pI, calle 2: extracto crudo. b. Zimograma con hemoglobina como sustrato a pH 4,0; la única calle se corresponde con la calle 2 del IEF.

Otras peptidasas aspárticas también presentan pI ácidos, la proquimosina de ternero tiene un pI de 5,0 la quimosina madura presenta un pI de alrededor de 4,6 (Foltmann & Szecsi, 2004). La ciprosina 3, una peptidasa aspárticas aisladas de flores secas de *C. cardunculus*, se fraccionó por electroforesis bidimensional en 3 isoenzimas de pI 3,85; 4,0 y 4,5, repectivamente (Cordeiro *et al.*, 1994a).

2.1.4. Conservación de las preparaciones enzimáticas crudas

Alicuotas de las preparaciones enzimáticas crudas conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron descongeladas cada 7 días por un período de 2 meses y luego cada 30 días por un período de un año y mantuvieron la actividad coagulante de leche constante durante todo el tiempo que duró el monitoreo.

2.1.5. Espectro UV-Visible del extracto crudo

El espectro visible del extracto crudo obtenido a pH 3,0 presentó un máximo de absorbancia en 533 nm, tal como se observa en el recuadro ampliado de la Fig. 4. El color fucsia intenso del extractivo fue debido a la presencia de pigmentos hidrosolubles (flavonoides).

En la misma figura 4 se muestra el espectro ultravioleta del mismo extracto crudo que posee dos picos de absorbancia con máximos a 267 y 330 nm; estos máximos se corresponden con la zona de máxima absorbancia de aminoácidos con restos aromáticos y de compuestos de naturaleza fenólica, respectivamente.

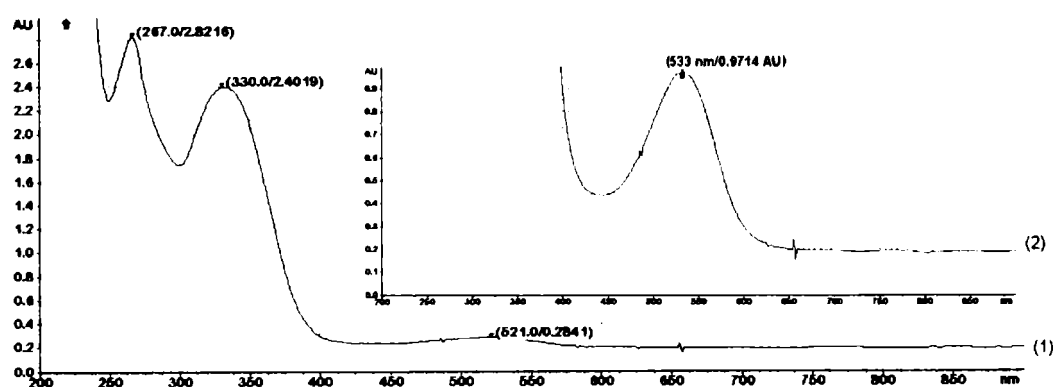


Figura 4. (1) Espectro UV-Visible del extracto crudo obtenido a pH 3,0, factor de dilución = 15
(2) Ampliación del espectro en la zona del visible, factor de dilución = 3

3. Purificación parcial del extracto crudo

3.1. Eliminación de pigmentos y otros compuestos fenólicos

3.1.1. Tratamiento con carbón activado

Dado que la muestra presenta pigmentos y otros contaminantes de naturaleza no proteica que interfieren con los métodos de concentración de proteínas, de determinación de actividad proteolítica y de purificación por intercambio iónico, se intentó su eliminación por el método de Llorente *et al.* (2004) en el que se recurre a la adsorción sobre carbón activado. Si bien este método es eficaz en la eliminación de este tipo de contaminantes en extractos crudos de flores de *Cynara*

scolymus no resultó ser adecuado en el caso de los extractos crudos de flores de *S. marianum* ya que el extractivo despigmentado no retuvo actividad coagulante de leche detectable (M&M, ítem 4.1) y presentó una concentración de proteínas de sólo 20 µg/ml (M&M, ítem 3.1). Los resultados pueden explicarse por la posible adsorción inespecífica de las proteínas activas sobre las partículas de carbón.

3.1.2. Tratamiento en columna de Sephadex G-25

El segundo método ensayado para la despigmentación de los extractivos enzimáticos fue la cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25) en columna (M&M, ítem 6.2). En cada una de las fracciones recolectadas del eluato se determinaron los valores de absorbancia a 280 nm, 330 nm y 535 nm, además de las actividades coagulante de leche y hemoglobinolítica. El cromatograma (Fig. 5) muestra que la primera fracción eluyó en la zona correspondiente al volumen muerto (15,0 ml). Esta fracción presentó máxima absorbancia a 280 nm y retuvo las actividades coagulante de leche y hemoglobinolítica. En segundo lugar eluyeron una serie de compuestos con máxima absorbancia a 280 nm pero sin actividad proteolítica. A partir de los 40 ml de elución se observó un gran incremento de la absorbancia a 330 nm por la presencia de compuestos fenólicos, juntamente con el incremento de la absorbancia a 535 por la presencia de antocianidinas; estos compuestos se terminaron de eliminar durante el posterior lavado de la columna.

La primera fracción, denominada preparación enzimática parcialmente purificada, que eluyó en la zona del volumen muerto presentó un contenido en proteínas de 264 ± 4 µg/ml, retuvo una actividad proteolítica con hemoglobina como sustrato de $0,40 \pm 0,02$ U_{Hb}/ml medida en la zona de linealidad y el tiempo de coagulación de la leche fue de 20 ± 2 minutos, presentando escasa diferencia con el tiempo de coagulación del extracto crudo sembrado (17 ± 1 minutos). Por otra parte, en esta fracción no fue detectable actividad proteolítica a pH 6,6 empleando caseína como sustrato.

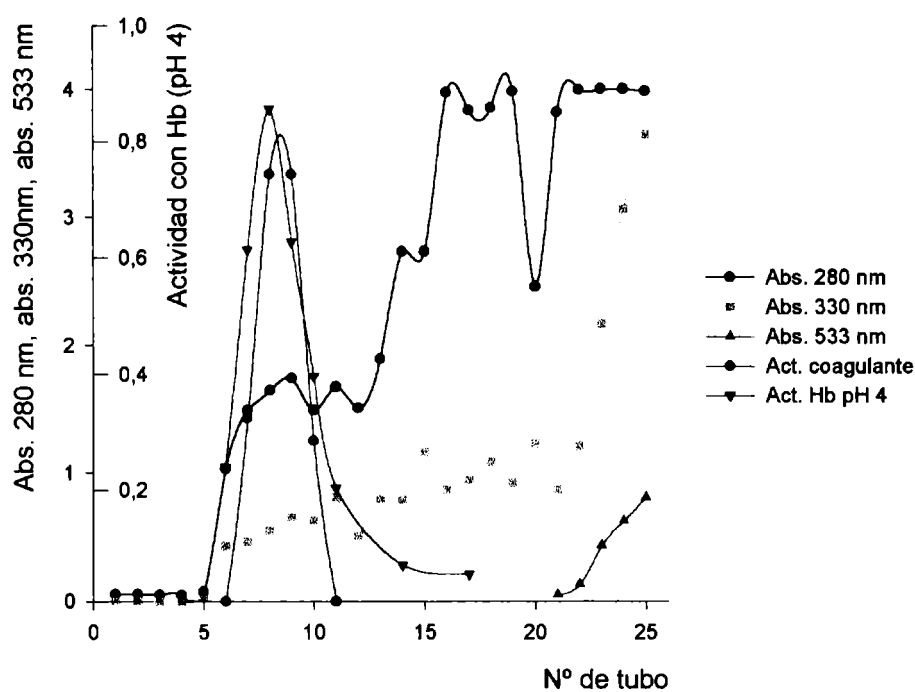


Figura 5. Cromatografía de exclusión molecular

El espectro UV-Visible (Fig. 6) de la preparación enzimática parcialmente purificada obtenida por este método demuestra la remoción de las impurezas de naturaleza fenólica (desaparición del máximo de absorbancia a 330 nm) y los pigmentos flavonoides (desaparición del máximo de absorbancia a 535 nm).

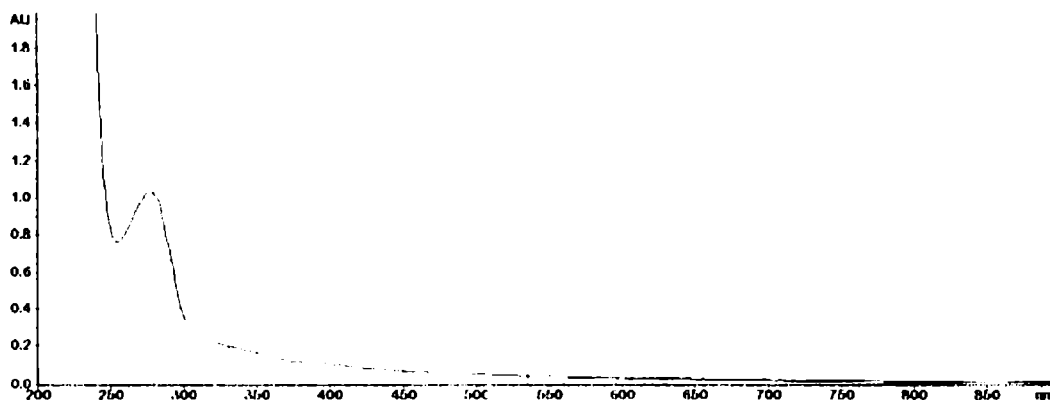


Figura 6. Espectro UV-Visible de la preparación enzimática parcialmente purificada

Debe tenerse en cuenta que al recolectar sólo esta fracción se eliminaron además componentes con máximo de absorbancia a 280 nm -probablemente péptidos de menor peso molecular- como se observa al analizar el cromatograma (Fig. 5)- lo

que implica que se ha obtenido un cierto grado de purificación de la preparación enzimática.

3.2. Caracterización de las preparación parcialmente purificada

3.2.1. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica

El perfil de pH empleando hemoglobina desnaturalizada como sustrato (M&M, ítems 6.2.3.1) se muestra en la figura 7.

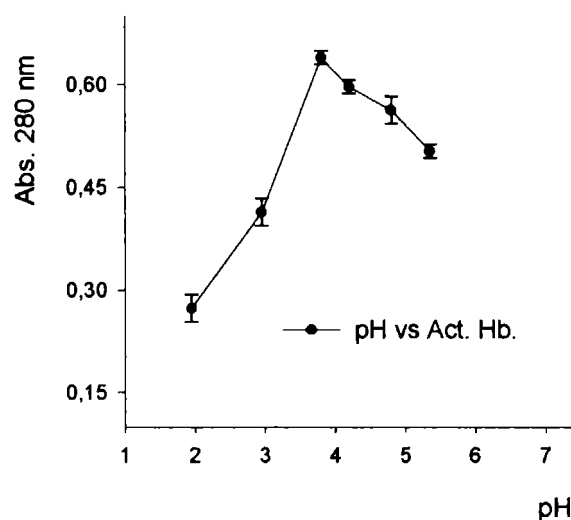


Figura 7. Perfil de pH empleando hemoglobina bovina como sustrato.

La proteólisis óptima sobre este sustrato se alcanzó alrededor de pH 3,8, tal como se ha observado para otras peptidasas aspárticas como las quimosinas de ternero, cerdo, y cordero (Foltmann & Szecsi, 1998) y similar al valor hallado por Sarkkinen *et al.*, (1992) para las fitepsinas aisladas de varios tejidos de cebada (*Hordeum vulgare*) empleando el mismo sustrato (pH 3,7). Por su parte las endopeptidasas aspárticas parcialmente purificada de semillas de *Brassica napus* tienen actividad máxima a pH 3,5 sobre el precursor de la 2S albúmina (Kervinen *et al.*, 1995). En la familia *Asteraceae* se han realizado varios estudios sobre peptidasas extraídas de flores: la cenprosina de *Centaurea calcitrapa* expresa una actividad máxima entre pH 4,0 y 5,0 (Domingos *et al.*, 1998), mientras que las cardosinas A y B aisladas de flores de *Cynara cardunculus* (Faro *et al.*, 1995) exhiben su máxima actividad sobre FTC-caseína como sustrato en un rango de pH menos ácido (5,0 and 5,5); por su parte los extractos de flores de *Cynara scolymus*

presentaron máxima actividad entre pH 4,5 y 5,5 tanto empleando hemoglobina como azocaseína como sustratos (Llorente *et al.*, 2004).

3.2.2. Efecto de inhibidores de peptidasas sobre las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas

En la tabla 1 se presenta la actividad coagulante residual de la preparación enzimática parcialmente purificada luego de ser incubada con inhibidores de peptidasas de distinta especificidad: E-64, pepstatina A, aprotinina y PMSF, empleando leche bovina según el protocolo descrito en M&M, ítem 15. Como puede observarse en la tabla, la actividad coagulante de leche sólo fue inhibida por pepstatina A, reactivo que produjo un 100% de inhibición mientras que ni el inhibidor de peptidasas cisteínicas (E-64) ni los inhibidores de peptidasas serínicas (aprotinina y PMSF) produjeron inhibición significativa.

| Reactivo | Concentración (mM) | % de actividad residual |
|--------------|--------------------|-------------------------|
| Pepstatina A | 0,01 | 0 |
| E-64 | 0,10 | 98 |
| PMSF | 1,00 | 100 |
| Aprotinina | 0,02 | 100 |

Tabla 1. Efecto de inhibidores de la actividad enzimática sobre los extractivos parcialmente purificados

En la figura 8 se compararon los valores de inhibición de las enzimas presentes en el extracto crudo y en la preparación enzimática parcialmente purificada. En ambos casos la pepstatina A produjo la pérdida completa de la mencionada actividad.

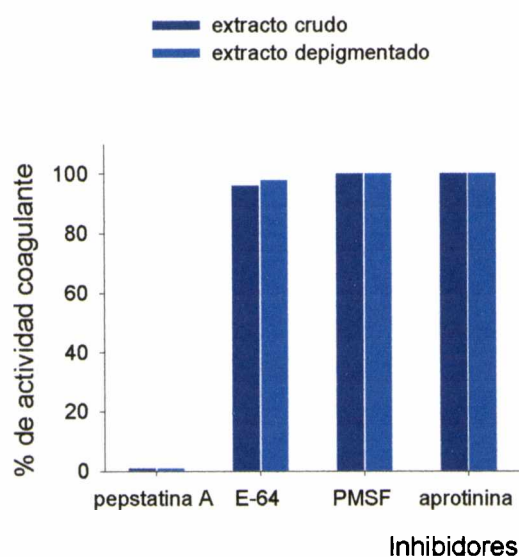


Figura 8. Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad coagulante

3.2.3. Liofilización de las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas

Con el objeto de determinar las mejores condiciones de liofilización de las preparaciones parcialmente purificadas, con el fin de facilitar su conservación, se ensayaron dos sistemas buffer diferentes: a) un sistema volátil como el acetato de amonio y b) un sistema no volátil como el cítrico-citrato (ver ítem 7 de M&M).

La muestra liofilizada en presencia de buffer acetato de amonio de pH 4,0 y redisuelta en buffer cítrico-citrato de pH 3,0 retuvo un $31 \pm 5\%$ de la actividad hemoglobinolítica a pH 4,0 pero no presentó actividad coagulante de leche, aunque debe tenerse en cuenta que la actividad coagulante de leche no es lineal con respecto a la concentración de enzima ya que es un fenómeno fisicoquímico complejo como se verá en el capítulo 2 (Silva & Malcata, 2005). Por su parte la muestra liofilizada en presencia de buffer cítrico-citrato de pH 3,0 y redisuelta en A.D. retuvo un $85 \pm 3\%$ de la actividad hemoglobinolítica y coaguló la leche 6 minutos más tarde que la muestra de partida (29,7 minutos contra 24 minutos). A pesar de haber perdido un 15 % de la actividad proteolítica original, ha sido este último un método adecuado para conservar las muestras sin necesidad de mantenerlas congeladas.

3.2.4. Métodos de concentración de las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas

Dado que en los procesos de purificación es conveniente partir de muestras lo más concentradas posibles, se evaluaron diferentes métodos para realizar la concentración de los extractos despigmentados: a) liofilización, b) precipitación con acetona y redisolución en buffer y c) eliminación de agua por hidratación de Sephadex G-25. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2, donde en la primera fila se indican los valores correspondientes al extractivo parcialmente purificado sin concentrar y en las otras tres filas los correspondientes a los concentrados (4x) por las tres técnicas mencionadas.

| Muestras | Concentración | Act. proteolítica (Hb) | | Act. coagulante | Proteínas $\mu\text{g/ml}$ | |
|------------------------------------|---------------|------------------------|-----|-----------------|----------------------------|------|
| | | Δ | * | | Δ | * |
| Extractivo parcialmente purificado | 1 | 0,1418 | 1 | 50' | 466 | 1 |
| Liofilización | 4 | 0,2845 | 2 | 10' | 596 | 1,3 |
| Precipitado con acetona | 4 | 0,1888 | 1,4 | 30' | 488 | 1,03 |
| Hidratación de Sephadex | 4 | 0,1703 | 1,3 | negativo | 520 | 1,1 |

Δ Determinación directa

*Factor de concentración logrado luego del tratamiento

Tabla 2. Efecto de distintos métodos de concentración sobre la actividad del extractivo parcialmente purificado

De los métodos ensayados el más eficiente resultó ser el de liofilización. De todos modos empleando el método recién mencionado sólo se recuperó el 50% de la actividad proteolítica y la recuperación de proteínas no superó el 32% de las proteínas totales. Debe aclararse que la actividad coagulante fue del 125% con respecto al máximo esperado, esto es debido, como hemos mencionado, a la falta de linealidad entre la actividad coagulante y la concentración enzimática. Por precipitación con acetona se recuperó un 35% de la actividad proteolítica, un 26% de las proteínas totales y un bajo rendimiento en actividad coagulante. En el caso

de eliminación de agua por hidratación de Sephadex G-25 se recuperó un 32% de la actividad proteolítica, un 27% de las proteínas totales y no se pudo recuperar la actividad coagulante de leche por este método.

4. Purificación cromatográfica

4.1. Estrategia 1: Cromatografía de afinidad

Se decidió comenzar la purificación de la preparación enzimática mediante despigmentación del extracto crudo como se describió en M&M, ítem 6.2 seguida de cromatografía de afinidad con pepstatina inmovilizada (M&M, ítem 12.1). De esta manera, al eliminar por lavado ácido las sustancias no ligadas se obtuvo una fracción proteica, sin actividad hemoglobinolítica ni actividad coagulante de leche. Durante la elución a pH 8,0 fueron recolectadas fracciones de 1 ml que contenían las proteínas con afinidad por pepstatina, pero no fue posible demostrar actividad proteolítica con Hb como sustrato ni actividad coagulante de leche.

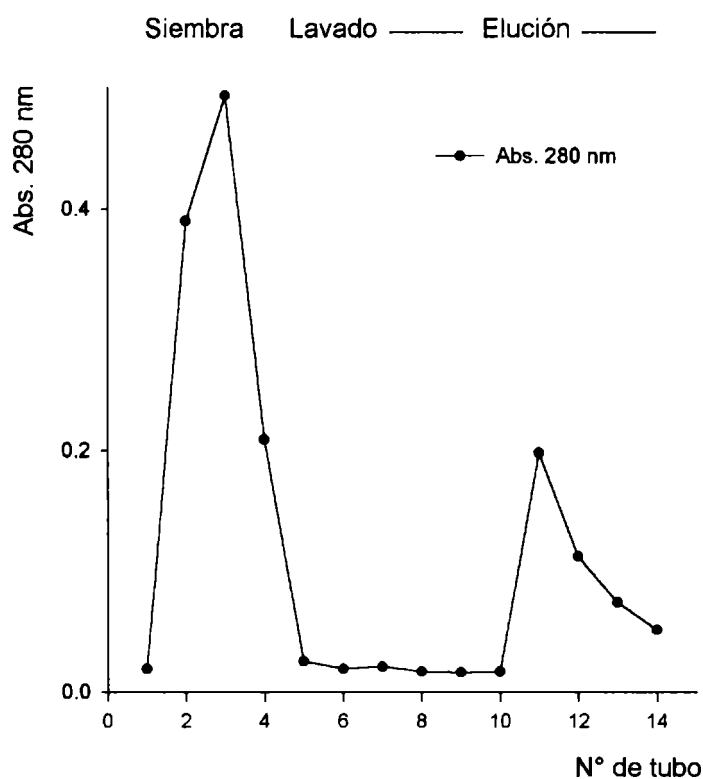


Figura 9. Cromatografía de afinidad

Los extractos de peptidasas aspárticas de plantas o fitepsinas en la mayoría de los casos contienen varias formas enzimáticas o intermediarios del procesamiento lo que complica su purificación por cromatografía de afinidad (Kervinen *et al.*, 2004). Las fitepsinas se expresan como zimógenos y luego se activan por procesamiento proteolítico desde el N-terminal (Simões & Faro, 2004). Por lo tanto es factible que se hayan aislado intermediarios del procesamiento de las peptidasas aspárticas presentes en la muestra y que el complejo formado entre la pepstatina y las peptidasas aspárticas activas no se haya disociado o se haya disociado muy poco en las condiciones de la corrida cromatográfica.

Para verificar la presencia de los mencionados precursores se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) de la fracción eluída (M&M, ítem 9.1). Como se puede apreciar en la Fig. 10 se aislaron polipéptidos de distinto peso molecular (84,0; 66,0; 60,0; 46,0; 40,0; 28,0; 22,0; 14,5 y 13,5 kDa).

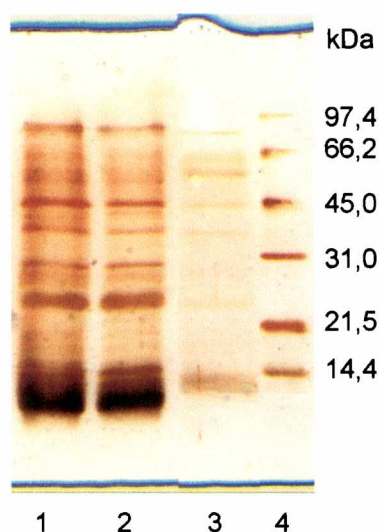


Figura 10. SDS-PAGE. Calle: extracto crudo, calle 2: extracto despigmentado, calle 3: fracción aislada por cromatografía de afinidad, calle 4: marcadores de peso molecular

En flores de *C. cardunculus* se ha identificado un precursor inactivo, la procardosina A, de 64 kDa que contiene el prosegmento y el inserto específico de plantas (PSI). El mecanismo de maduración propuesto (Verissimo *et al.*, 1996) implica la formación a partir de la procardosina A de dos polipéptidos de 35 y 30 kDa por ruptura de un enlace peptídico, una posterior separación del PSI del péptido de 30 kDa, generándose la subunidad de 15 kDa de la cardosina A madura y la posterior eliminación del prosegmento del polipéptido de 35 kDa,

originándose la otra subunidad (31 kDa) de la cardosina A madura. A partir de flores frescas de *Centaurea calcitrapa*, Domingos y colaboradores (1998) aislaron un precursor de cenprosina de 50 kDa que se autoprocresa a pH ácido dando dos polipéptidos de 43 y 21 kDa, la cenprosina madura consta de dos subunidades de 31 y 16 kDa.

4.2. Estrategia 2: Cromatografía de intercambio iónico por FPLC

Como ya hemos visto más arriba (ítem 1.2.1.5, Fig. 4) el extracto crudo de las flores de *S. marianum* (L.) Gaernt. presenta una cantidad importante de compuestos de naturaleza fenólica y pigmentos antocianidínicos. Estos elementos de bajo peso molecular pudieron ser eliminados utilizando una columna de exclusión molecular rellena con Sephadex G-25 como lo confirma el respectivo espectro UV-visible del extractivo parcialmente purificado (ítem 2.1.2, Fig. 6), por lo que a la hora de definir la estrategia de purificación empleando FPLC se seleccionó la exclusión molecular como primera etapa de purificación.

La segunda etapa se planificó en base al resultado obtenido en 1.2.1.3, donde se demostró que el extracto crudo presentaba una fracción con actividad proteolítica de pI ácido (Fig. 3), por lo que se utilizó cromatografía de intercambio aniónico.

4.2.1. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se llevó a cabo como se detalla en el ítem 12.2 de M&M. Como puede observarse en el perfil de elución obtenido (Fig. 11) en los primeros 30 ml se recolectaron dos fracciones proteicas (I y II). Los compuestos de naturaleza fenólica y los pigmentos de color fucsia eluyeron luego durante el lavado de la columna (no graficados) y fueron desechados.

La única fracción con actividad endopeptidásica sobre la insulina a pH 3,1 (ítem 14.1 de M&M) y sobre el péptido sintético MCA-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu-DNP (ítem 13.1 de M&M) fue la fracción I, que se purificó posteriormente por cromatografía de intercambio aniónico.

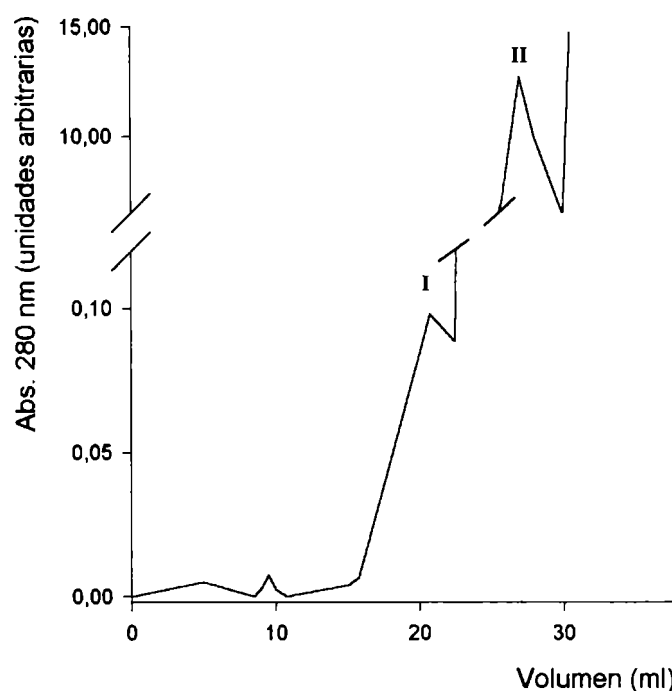


Figura 11. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular (Superdex S-200)

4.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico

En esta etapa de purificación se requirió de una técnica con alto poder resolutivo como es el intercambio iónico el que además permite concentrar las muestras sembrada, de gran utilidad luego de la etapa de exclusión molecular que se empleó previamente. En base al pI de la fracción activa obtenido por IEF y su respectivo zimograma (1.2.1.3) se seleccionó una columna rellena con Mono Q-Sepharose (M&M, ítem 12.3) y un pH de trabajo de 7,6 para lograr la purificación de la fracción activa.

La peptidasa que se encuentra en su forma aniónica al pH de la corrida quedó retenida en la columna. En la fracción no retenida se obtuvo un pico de proteína sin actividad proteolítica sobre insulina a pH 3,1. Mediante la posterior aplicación de un gradiente lineal de 0,0 a 0,5 M de NaCl se obtuvo una fracción proteica mayoritaria y dos fracciones menores (Fig. 12). Sólo la fracción I, que eluyó a 0,21 M de NaCl, mostró actividad proteolítica frente a insulina (M&M, ítem 14.1) y frente al péptido sintético flurogénico (M&M, ítem 13.1) Al regenerar la columna eluyeron otras dos fracciones proteicas (a y b) que no manifestaron

actividad endopeptidásica sobre los sustratos ensayados (M&M, ítems 13.1 y 14.1).

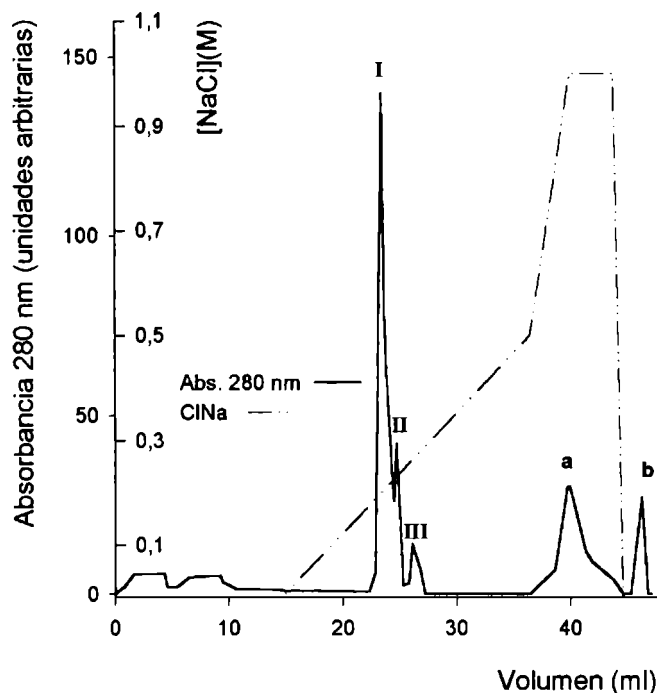


Figura 12. Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico (Mono Q Sepharose). Gradiente de NaCl 0,0 a 0,05 M.

La fracción I, que retuvo la actividad proteolítica, no resultó homogénea al ser analizada por SDS-PAGE (Fig. 13) según el protocolo del ítem 9.2 de M&M por lo que se decidió repetir la cromatografía de intercambio aniónico modificando el gradiente de NaCl por otro gradiente lineal más estrecho (0,0 a 0,4 M de NaCl) para mejorar la selectividad durante la desorción de la muestra.

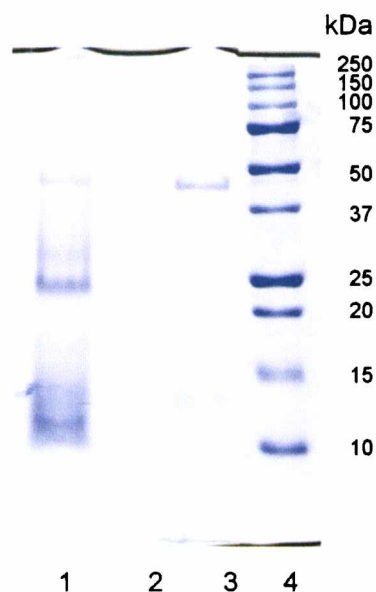


Figura 13. SDS-PAGE. Calle 1: extracto crudo, , calle 2: fracción I eluida de la columna de Superdex S200, calle 3: fracción I de la cromatografía de intercambio anónico, calle 4: marcadores de peso molecular

Al aplicar este nuevo gradiente de NaCl se obtuvieron 5 picos (Fig. 14): una fracción proteica mayoritaria, la fracción I, y 4 fracciones menores.

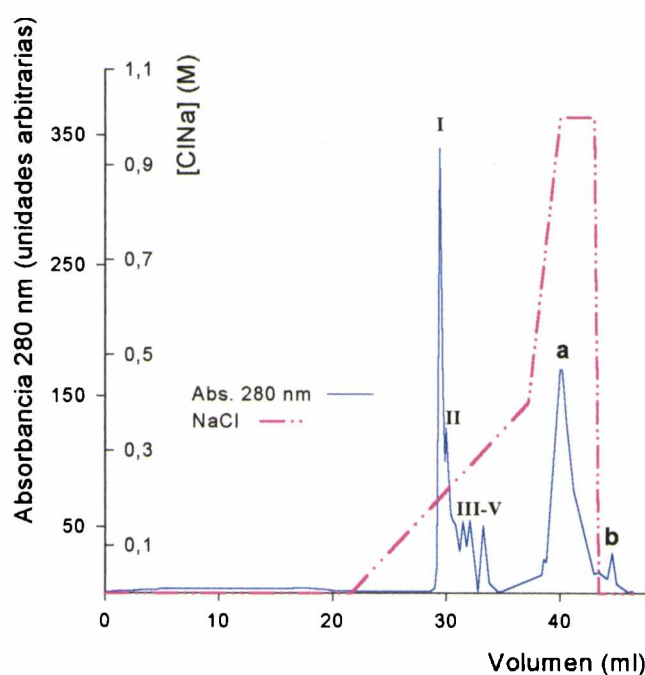


Figura 14. Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico (Mono Q Sepharose). Gradiente de NaCl 0,0 a 0,04 M.

Sólo la fracción I retuvo la actividad proteolítica al ensayarse su actividad por la hidrólisis de la cadena β oxidada de insulina y del péptido sintético fluorogénico MCA-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu-DNP.

Como resultado de esta estrategia de purificación, a partir de los extractos crudos de pH 3,0 de las flores de *S. marianum* (L.) Gaertn. se obtiene una única fracción con actividad proteolítica a la que denominamos silprosin. En la figura 15 se muestra el SDS-PAGE correspondiente a la fracción purificada en condiciones reductoras y no reductoras.

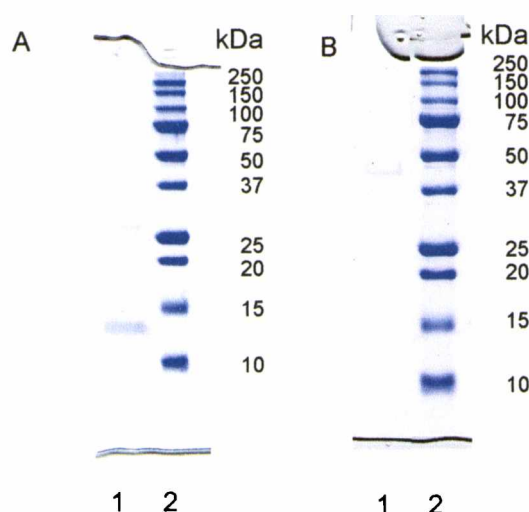


Figura 15. A SDS-PAGE en condiciones reductoras. B SDS-PAGE en condiciones no reductoras. En ambas electroforesis calles 1: enzima purificada, calles 2: marcadores de peso molecular.

Mediante SDS-PAGE realizada en condiciones no reductoras se obtuvo una única banda de peso molecular 44,7 kDa. En condiciones reductoras se obtuvieron dos bandas de pesos 29,3 y 12,5 kDa que sumadas tendrían un peso de 41,8 kDa, este peso está dentro del orden del obtenido en condiciones no reductoras. Este resultado es concordante con los pesos obtenidos para otras peptidasas aspárticas de flores de *Asteraceae*. Las tres cyprosinas son enzimas diméricas compuestas por una subunidad pequeña y otra mayor: 32,5 + 16,5 kDa, 33,5 + 16,5 kDa y 35,5 + 13,5 kDa, respectivamente (Heimgartner *et al.*, 1990). También cardosina A y cardosina B son proteínas diméricas con una subunidad mayor de 31,0 y 34,0 kDa respectivamente y una subunidad menor de 15,0 y 14,0 kDa respectivamente (Veríssimo *et al.*, 1996).

A partir de extractos ácidos de flores de especies relacionadas como *Cynara cardunculus* se han aislado dos peptidasas: cardosina A y B (Verísimo *et al.*, 1996), a partir de *Cynara humilis* sin embargo a sido aislada una única enzima

activa: *Cynara humilis* PA (Mendes *et al.*, 1999). En ambos casos los investigadores siguieron una estrategia de purificación que incluyó extracción a pH ácido, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio aniónico. Otros autores a partir de trituración con nitrógeno líquido de flores secas y extracción a pH 8,3 de *Cynara cardunculus* obtuvieron tres fracciones que denominaron ciproquinas 1, 2 y 3 (Heimgartner *et al.*, 1990, Cordeiro *et al.*, 1992) y que ha sido demostrado que difieren significativamente de las cardosinas A y B, sin embargo mientras que estas últimas provienen de genes diferentes se estima que las ciproquinas son formas diferentes de una misma enzima (Ramalho-Santos *et al.*, 1997). A partir de extractos ácidos de *Cynara scolymus* por despigmentación con carbón activado seguido de cromatografía de intercambio iónico Llorente y colaboradores (2004) obtuvieron 4 fracciones activas, en este caso aún no se ha estudiado si se trata de diferentes enzimas o de formas diversas de una misma enzima. Por aislamiento a partir de flores secas de *Centaurea calcitrapa* seguido de fraccionamiento con sulfato de amonio y 3 etapas cromatográficas (intercambio aniónico, interacción hidrofóbica y nuevamente intercambio aniónico) se obtuvieron cenproquina A y B (Domingos *et al.*, 1998).

4.2.3. Esquema de purificación

El esquema de purificación (Tabla 3) muestra que silproquina fue purificada con un rendimiento de 70% y un grado de purificación de 2,45 veces respecto a la fracción I de la cromatografía de exclusión molecular. El valor bajo de las veces de purificación se puede explicar por la alta proporción de peptidasa aspártica presente en las flores. Veríssimo y colaboradores (1995) han encontrado que las peptidasas aspárticas en las flores de *C. cardunculus* constituyen el 60% de las proteínas totales en los estigmas maduros.

| Muestra | Proteínas ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | Vol (ml) | Actividad endopeptidásica (U/ml) | Actividad específica (U/mg) | Veces de purificación | Rendimiento (%) |
|--|--|-------------|--|-----------------------------------|--------------------------|--------------------|
| Extracto crudo | ND | 8,0 | $4,0 \times 10^{-6}$ | ND | ND | ND |
| Fracción I (exclusión molecular) | 53 ± 3 | 25,0 | $2,6 \times 10^{-6}$ | $0,49 \times 10^{-7}$ | 1 | 100 |
| silprosina | 122 ± 4 | 3,1 | $14,6 \times 10^{-6}$ | $1,20 \times 10^{-7}$ | 2,45 | 70 |

ND: No se pudo determinar

Tabla 3. Purificación de los componentes proteolíticos presentes en las flores de *S. marianum* (L.) Gaertn.

El extracto crudo presentó menor actividad endopeptidásica total (volumen x actividad endopeptidásica) que la fracción purificada; la explicación de este hecho puede ser la presencia de sustancias interferentes que hayan producido el “quenching” de la fluorescencia o por la presencia de un inhibidor de peptidasas que pudiera haberse removido durante la exclusión molecular.

5. Caracterización de silprosina

5.1. Hidrólisis de la cadena β oxidada de insulina por silprosina

5.1.1. Efecto del pH

Para evaluar el efecto del pH sobre la degradación de la cadena β oxidada de insulina por silprosina se realizaron digestiones a pH 3,1 y a pH 6,0 como se describe en M&M, ítem 14.1.

La Fig. 16 muestra los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC correspondientes a los hidrolizados de la cadena β oxidada de insulina; en la parte 1 de la figura se observa la presencia de un pico (a) correspondiente a la cadena β de insulina en ausencia de enzima (blanco de reactivos).

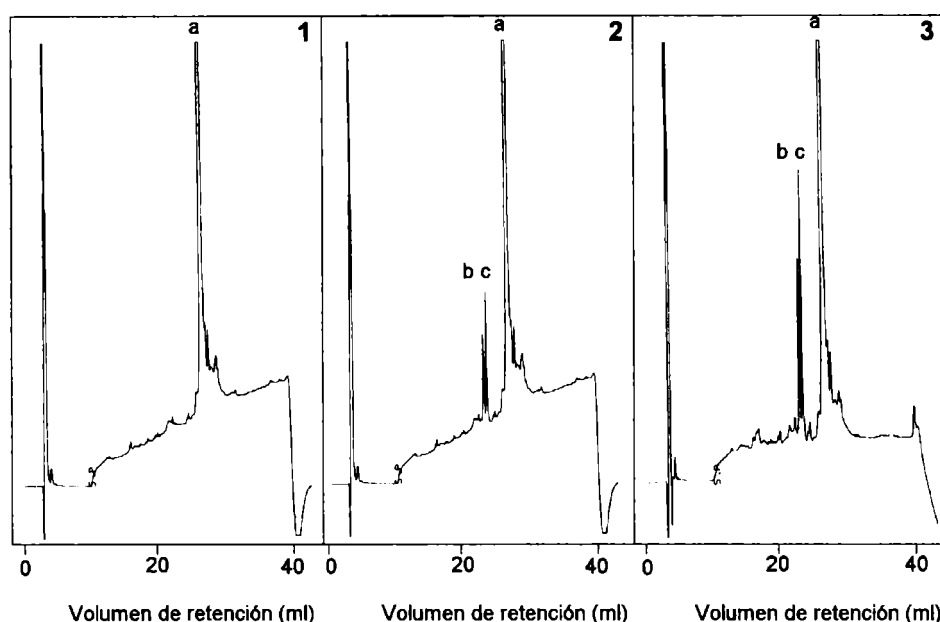


Figura 16. Degradación de la cadena β oxidada de insulina a pH 3,1. 1, 2 y 3 corresponden a los hidrolizados durante 0, 1 y 3 horas, respectivamente.

Luego de la hidrólisis de la cadena β de insulina durante 1 hora a pH 3,1 se formaron dos péptidos que se visualizan en el cromatograma de la Fig. 16 parte 2 como los picos b y c. Estos dos péptidos se formaron a partir de la ruptura de un único enlace de la cadena polipeptídica, es decir un segmento corresponde al lado amino del enlace hidrolizado y el otro péptido corresponde al lado carboxílico; por su parte, el pico mayoritario a, más hidrofóbico que los dos anteriores, corresponde a la cadena β oxidada de insulina que no ha sido hidrolizada. Al comparar los cromatogramas de 1 y 3 horas (Fig. 16 partes 2 y 3) se observa que la altura de los picos b y c aumenta al progresar la hidrólisis por incremento del tiempo de incubación.

En cuanto a los cromatogramas originados por hidrólisis a pH 6,0 (Fig. 17 partes 2 y 3), se observan siete picos mayoritarios y otros minoritarios todos menos hidrofóbicos que la cadena β oxidada de la insulina (pico a). En este caso también se observa como la altura de los picos aumenta al prolongarse el tiempo de hidrólisis de 1 a 3 horas.

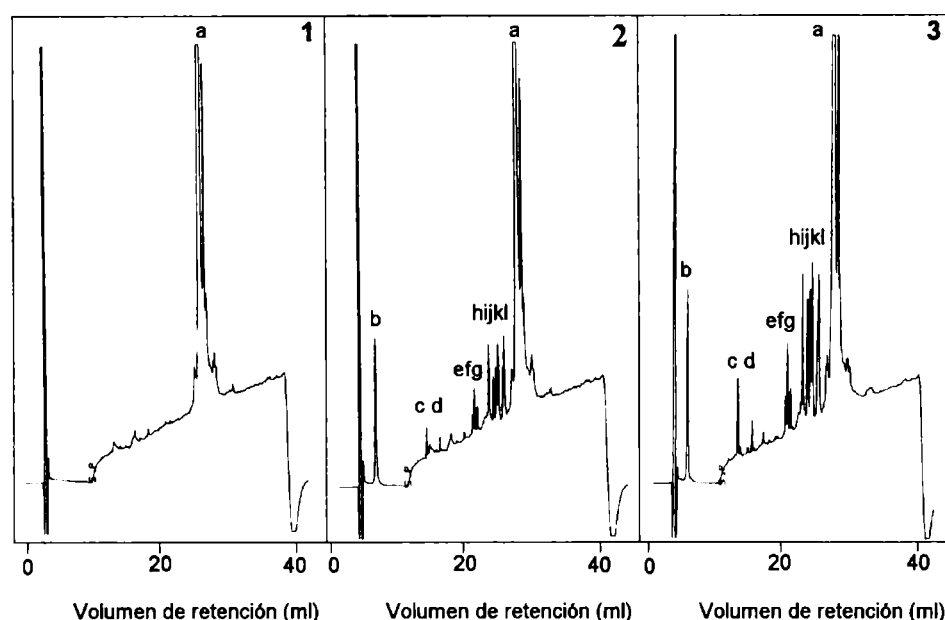


Figura 17. Degradación de la cadena β oxidada de insulina a pH 6,0. 1, 2 y 3 corresponden a los hidrolizados durante 0, 1 y 3 horas, respectivamente.

La hidrólisis a pH 6,0, a diferencia de la realizada a pH 3,0, resultó ser más inespecífica, es decir a este pH la enzima es capaz de hidrolizar la cadena β de insulina en varios sitios distintos mientras que al pH más ácido hidrolizó un único enlace en el tiempo de reacción ensayado.

La especificidad de clivaje por enlaces escindibles en la cadena β de insulina de peptidasas aspárticas típicas como: pepsina A, gastricina, cathepsina D y rhizopuspepsina ha mostrado diferencias significativas entre pH 2,0 y los pH 5,5 y 6,5 (Athauda & Takahashi, 2002). En el caso de la cathepsina E, una peptidasa aspártica humana, la cadena β oxidada de insulina es rápida y extensamente clivada a pH 3,0; 5,5 y considerablemente a pH 7,4 los cromatogramas son significativamente diferentes a los 3 valores de pH, con algunos enlaces hidrolizados específicamente a pH 7,4 (Athauda *et al.*, 1991). En las peptidasas aspárticas las diferencias en especificidad y, en consecuencia, en actividad a diferentes valores de pH dependen de las cadenas laterales de los aminoácidos que forman los subsitios de la hendidura catalítica (Dunn *et al.*, 1986).

Cada enzima tiene un pH óptimo, en el que puede mostrar su máxima actividad catalítica *in vitro* aunque ese valor de pH no siempre será el óptimo *in vivo*; además la especificidad de sustrato aparente podría cambiar a diferentes valores de pH, lo que puede tener importancia fisiológica (Athauda & Takahashi, 2002).

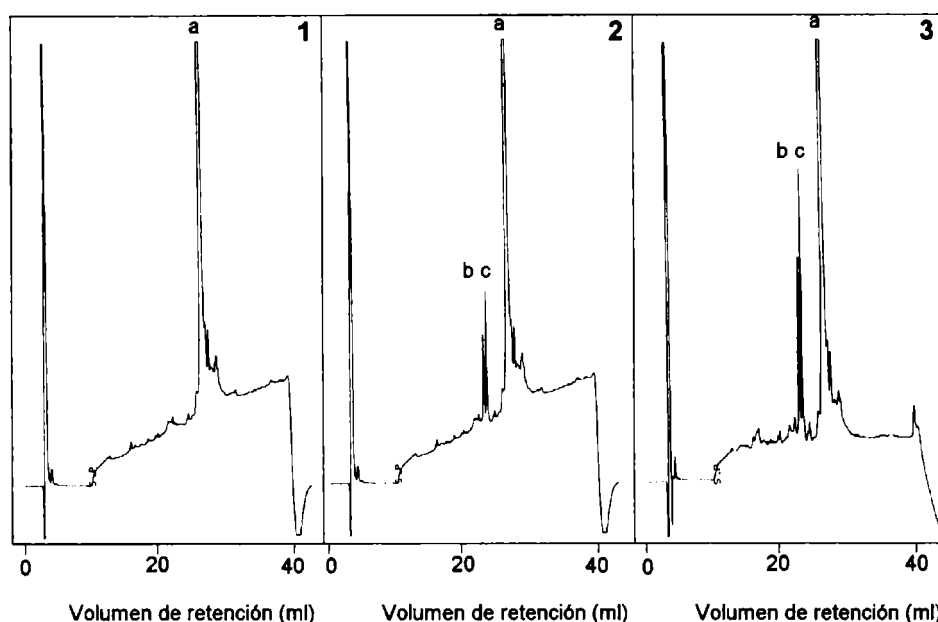


Figura 16. Degradación de la cadena β oxidada de insulina a pH 3,1. 1, 2 y 3 corresponden a los hidrolizados durante 0, 1 y 3 horas, respectivamente.

Luego de la hidrólisis de la cadena β de insulina durante 1 hora a pH 3,1 se formaron dos péptidos que se visualizan en el cromatograma de la Fig. 16 parte 2 como los picos b y c. Estos dos péptidos se formaron a partir de la ruptura de un único enlace de la cadena polipeptídica, es decir un segmento corresponde al lado amino del enlace hidrolizado y el otro péptido corresponde al lado carboxílico; por su parte, el pico mayoritario a, más hidrofóbico que los dos anteriores, corresponde a la cadena β oxidada de insulina que no ha sido hidrolizada. Al comparar los cromatogramas de 1 y 3 horas (Fig. 16 partes 2 y 3) se observa que la altura de los picos b y c aumenta al progresar la hidrólisis por incremento del tiempo de incubación.

En cuanto a los cromatogramas originados por hidrólisis a pH 6,0 (Fig. 17 partes 2 y 3), se observan siete picos mayoritarios y otros minoritarios todos menos hidrofóbicos que la cadena β oxidada de la insulina (pico a). En este caso también se observa como la altura de los picos aumenta al prolongarse el tiempo de hidrólisis de 1 a 3 horas.

5.1.2. Efecto de inhibidores específicos de grupo

Con el fin de corroborar el mecanismo catalítico propuesto (aspártico) se hidrolizó la cadena β oxidada de insulina con la enzima previamente incubada con inhibidores específicos de grupo: E-64, EDTA, pepstatina A y PMSF y luego se desarrolló la hidrólisis durante 1 h a pH 3,1 (M&M, ítem 15).

En la Fig. 18 se muestran los cromatogramas obtenidos para la insulina en ausencia (Fig. 18 parte 1) y presencia (Fig. 18 parte 2) de los inhibidores, y el cromatograma de los inhibidores disueltos en el buffer de reacción (Fig. 18 parte 3). En la Fig. 18 el pico (a) corresponde a la cadena β oxidada de la insulina y el pico (b) corresponde al PMSF; los demás inhibidores no se detectan en este tipo de cromatografía.

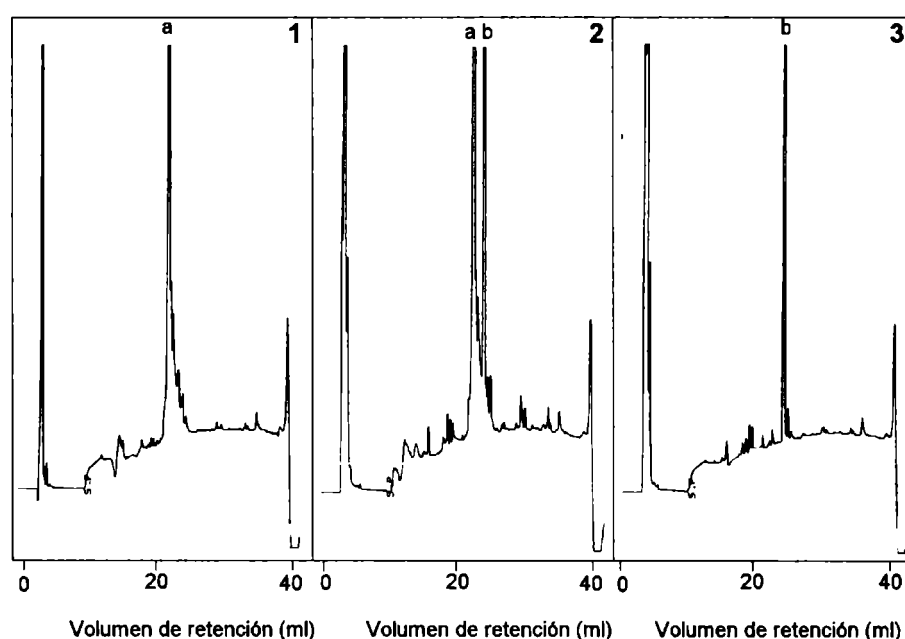


Figura 18. Cromatogramas a pH 3,1. **1:** de la cadena β oxidada de la insulina; **2:** del mismo polipéptido en presencia de inhibidores de la actividad peptidásica (E-64, EDTA, pepstatina A y PMSF). **3:** de los inhibidores de la actividad peptidásica (E-64, EDTA, pepstatina A y PMSF).

En la Fig. 19 se observan los cromatogramas de los productos de hidrólisis de la cadena β oxidada de insulina por silprosinina luego de ser preincubada durante 15 minutos con inhibidores específicos de cada uno de los tipos catalíticos de endopeptidasas. Como puede observarse en las figuras los pretratamientos con E-64 (Fig. 19 parte 2), EDTA (Fig. 19 parte 3) y PMSF (Fig. 19 parte 5) no produjeron inhibición de la enzima.

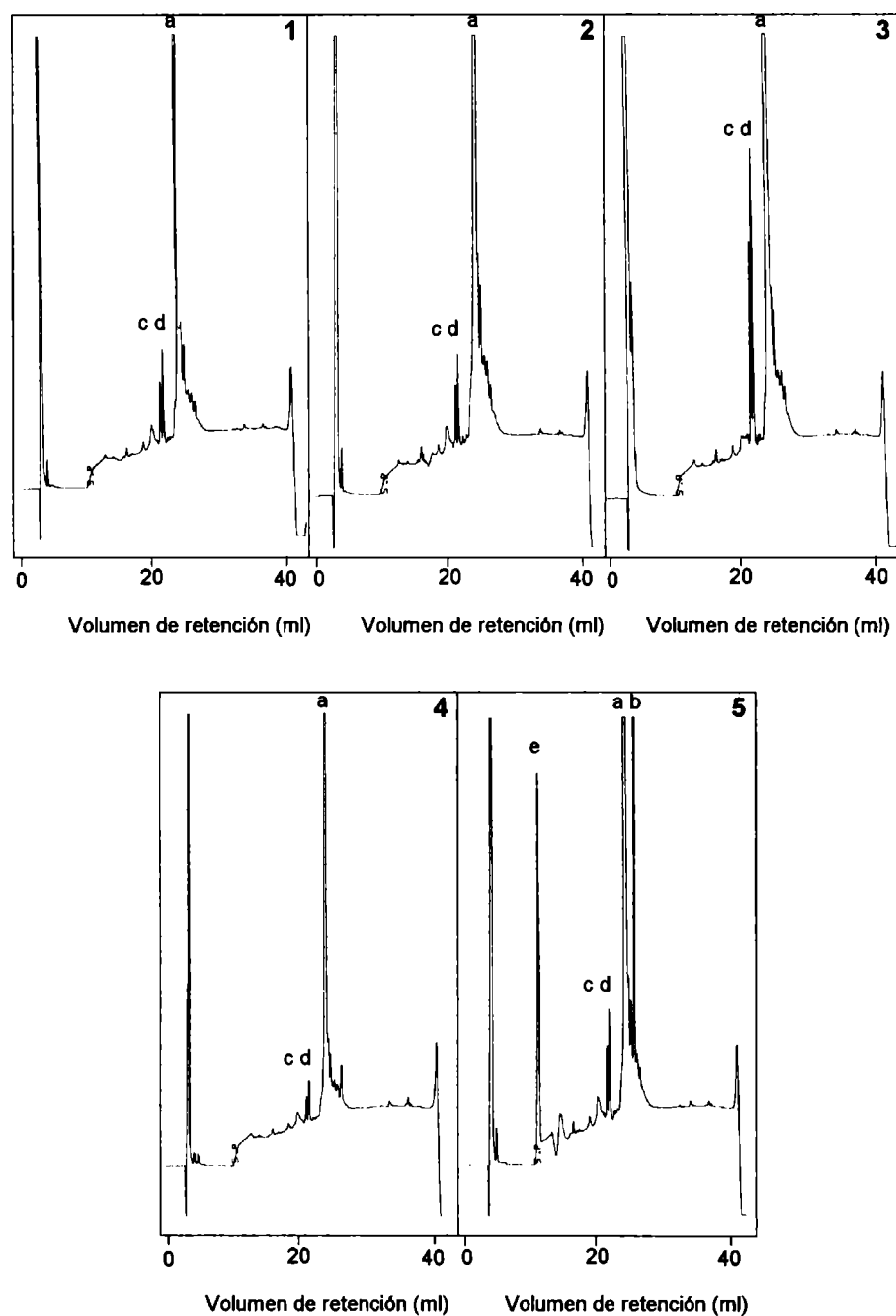


Figura 19. Cromatogramas de la cadena β oxidada de insulina hidrolizada por silprosin durante 1 hora a pH 3,1. 1. enzima sin inhibidor; 2. enzima preincubada con E-64; 3. enzima preincubada con EDTA; 4. enzima preincubada con pepstatina A y 5. enzima preincubada con PMSF.

Mediante la determinación de la secuencia se verificó que el pico (e) del cromatograma correspondiente a la inhibición con PMSF no es un polipéptido, el mismo pico fue observado por Simões (datos no publicados) en la degradación de la cadena β de insulina por cardosina A al ser inhibida por PMSF.

En la Fig. 19 parte 3 se observa que el EDTA no sólo no produjo inhibición sino que activó notoriamente la enzima (alrededor de 3 veces) como se deduce de la altura de los picos c y d cuando se los compara con el control (Fig. 19 parte 1). Este fenómeno podría explicarse por la complejación de algún ión divalente presente en la preparación de insulina que afecte la actividad enzimática (según el fabricante el polvo de cadena β oxidada de insulina contiene un mínimo de 80% de este producto).

Por su parte, la enzima preincubada con pepstatina A (Fig. 19 parte 4) produjo un 50% de inhibición en las condiciones del ensayo.

Para confirmar la inhibición por pepstatina A de la enzima purificada el ensayo se repitió incrementando el tiempo de incubación de la enzima con el inhibidor (40 min) y realizando la hidrólisis durante 3 horas (M&M, ítem 15). Los resultados se muestran en la Fig. 20.

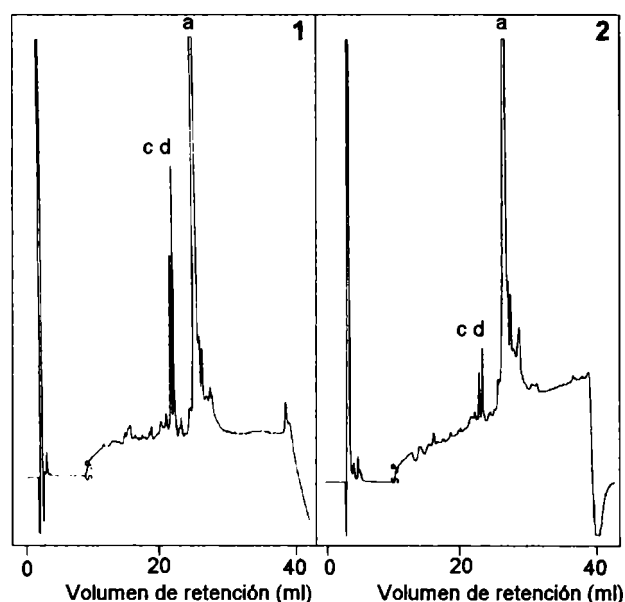


Figura 20. Cromatograma de la cadena β oxidada de insulina hidrolizada por silprosin durante 3 horas a pH 3,1. 1: enzima sin tratamiento previo; 2: enzima preincubada durante 40 minutos con pepstatina A.

En las condiciones de este último ensayo la inhibición fue del 74 %, con lo que queda fehacientemente demostrado el mecanismo aspártico para silprosin purificada.

5.1.3. Identificación por secuenciación automática de los enlaces peptídicos hidrolizados

Con el fin de establecer la especificidad de corte de silprosina se analizó la secuencia N-terminal mediante la degradación de Edman de los péptidos separados en las cromatografías en fase reversa.

En la Fig. 21 se muestra la secuencia de la cadena β oxidada de la insulina escrita con los símbolos de los aminoácidos en los códigos de 1 y de 3 letras.

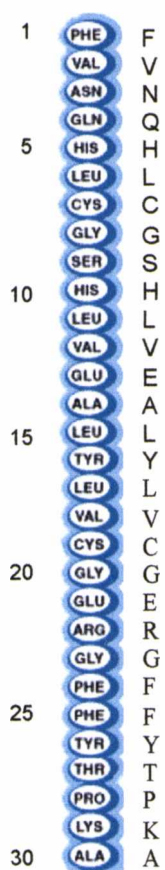


Figura 21. Cadena β oxidada de insulina bovina

Las fracciones resultantes de la digestión de este polipéptido (picos b y c) luego de una incubación de 1 h, 3 h y 6 h (Fig. 22 partes 2, 3 y 4, respectivamente) presentaron las siguientes secuencias correspondientes al extremo N-terminal:

pico b: LV-GERGFFY-

pico c: FVNQHL-GSHLVEALY

A partir del análisis de estas secuencias se puede deducir que el primer enlace de la cadena β de insulina hidrolizado por silprosin es Tyr16-Leu17, por lo que el pico b corresponde al extremo C y el pico c al extremo N.

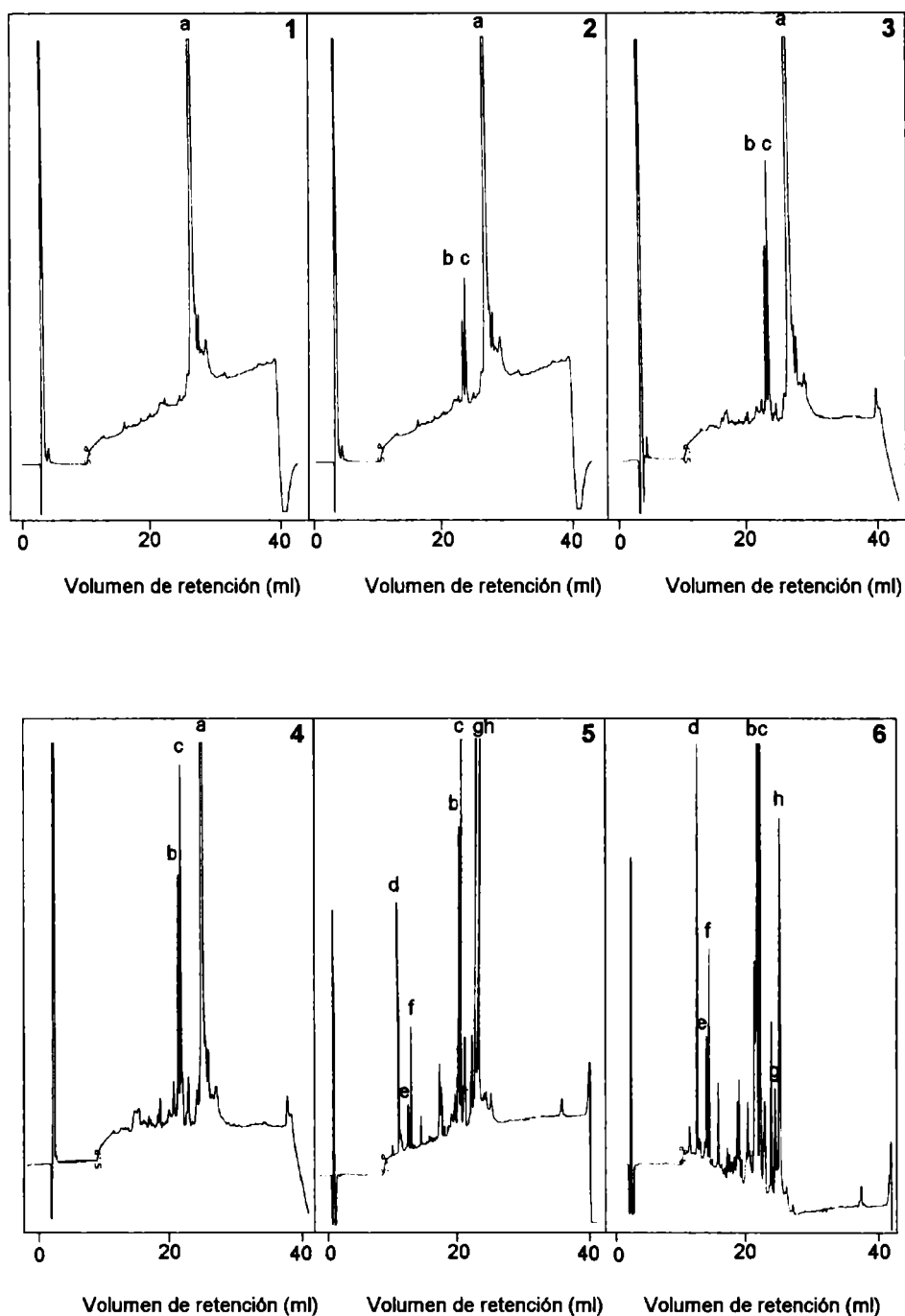


Figura 22. Degradación de la cadena β oxidada de insulina a pH 3,1. 1, 2, 3, 4, 5, 6 corresponden a los hidrolizados durante 0, 1, 3, 6, 12 y 18 horas, respectivamente.

Cuando la incubación fue de 12 y 18 horas (Fig. 12 partes 5 y 6 respectivamente) la hidrólisis generó nuevos polipéptidos, de los cuales fueron secuenciados los N-terminales de los picos d, e, f, g y h. Las secuencias obtenidas para estas fracciones fueron las siguientes:

pico d: PKA---

pico e: FVNQHL

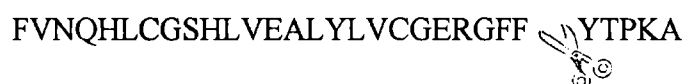
pico f: YTPKA--

pico g: FVNQH

pico h: FVNQH

Considerando el tiempo de retención y la secuencia N-terminal el pico g o el pico h corresponden a la cadena β de insulina intacta remanente, ambos picos disminuyen su altura al pasar de 12 a 18 horas de incubación como consecuencia de la hidrólisis. Por otra parte, del análisis de estas secuencias se puede deducir que otro enlace hidrolizado por silprosinas es Phe25-Tyr26. También resultó hidrolizado el enlace Thr27-Pro28, sin embargo este enlace sufre hidrólisis no enzimática como consecuencia de una larga exposición a pH ácido (Piskiewicz *et al.*, 1970).

En base a estos resultados se puede proponer el siguiente modelo de corte de la cadena β de insulina:



Tanto el enlace Tyr16-Leu17 como Phe25-Tyr26 son enlaces en los que están involucrados residuos hidrofóbicos.

Todas las enzimas aspárticas parecen tener una hendidura extendida en el sitio activo que puede acomodar al menos siete aminoácidos del sustrato: S_4-S_3' , según la nomenclatura de Schechter y Berger. El clivaje del polipéptido ocurre entre residuos hidrofóbicos ubicados en los sitios S_1-S_1' , sin embargo los sitios de unión secundarios tienen grandes efectos en la eficiencia catalítica de estas enzimas (Dunn *et al.*, 1986).

Con pequeñas variaciones de especificidad entre las distintas enzimas (Tabla 4), las peptidasas aspárticas de plantas también muestran preferencia por aquellos

5.2. Hidrólisis del péptido sintético MCA-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu-DNP

5.2.1. Perfil de pH de silprosinina

La actividad endopeptidásica de silprosinina se determinó sobre el derivado fluorogénico del péptido sintético Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu (M&M, ítem 13.2) en presencia de buffers de distintos valores de pH (entre 3,5 y 7,6). Como puede apreciarse en la Fig. 22 la actividad fue máxima alrededor de pH 5,6. Con este sustrato no mostró actividad a valores de pH menores a 4,0. A pH 7,6 la enzima presentó más del 50% de la actividad con respecto al pH óptimo, siendo este valor de actividad mucho más alto de lo esperado para una peptidasa de este tipo.

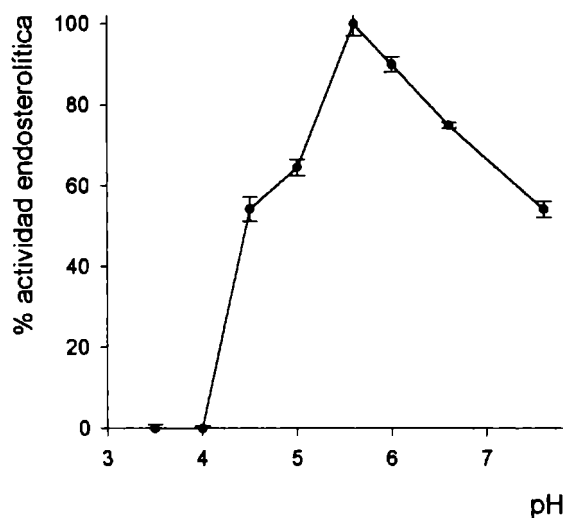


Figura 23. Actividad endopeptidásica sobre el derivado fluorogénico del péptido sintético KPAEFFAL determinada a distintos valores de pH

Pohl & Dunn (1988) reportaron la dependencia de los parámetros cinéticos de pepsina para varios derivados del péptido Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu, dichos péptidos se obtuvieron cambiando en cada caso un residuo no involucrado en el enlace escindible por el aminoácido Lys. Con varios de estos sustratos pepsina presentó una dependencia dramática con el pH, siendo la unión y el clivaje de algunos de ellos más favorable a valores altos de pH. Este efecto

proviene de interacciones específicas dentro de los subsitios de la enzima, aunque también pueden tener importancia fenómenos de atracción electrostática (Dunn & Hung, 2000).

Las fitepsinas de cebada (*H. vulgare*) muestran la máxima actividad sobre el sustrato cromofórico Pro-Thr-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu entre pH 3,5 y 4,1 (Kervinen *et al.*, 1993). Nepenthensina, la PA aislada de plantas carnívoras del género *Nepenthes*, tiene un pH óptimo entre 2,0 y 3,0 para distintos sustratos proteicos. Enzimas aspárticas de especies relacionadas a *Silybum marianum*, como las mencionadas cardosina A y cardosina B de *C. cardunculus* son activas entre pH 2 y 7 sobre los péptidos sintéticos cromogénicos Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu y Leu-Ser-Phe(NO₂)-Ahx-Ala-Leu-OMe, con un pH óptimo algo más alto (alrededor de pH 5,0) que el de otras peptidasas aspárticas (Veríssimo *et al.*, 1996).

5.2.2. Estabilidad a la temperatura

La enzima al ser incubada durante 15 minutos a 20 °C retuvo un 94,7% de actividad endosterolítica con derivado fluorogénico del péptido sintético Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu (M&M, ítem 13.3). Mientras que luego de dos horas de incubación a la misma temperatura la actividad residual fue de 51,4%. Esta relativamente baja estabilidad a la temperatura contrasta con aquella mostrada por las cardosinas A y B que son estables aún a 60 °C (Veríssimo *et al.*, 1996).

5.2.3. Determinación de parámetros cinéticos

Para la determinación de los parámetros cinéticos se usó el protocolo descrito en el ítem 13.5 de M & M. El sustrato fue el péptido sintético MCA-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu-DNP que también ha sido utilizado por otros autores para determinar los parámetros cinéticos de otras peptidasas de *Asteraceae* (Veríssimo *et al.*, 1996). Se asumió que la cinética sigue el mecanismo del estado estacionario propuesto por Haldane y la determinación de estos parámetros cinéticos, K_m y V_{max} , se realizó con el módulo de cinética enzimática del programa Sigma Plot que ajusta la curva mediante iteraciones sucesivas. En la Fig. 24 se muestra sólo a modo de ejemplo el gráfico Lineweaver-Burk.

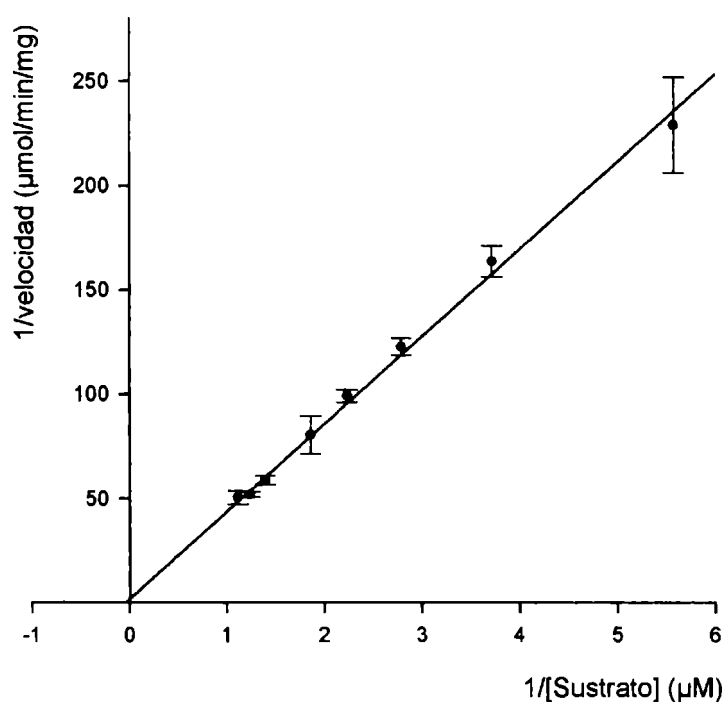


Figura 24. Gráfico Lineweaver-Burk para la determinación de parámetros cinéticos con el derivado fluorogénico del péptido sintético KPAEFFAL

Se obtuvieron los siguientes valores: K_m 25,4 μM , $V_{\text{máx}}$ 0,6044 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mg de enzima, los resultados obtenidos se ajustaron a la cinética de Michaelis con 21 grados de libertad y un coeficiente de correlación al cuadrado de 0,96.

Para el mismo péptido sintético (en la forma de sustrato cromofórico) los valores de K_m para cardosina A y cardosina B fueron 108 μM y 110 μM respectivamente (Veríssimo *et al.*, 1996), alrededor de 4 veces mayores que el obtenido para silprosin. Cordeiro *et al.* (1998b) usaron 4 octapéptidos cromofóricos para realizar estas determinaciones cinéticas con cipsosina 3 α , β y γ , obteniendo los menores valores de K_m (entre 15 y 25 μM) empleando el sustrato Lys-Pro-Ile-Val-Phe-Nph-Arg-Leu y los mayores con el sustrato Lys-Ser-Ala-Lys-Phe-Nph-Arg-Leu (entre 220 y 280 μM).

Referencias

- Amerik, A. Y. & M. Hochstrasser (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1695**: 189-207
- Anderson, J. W. (1968) Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* **7**: 1973-1988
- Anson, I. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* **22**: 79-89
- Ariza Espinar, L. & Delucchi, G. (1998) Flora Fanerogámica Argentina. Fascículo 60. 280. Asteraceae, parte 11 Tribu XI. Carduae. Programa PROFLOTA CONICET
- Athauda, S. & K. Takahashi (2002) Cleavage specificities of aspartic proteinases toward oxidized insulin β chain at different pH values. *Protein and Peptide Letters* **9**: 289-294
- Athauda, S. B. P., T. Takahashi, H. Inoue, M. Ichinose & K. Takahashi (1991) Proteolytic activity and cleavage specificity of cathepsin E at the physiological pH as examined towards the B chain of oxidized insulin. *FEBS Letters* **292**: 53-56
- Barbosa, M., C. Corradini & B. Battistotti (1981) Cheese-making experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* **32**: 203-221
- Barrett, A. (1999) Peptidases: a view of classification and nomenclature. En: *Proteases. New perspectives. Molecular and Cell Biology Updates* (V. Turk, ed.) Basel: Birkhäuser Verlag, pp. 1-12
- Barrett, A. (2001) Proteolytic enzymes: Nomenclature and classification. En: *Proteolytic enzymes. A Practical approach*, 2^{da} edn. (R. Beynon & J. S. Bond, eds.) Oxford: Oxford University Press, pp. 1-21
- Barrett, A., N. Rawlings & J. Woessner (2004a) Introduction. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.). London: Academic Press, pp. XXXIII-XXXV
- Barrett, A., N. Rawlings & J. Woessner (2004b) Metallo-peptidases. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.). London: Academic Press, p. 231
- Bradford, M.B. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 528-530
- Cabral, J. M. S., P. Fevereiro, J. M. Novais & M. S. Pais (1984) Comparison of immobilization methods for plant cells and protoplasts. *Annals of the New York Academy of Science* **403**: 501-503
- Cordeiro, M., Z-T Xue, M. S. Pais & P. E. Brodelius (1991) Proteases from cell suspension cultures of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry* **33**: 1323-1326
- Cordeiro, M., E. Jakob, Z. Puhán, M. S. Pais & P. E. Brodelius (1992) Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus* –a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft (Milk Science International)* **47**: 683-687
- Cordeiro, M., M. S. Pais & P. E. Brodelius (1994a) Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum* **92**: 645-653
- Cordeiro, M., Z-T Xue, M. Pietrzak, M. S. Pais & P. E. Brodelius (1994b) Isolation and characterization of a cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant Molecular Biology* **24**: 733-741

- Cordeiro, M., M. S. Pais & P. E. Brodelius (1998a). Cyprosin. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.). London: Academic Press, pp. 839-842
- Cordeiro, M., T. Lowther, B. Dunn, K. Guruprasad, T. Blundell, M. S. Pais & P. E. Brodelius (1998b) Substrate specificity and molecular modelling of aspartic proteinases (cyprosin) from flowers of *Cynara cardunculus* subsp. *flavescens* cv. cardoon. In: *Aspartic Proteinases* (M. James, ed) New York: Plenum Press, pp. 473-479
- Domingos A., Z.-T. Xue, K. Guruprasad, A. Clemente, T. Blundell, M. S. Pais & P. E. Brodelius, (1998) An aspartic proteinase from flowers of *Centaurea calcitrapa*. Purification, characterization, molecular cloning, and modelling of its tree-dimensional structure. In: *Aspartic Proteinases* (M. James, ed) New York: Plenum Press, pp. 465-472
- Domingos A., P. C. Cardoso, Z.-T. Xue, A. Clemente, P. E. Brodelius, M. S. Pais (2000) Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry* **267**: 6824-6831.
- Dunn, B. (2001) Determination of protease mechanism. En: *Proteolytic enzymes. A Practical Approach*, 2^{da} edn. (R. Beynon & J. S. Bond, eds.) Oxford: Oxford University Press, pp. 77-104
- Dunn, B. (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews* **102**: 4431-4458
- Dunn, B. M., M. Jimenez, B. F. Parten, M. Valler, C. Rolph & J. Kay (1986) A systematic series of synthetic chromoforic substrates for aspartic proteinases. *Biochemical Journal* **237**: 899-906
- Dunn, B. M. & S-H Hung (2000) The two sides of enzyme-substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**: 231-240
- Egas, C., N. Lavoura, R. Resende, R. M. Brito, E. Pires, M. C. Pedroso de Lima & C. Faro (2000) The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 38190-38196
- Esteves, C. L. (1995) Estudo comparativo das características bioquímicas dos coalhos de *Cynara cardunculus* L., *Cynara scolymus* L. e *Cynara humilis* L. Tesis de Maestría en Biología Celular, Universidad de Coimbra.
- Esteves, C. L., J. A. Lucey, T. Wang & E. Pires (2003) Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *Journal of Dairy Science* **86**: 2558-2567
- Faro, C. J., A. J. G. Moir & E. V. Pires (1992) Specificity of a milk clotting enzyme extracted from the thistle *Cynara cardunculus* L.: action on oxidised insulin and κ -casein. *Biotechnology Letters* **14**: 841-846.
- Faro, C., P. Verissimo, Y. Lin, J. Tang & E. Pires (1995) Cardosin A and cardosin B, aspartic proteases from the flowers of cardoon. En: *Aspartic proteinases: structure, function, biology, and biomedical implications* (K. Takahashi, ed.) New York: Plenum Press, pp. 373-377
- Faro, C., M. Ramalho-Santos, M. Vieira, A. Mendes, I. Simões, R. Andrade, P. Verissimo, X. Lin, J. Tang & E. Pires (1999) Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 28724-28729
- Fernandez-Salguero J., F. Prados, F. Calixto, M. Vioque, P. Sampaio & L. Tejada (2003) Use of recombinant cyprosin in the manufacture of ewe's milk cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **51**: 7426-7430
- Fevereiro, P. J. M. S. Cabral, M. M. Fonseca, J. M. Novais & M. S. Pais (1986) Callus and suspension culture of *Silybum marianum*. Biosynthesis of proteins with milk clotting activity. *Biotechnology Letters* **8**: 19-24

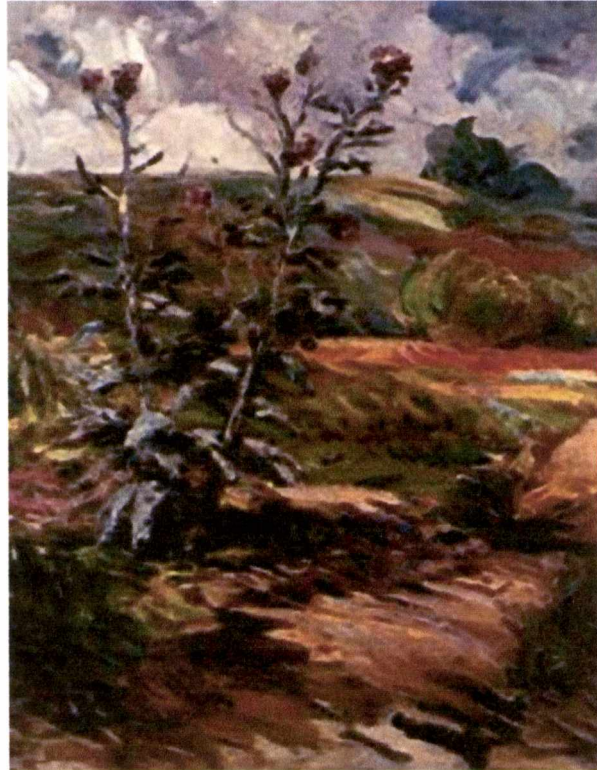
- Foltmann, B. & P. B. Szecsi (2004) Chymosin. En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 29-32
- Frazão, C., I. Bento, J. Costa, C. M. Soares, P. Veríssimo, C. Faro, E. Pires, J. Cooper & M. A. Carrondo (1999) Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 27694-27701
- Gáborik, Z. & L. Hunyady (2004) Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **15**: 286-293
- Giles, N., G. Giles & C. Jacob (2003) Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300**: 1-4
- Green, D. P. L. (1984) Are prohormones converted to hormones during secretion? *Medical Hypotheses* **15**: 47-59
- Hames, D. (1996) One-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. En: *Gel electrophoresis of proteins*, 2^{da} edn. (B. Hames & D. Rickwood, eds.) Oxford: Oxford University Press, pp. 1-147
- Hedstrom, L. (2002a) Introduction: Proteases. *Chemical Reviews* **102**: 4430
- Hedstrom, L. (2002b) Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews* **102**: 4501-4523
- Heimgartner, U., M. Pietrzak, R. Geertsen, P. Brodelius, A. C. da Silva Figueiredo & M. S. Pais (1990) Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry* **29**: 1405-1410
- Holz, R., K. P. Bzymek & S. Swierczek (2003) Co-catalytic metalloproteinases as pharmaceutical targets. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**: 197-206
- James, M. N. (2004) Catalytic pathway of aspartic peptidases. En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 12-19
- Kervinen, J., P. Sarkkinen, N. Kalkkinen, L. Mikola & M. Saarna (1993) Hydrolytic specificity of barley grain aspartic proteinase. *Phytochemistry* **32**: 799-803
- Kervinen, J., K. Törmäkangas, P. Runeberg-Roos, K. Guruprasad, T. Blundell & T. H. Teeri (1995) Structure and possible function of aspartic proteinases in barley and other plants. En: *Aspartic proteinases: structure, function, biology and biomedical implications* (K. Takahashi, ed.) New York: Plenum Press, pp. 421-254
- Kervinen, J., G. J. Tobin, J. Costa, D. S. Waugh, A. Wlodawer, & A. Zdanov (1999) Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. *The EMBO Journal* **18**: 3947-3955.
- Kervinen, J., A. Wlodawer & A. Zdanov (2004) Phytepsin. En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 77-8
- Laemli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lively, M. O. & C. M. Ashwell (1999) Signal peptidases. En: *Proteases. New perspectives. Molecular and Cell Biology Updates* (V. Turk, ed.) Basel: Birkhäuser Verlag, pp. 35-43
- Llorente, B., C. Brutti, C. Cimino, S. Vairo Cavalli, C. Natalucci & N. Caffini (1999) Presence of milk clotting proteinases in *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe (*Asteraceae*). *Acta Horticulturae* **501**: 249-257

- Llorente, B., C. Brutti & N. O. Caffini (2004) Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 8182-8189
- Lourenço, P., S. de Castro, T. Martins, A. Clemente y A. Domingos (2002) Growth and the proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 242-249
- Marzocca (1957) *Silybum marianum* (L.) Gaertn. En: *Manual de Malezas*. Buenos Aires: Imprenta y Casa Editora Coni, 435-437
- Mc Donald, J. (1985) An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Histochemical Journal* **17**: 773-785
- Mendes, A., A. Pereira, P. Verissimo, E. Pires & C. Faro (1999) Cloning, expression and characterization of recombinant *Cynara humilis* L. aspartic proteinase. *VIII International Aspartic Proteinase Conference*. Madeira, Portugal
- Mutlu, A. & S. Gal (1999) Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to function. *Physiologia Plantarum* **105**: 569-576
- Peterson, G. L. (1979) Review of the Folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* **100**: 201-220
- Pires, E. (1998) Cardosin A. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.). London: Academic Press, pp. 843-844
- Pohl, J. & B. M. Dunn (1988) Secondary enzyme-substrate interactions use of kinetics evidence for ionic interaction between substrate side chains and the pepsin active site. *Biochemistry* **27**: 4827-4834
- Polgár, L. (2004a) Catalytic mechanism of cystein peptidases. En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 1072-1078
- Polgár, L. (2004b) Catalytic mechanism of serine and treonine peptidases. En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 1440-1448
- Powers, J. C., J. L. Asgjan, O. D. Ekici & K. E. James (2002) Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical Reviews* **102**: 4639-4750.
- Ramalho Santos, M., J. Pisarra, P. Verissimo, S. Pereira, R. Pereira, E. Pires & C. Faro (1997) Cardosin A accumulates in protein storage vacuoles of the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta* **203**: 204-212
- Ramalho Santos, M., P. Verissimo, L. Cortes, B. Samyn, J. Van Beeumen, E. Pires & C. Faro (1998) Identification and proteolytic processing of procardosin A. *European Journal of Biochemistry* **255**: 133-138
- Rawlings, N. & A. Barrett (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* **290**: 205-218
- Rawlings, N. & A. Barrett (1995) Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods in Enzymology* **248**: 105-120.
- Rawlings, N. & A. Barrett (2004a) Introduction the clans and families of cysteine endopeptidases. En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 1051-1071
- Rawlings, N. & A. Barrett (2004b) Introduction: serine peptidases and their clans and families. En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 1417-1438

- Rawlings, N. & A. Barrett (2004c) Introduction: aspartic peptidases and their clans. En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 3-11
- Rawlings, N., E. O'Brien & A. Barrett (2002) MEROPS: The protease database. *Nucleic Acids Research* **30**: 343-346
- Righetti, P. G., E. Gianazza, C. Gelfi & M. Chiari (1996) Isoelectric focusing. En: *Gel electrophoresis of proteins*, 2^{da} edn. (B. Hames & D. Rickwood, eds.) Oxford: Oxford University Press, pp. 149-216
- Rivett, A. J. & G. Mason (1999) Proteasomes. En: *Proteases. New perspectives. Molecular and Cell Biology Updates* (V. Turk, ed.) Basel: Birkhäuser Verlag, pp. 45-57
- Sarkkinen, P., N. Kalkkinen, C. Tilgmann, J. Siuro, J. Kervinen & L. Mikola (1992) Aspartic proteinase from barley grains is related to mammalian lysosomal cathepsin D. *Planta* **186**: 317-323
- Sarath, G., R. S. de la Motte, & F. Wagner (1989) Protease assay methods. En: *Proteolytic enzymes, a practical approach* (R. J. Beynon & J. S. Bond, eds.) Oxford: IRL Press, p. 27
- Schechter, I. & A. Berger (1967) On the size of the active site in proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **27**: 157-162
- Sidrach, L., F. García-Cánovas, J. Tudela & J. N. Rodríguez-López (2004) Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry* **66**: 41-49
- Silva, S. V. & F. X. Malcata (2000) Action of cardosin A from *Cynara humilis* on ovine and caprine caseinates. *Journal of Dairy Research* **67**: 449-454
- Silva, S. V. & F. X. Malcata (2005) Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry* **89**: 19-26
- Simões, I. & C. Faro (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry* **271**: 2067-2075
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson & D. C. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**: 76-85
- Stennicke, H. R. & G. S. Salvesen (2000) Caspases – controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1477**: 299-306
- Tamer, M. (1993) Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters* **15**: 427-432
- Tamer, M. & F. Mavituna (1996) Protease from callus and cell suspension cultures of *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters* **18**: 361-366
- Vairo Cavalli, S., C. Brutti, C. L. Natalucci & N. S. Priolo. (2002) Proteasas coagulantes de leche obtenidas de flores de dos especies de cardos. I Congreso Latinoamericano de Fitoquímica. IV Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, Buenos Aires
- Veríssimo, P., C. Esteves, C. Faro & E. Pires (1995) The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin like specificities. *Biotechnology Letters* **17**: 621-626
- Veríssimo, P., C. Faro, A. Moir, Y. Lin, J. Tang & E. Pires (1996) Purification characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry* **235**: 762-768

- Vieira, M., J. Pissarra, P. Verissimo, P. Castanheira, Y. Costa, E. Pires & C. Faro (2001) Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology* **45**: 529-539
- Vioque, M., R. Gomez, E. Sanchez, C. Mata, L. Tejada & J. Fernandez-Salguero (2000) Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**: 451-456
- Westergaard, J. L., C. Hackbarth, M. W. Treuhart & R.C. Roberts (1980) Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures. *Journal of Immunological Methods* **34**: 167-175
- White, P. C., M. Cordeiro, D. Arnold, P. E. Brodelius & J. Kay (1999) Processing, activity, and inhibition of recombinant cyprosin, an aspartic proteinase from cardoon (*Cynara cardunculus*). *Journal of Biogical Chemistry* **274**: 16685-16693

Capítulo 2

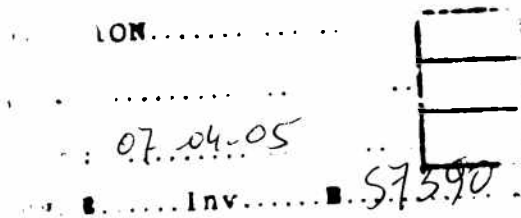


Los cardos (Vincent Van Gogh)

Objetivos específicos

Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:

- a) Obtener preparaciones enzimáticas crudas y parcialmente purificadas de flores de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Asteraceae*) como nueva fuente de peptidasas coagulantes de leche.
- b) Caracterizar la actividad coagulante de leche bovina de las preparaciones parcialmente purificadas en cuanto al efecto del salado, el agregado de CaCl_2 y la estabilidad a la temperatura.
- c) Obtener hidrolizados parciales de caseínas de leche bovina, caprina y ovina. Analizar los perfiles de degradación mediante electroforesis de los mismos. Comparar la acción de la preparación parcialmente purificada de *S. marianum* con la de un cuajo bovino comercial.



Materiales y Métodos

1. Determinación de la actividad coagulante de leche

Se preparó una solución de leche descremada al 10% (Sam Regim) en solución de CaCl_2 10 mM. La mezcla de reacción consistió en 100 μl de preparación enzimática por cada ml de leche y se incubó a 30 °C hasta observar la formación de un coágulo macroscópico. Se emplearon extractivos de *Cynara scolymus* (Llorente *et al.*, 2004) para realizar los controles positivos de coagulación y buffer de extracción para los controles negativos.

Se definió una unidad de actividad coagulante (UAC) como la cantidad de enzima que coagula 10 ml de leche a 30 °C en 100 s (Barros *et al.*, 2001).

1.1. Efecto del NaCl sobre la actividad coagulante

La actividad coagulante de leche fue medida siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en presencia de cantidades crecientes de cloruro de sodio (0.0-1.0 M).

1.2. Efecto del CaCl_2 sobre la actividad coagulante

La actividad coagulante de leche fue medida siguiendo el protocolo presentado en el punto 1 pero reconstituyendo la leche descremada en polvo con cantidades crecientes de solución de cloruro de calcio (0.0-1.0 M), siendo 6,5 el pH final.

1.3. Estabilidad de la preparación enzimática a 37 °C

La estabilidad a 37 °C de la preparación enzimática fue testada por incubación del extractivo en cámara termostática durante 0, 14, 30 y 60 minutos. La reacción se detuvo al sumergir el tubo que contenía la mezcla de reacción en baño de hielo. Luego se determinó la actividad residual según el protocolo de actividad coagulante de la leche descrito en el ítem 1.

2. Hidrólisis de caseínas

2.1. Preparación de caseinatos

Se prepararon caseinatos por precipitación isoelectrica mediante acidificación a pH 4,25 con HCl 6M siguiendo el método de Souza y Malcata (1998) a partir de leches de vaca, oveja y cabra previamente pasteurizadas. En cada caso la mezcla se mantuvo con agitación a 37 °C durante 30 minutos. Las caseínas se recuperaron por filtración sobre papel de filtro y se lavaron varias veces con agua destilada.

Los precipitados se resuspendieron en agua desionizada, ajustando el pH a 7,0 con NaOH 1M. Cada suspensión fue mantenida a 4 °C durante 2 horas para ser luego liofilizada y almacenada.

2.2. Desarrollo de la hidrólisis

Los caseinatos de sodio liofilizados se disolvieron (10 g/l) en buffer fosfatos 100 mM de pH 6,5 conteniendo 0,1 % de azida sódica como inhibidor del crecimiento microbiano.

Las hidrólisis de los distintos caseinatos se realizaron en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml termostatizados a 30 °C siguiendo la técnica descrita en Vairo Cavalli *et al.* (2005). Cada mezcla de reacción consistió en 45µl de enzima y 450µl del respectivo sustrato.

La reacción se detuvo a distintos tiempos: 30 minutos, 1, 3, 6, 12 y 24 horas por el agregado de 500µl de TCA al 5%.

Simultáneamente se realizaron los siguientes ensayos blanco:

- a) blanco de sustrato: en lugar de la enzima se agregaron 45µl de H₂O destilada.
- b) blanco de reactivos: se realizó invirtiendo el orden de agregado de los reactivos, primero el sustrato (caseinato sódico) luego el TCA al 5% y finalmente la enzima, de forma que al ingresar a la mezcla la enzima se inactive inmediatamente por acción del ácido.

Las mezclas se dejaron luego en heladera al menos 30 minutos y se centrifugaron 15 minutos a 8500 g. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado fue redisolto en 450 µl de buffer de muestra para electroforesis en geles de urea o tricina respectivamente, como se verá más adelante. Las muestras para electroforesis en geles con tricina se llevaron a ebullición 5 minutos en baño de

María. Todas las muestras fueron centrifugadas 3 minutos a 10000 g antes de ser sembradas.

3. Electroforesis desnaturalizante- discontinua con urea en geles de poliacrilamida

Para realizar las electroforesis con urea se siguió la técnica que Andrews (1983) desarrolló para estudiar la acción de las peptidasas endógenas de la leche bovina. Shalabi y Fox (1987) compararon esta técnica con otras comúnmente usadas (como SDS-PAGE, urea-PAGE de pH ácido) para realizar estudios electroforéticos de los péptidos solubles de una serie de quesos, llegando a la conclusión que el método de Andrews dió los mejores resultados. Posteriormente este método ha sido utilizado para el análisis de perfiles hidrolíticos de caseínas de diverso origen en la evaluación de potenciales sustitutos de cuajo (Silva y Malcata, 1999; Silva *et al.*, 2002).

3.1. Preparación de las Muestras

Las muestras consistieron en los hidrolizados de caseínas bovina, caprina u ovina obtenidos como se explicó en el punto anterior.

| Buffer de Muestra | |
|-------------------------------------|--------|
| Tris | 0,75 g |
| Azul de bromofenol | 2 mg |
| Urea | 48 g |
| <i>Se lleva a pH 7,6 con HCl 1N</i> | |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

Al redissolver las muestras se agregaron 0,2 ml de β -mercaptoetanol por cada ml de buffer de muestra.

3.2. Preparación de los geles

Los geles se moldearon dentro de placas de vidrio de 7 cm x 8 cm x 0,75 mm. En un primer paso se preparó el gel de resolución y luego de que este polimerizó

se hizo lo propio con el gel de "stacking". La composición de las soluciones necesarias para la preparación de ambos geles y el desarrollo de la electroforesis se describe en los ítems siguientes.

3.2.1. Cálculo de la composición de las mezclas de acrilamida-bisacrilamida (A-B):

$$\% T = \frac{\text{masa en g de acrilamida} + \text{masa en g de bisacrilamida}}{\text{volumen total}} \times 100$$

$$\% C = \frac{\text{masa en g de bisacrilamida} \times 100}{(\text{masa en g de acrilamida} + \text{masa en g de bisacrilamida})}$$

3.2.2. Gel de resolución

| Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (32,4:2,7) | |
|---|--------|
| Acrilamida | 32,4 g |
| Bisacrilamida | 2,7 g |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

La mezcla filtrada se guarda en frasco color caramelo y almacena como máximo 2 meses a 4°C.

| Buffer de resolución | |
|-------------------------------------|--------|
| Tris | 36,3g |
| <i>Se lleva a pH 8,9 con HCl 1N</i> | |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

| Gel de Resolución 12,5 % T - 4% C | |
|---|---------|
| Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (32,4:2,7) | 3,7 ml |
| Buffer de resolución | 1,1 ml |
| Urea (solución 9 M) | 4,7 ml |
| Agua destilada | 0,46 ml |
| <i>Se agita suavemente y se agrgan los agentes polimerizantes</i> | |
| TEMED | 5 µl |
| Persulfato de amonio 10 % p/v | 40 µl |

El gel queda preparado a pH 8,9 en buffer Tris-HCl 0,33 M con una concentración final de urea de 4,3 M.

3.2.3. Gel de "stacking"

| Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (20:1) | |
|---|--------|
| Acrilamida | 20,0 g |
| Bisacrilamida | 1,0 g |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

La solución filtrada pudo conservarse hasta 2 meses a 4°C en frasco color caramelo.

| Buffer de stacking | |
|-------------------------------------|--------|
| Tris | 6,1 g |
| <i>Se lleva a pH 7,6 con HCl 1N</i> | |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

| Gel de Stacking 4,2 % T - 5% C | |
|---|---------|
| Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (20:1) | 1,4 ml |
| Buffer de stacking | 0,87 ml |
| Urea (solución 9 M) | 3,35 ml |
| Agua destilada | 1,0 ml |
| <i>Se agita suavemente y se agrgan los agentes polimerizantes</i> | |
| TEMED | 4 µl |
| Persulfato de amonio 10 % p/v | 40 µl |

El gel quedó preparado a pH 7,6 en buffer Tris-HCl 0,062 M con una concentración 4,3 M de urea.

3.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean III Dual Slab Cell (Bio Rad). Las calles se lavaron dos veces con buffer de reservorio. Previamente a la aplicación de las muestras se realizó una precorrida a 50 mA (aproximadamente 100V) por 10 min para eliminar electrolitos que puedan afectar la corrida. Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volumen de siembra: 3 μ l). La electroforesis se corrió a potencial constante en dos etapas: 100 V hasta el final del “stacking” y 200 V hasta el final de la corrida. La corrida finalizó cuando el frente de corrida llegó al borde inferior del gel (aproximadamente 45 min. en total). Se empleó el siguiente buffer de reservorio de pH 8,3:

| Buffer de Reservorio (solución concentrada) | |
|---|--------|
| Tris | 3,0 g |
| Glicina | 14,6 g |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

La solución se filtró y se almacenó a 4 °C. Antes de ser usada se diluyó 1/10.

3.4. Fijación, coloración y secado de los geles

Los geles se fijaron sumergiéndolos durante 30 minutos en solución fijadora. Luego de este tiempo se reemplazó la solución fijadora por solución colorante. El tiempo de coloración no superó la hora treinta minutos para evitar la difusión de los péptidos de menor peso molecular. Finalmente se eliminó el excedente de colorante por el agregado de solución decolorante tres veces durante 15 minutos cada vez.

| Solución fijadora | |
|-----------------------|--------|
| Acido acético glacial | 10 ml |
| Metanol | 50 ml |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

| Solución colorante | |
|--------------------------------|--------|
| Acido acético glacial | 10 ml |
| Coomassie Brilliant Blue G-250 | 100 mg |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

La solución se filtró antes de ser usada.

| Solución decolorante | |
|-----------------------|--------|
| Acido acético glacial | 10 ml |
| Agua c.s.p. | 100 ml |

3.4.1. Secado y almacenamiento de geles

Los geles se sumergieron en una solución de glicerol al 40 % v/v durante 24 horas a temperatura ambiente y se colocaron entre films plásticos, evitando la formación de burbujas; por fuera de los films se colocaron papeles de filtro formando un “sandwich”. Sobre el conjunto se colocó un peso tal que la presión ejercida fuera de aproximadamente 7,5 g/cm² y se mantuvo durante 3 días en esas condiciones. Cuando los geles estuvieron suficientemente deshidratados se sellaron los bordes de los films con cinta de enmascarar lo que permite su manipulación y conservación.

4. Electroforesis desnaturizante-discontinua con tricina-SDS en geles de poliacrilamida para la separación de proteínas en el rango 1-100 kDa

Esta técnica electroforética desarrollada inicialmente por Shagger y Von Jagow (1987) permite la detección en un único gel de las fracciones de caseína aunque fue especialmente adaptada por Pardo & Natalucci (2002) para la mejor visualización de los péptidos de bajo peso molecular presentes en los hidrolizados de caseína. Tiene además la ventaja de que se pueden estimar los pesos moleculares de los fragmentos peptídicos generados durante la hidrólisis y que dichos fragmentos pueden ser transferidos a una membrana para ser luego secuenciados.

4.1. Preparación de los geles

Se utilizaron tres tipos de geles:

- 1- Gel de “stacking” (4%T, 3%C)
- 2- Gel espaciador (10%T, 3%C)
- 3- Geles de separación (16,5%T, 3%C)

Este gel discontinuo permite separar en el rango 1-70 Kda.

| Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (48:1,5) | |
|---|--------|
| Acrilamida | 48,0 g |
| Bisacrilamida | 1,5 g |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

La solución fue filtrada y guardada en frasco color caramelo hasta 2 meses a 4°C.

| Buffer de Resolución | |
|--------------------------------------|--------|
| Tris | 36,3g |
| <i>se lleva a pH 8,45 con HCl 1M</i> | |
| SDS | 0,3g |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

| Gel de Separación (10 % T - 3 % C) | |
|---|--------|
| Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (48:1,5) | 3,3 ml |
| Buffer de resolución | 3,3 ml |
| Glicerol 25 % v/v | 4,7 ml |
| <i>Se agita suavemente y se agregan los polimerizadores</i> | |
| TEMED | 5 µl |
| Persulfato de amonio al 10 % p/v | 50 µl |

El gel queda preparado a pH 8,45 en buffer Tris-HCl 0,87 M conteniendo 0,087 % de SDS y 10,3 % de glicerol.

| Gel Espaciador 10 % T - 3% C | |
|---|------------|
| Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (48:1,5) | 2 ml |
| Buffer de resolución | 3,3 ml |
| Agua destilada | 4,7 ml |
| <i>Se agita suavemente y se agregan los polimerizadores</i> | |
| TEMED | 5 μ l |
| Persulfato de amonio 10 % p/v | 50 μ l |

El gel queda preparado a pH 8,45 en buffer Tris-HCl 0,98 M conteniendo 0,1 % de SDS.

| Gel de Stacking 4 % T - 3 % C | |
|--|-------------|
| Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (48:1,5) | 0,6 ml |
| Buffer de resolución | 1,0 ml |
| Agua destilada | 3,4 ml |
| <i>Se agita suavemente y se agregan los agentes polimerizantes</i> | |
| TEMED | 10 μ l |
| Persulfato de amonio 10 % | 100 μ l |

El gel queda preparado a pH 8,45 en buffer Tris-HCl 0,59 M conteniendo 0,06 % de SDS.

4.2. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean III Dual Slab Cell (Bio Rad). Las calles se lavaron dos veces con buffer catódico. Las muestras se prepararon como se indica en el punto 2 con el siguiente buffer de muestra:

| Buffer de muestra | |
|-------------------------------------|--------|
| Tris | 0,79 g |
| SDS | 2,0 g |
| β -mercaptoetanol | 5,0 ml |
| Glicerol | 8,0 ml |
| Azul de bromofenol | 5,0 mg |
| <i>se lleva a pH 6,8 con HCl 1M</i> | |
| Agua Destilada c.s.p. | 100 ml |

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volumen de siembra: 6 μ l).

Se emplearon dos buffers distintos para llenar los reservorios anódico y catódico, que se describen a continuación.

| Buffer Anódico | |
|-------------------------------------|--------|
| Tris | 2,4g |
| <i>se lleva a pH 8,9 con HCl 1M</i> | |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

| Buffer Catódico | |
|-----------------|--------|
| Tris | 1,2g |
| Tricina | 1,8g |
| SDS | 0,1g |
| AD c.s.p. | 100 ml |

4.2.5. Condiciones de corrida

La electroforesis se corrió en etapas: con potencial constante (30V) hasta el final del “stacking”, luego se aumenta progresivamente 15 V/min durante 4 minutos y finalmente se deja a un potencial constante de 90V hasta el final de la corrida.

4.3. Fijación, Coloración y Secado de los geles

Los geles se fijaron, colorearon y decoloraron como se indica en el punto 3.4. Finalmente se secaron como se indica en 3.4.4.

5. Tratamiento Analítico de Datos por Densitografía

5.1 Captura y procesamiento preliminar de los datos

Para la digitalización de los geles provenientes de las electroforesis, se utilizó un escáner UMAX modelo Astra 610P. Los geles fueron escaneados a 360 dpi en formato TIFF no comprimido y las imágenes reducidas luego a un tamaño y resolución adecuados en un programa de procesamiento de imágenes (Paint Shop

Pro). Este programa fue utilizado también para ajustes de brillo, contraste e intensidad de color.

5.2 *Análisis de los datos por densitografía*

Una vez que las imágenes escaneadas fueron procesadas se obtuvieron los correspondientes densitogramas mediante el empleo del software Scion Image Beta 4.02 for Windows (Scion Corporation, <http://www.scioncorp.com>).

Resultados y Discusión

1. Actividad coagulante de leche de las preparaciones enzimáticas de *S. marianum*

Extractos acuosos de flores de *C. cardunculus* L. (*Asteraceae*) han sido utilizados tradicionalmente en la manufactura de quesos de leche de oveja y cabra en diversas áreas rurales de Portugal y España (Silva & Malcata, 2000). Para realizar los quesos los granjeros colectan flores maduras en los meses de junio y julio y las almacenan en lugares secos para ser utilizadas en la coagulación de la leche durante el otoño y el invierno. Durante el almacenamiento algunos lotes de flores pueden infectarse por hongos o degradar de alguna forma, produciendo generalmente alteraciones en las características de los quesos tales como producción de sabor amargo o producción de un queso muy blando (Cordeiro *et al.*, 1993).

En este trabajo se utilizaron extractos obtenidos a partir de flores frescas con el fin de evitar posibles modificaciones de las enzimas durante el proceso de secado. Como se ha visto en el capítulo 1, el extractivo crudo de flores frescas obtenido a pH 3,0 en presencia de nitrógeno líquido presentó la mejor actividad coagulante (R&D, ítem 2). Por su parte la preparación enzimática parcialmente purificada utilizada para los posteriores ensayos (R&D, ítem 3.1.2, del Capítulo 1) contó con $0,083 \pm 0,003$ unidades de actividad coagulante de leche/ml.

1.1. Efecto del NaCl

Con el fin de evaluar el efecto del salado sobre la enzima aislada se determinó la capacidad coagulante empleando leche con cantidades crecientes de NaCl (ítem 1.1 de M&M). Los resultados se pueden observar en la figura 1.

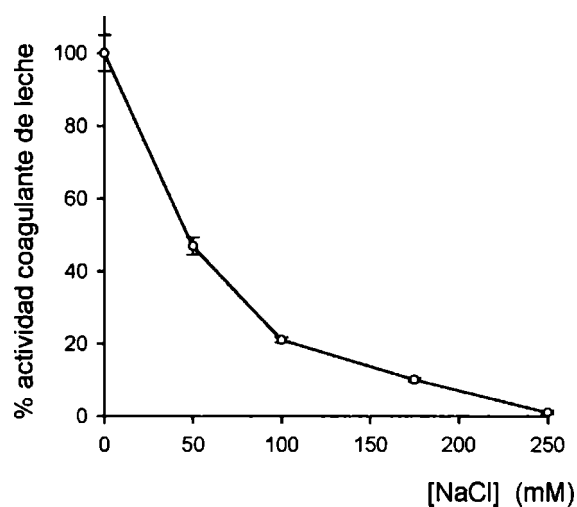


Figura 1. Efecto del salado en la actividad coagulante de leche

En presencia de NaCl 50 mM la actividad coagulante de leche decreció un 53 ± 2 % con respecto a la actividad coagulante sin el agregado de sal. La actividad continuó decreciendo con concentraciones mayores y ya con 250 mM de NaCl no se detectó actividad coagulante hasta las 24 horas de incubación.

El mismo comportamiento fue observado por Tamer (1993) para las enzimas con actividad coagulante de leche aisladas de flores y semillas de *Onopordum turcicum* L (*Asteraceae*).

1.2. Efecto del CaCl_2

La actividad coagulante de leche en presencia de concentraciones crecientes de CaCl_2 se ensayó como se describió en el ítem 1.2 de M&M. Como se observa en la figura 2 esta actividad se incrementa notoriamente cuando aumenta el contenido de CaCl_2 hasta 30 mM.

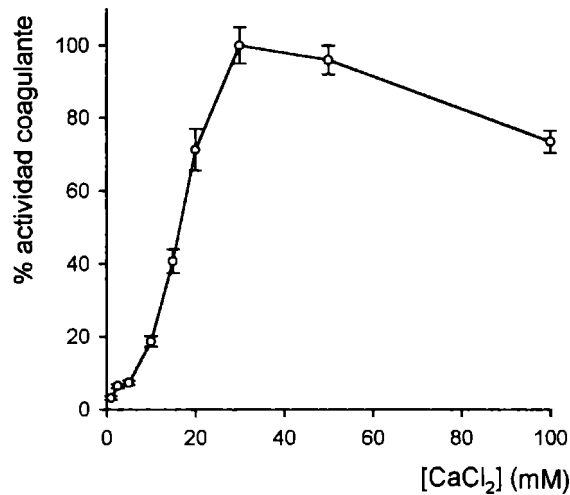


Figura 2. Actividad coagulante de leche con concentraciones crecientes de CaCl_2

Este resultado es consistente con lo observado para distintas enzimas coagulantes de leche al ser utilizadas frente a distintos tipos de leche (Castillo *et al.*, 2002, de Kruif, 1999). La mayoría de los autores creen que el agregado de CaCl_2 favorece la coagulación de leche porque afecta la agregación (Castillo *et al.*, 2002).

Como vemos en la misma figura la actividad coagulante decrece con valores mayores a 30mM, llegando a perder algo más de un 20% con 100 mM de CaCl_2 , posiblemente por el incremento de la fuerza iónica; este comportamiento también fue observado por Famelart *et al.* (1999) en leches coaguladas con cuajo bovino.

1.3. Estabilidad de la enzima a 37 °C

A fin de establecer la estabilidad a la temperatura de la preparación enzimática parcialmente purificada se determinó la actividad coagulante luego de incubar dicha preparación diferentes tiempos a 37 °C tal como se describe en el ítem 1.3 de M&M, determinándose luego la actividad coagulante residual. Los resultados obtenidos se observan en la figura 3.

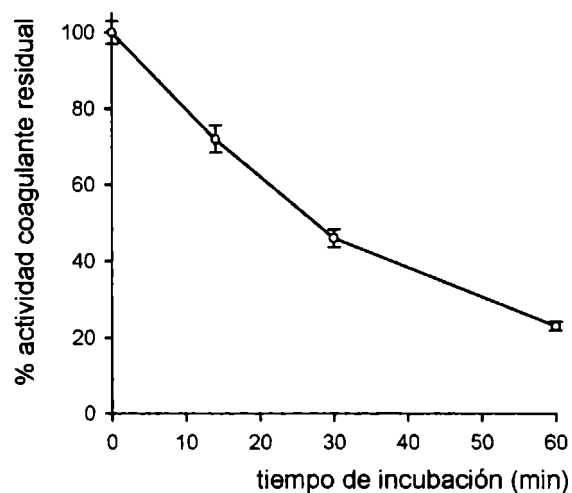


Figura 3. Actividad coagulante residual determinada luego de exponer la preparación enzimática parcialmente purificada a 37 °C por períodos variables.

La preparación perdió el 28 ± 4 % de la actividad coagulante de leche después de 14 minutos de incubación mostrando que posee una baja estabilidad a 37 °C. Sólo el 23 ± 1 % de la actividad inicial fue retenida después de 60 minutos a esta temperatura. La pérdida de la actividad coagulante puede ser atribuida a la degradación de la peptidasa presente en la preparación, pero debemos tener en cuenta que como la coagulación de leche no es una medida lineal de la actividad proteolítica, estos resultados no implican que la enzima se haya degradado en el mismo porcentaje.

2. Hidrólisis de caseínas

Al estudiar un sustituto de cuajo es de gran importancia evaluar adecuadamente los perfiles de degradación de las caseínas por el efecto que esta degradación tiene en el rendimiento, consistencia, sabor y olor del queso (Fox, 1989). Con el objetivo de analizar los perfiles de degradación de caseínas bovina, caprina y ovina se sometieron estos sustratos a hidrólisis parcial según el protocolo descrito en el ítem 2 de M&M

del presente capítulo y se realizaron las electroforesis de los productos obtenidos tanto por urea-PAGE (M&M, ítem 3) como por tricina SDS-PAGE (M&M, ítem 4).

Las preparaciones parcialmente purificadas empleadas para degradar las caseínas presentaron las siguientes características: $0,128 \pm 0,002$ U_{Hb}/ml, $0,083 \pm 0,003$ unidades de actividad coagulante de leche/ml y 264 ± 4 µg/ml de proteína.

La electroforesis en el sistema urea-PAGE es el método tradicionalmente empleado para el estudio de los hidrolizados de caseína y para el seguimiento de la maduración de los queso ya que la urea, al ser un agente caotrópico, previene la formación de agregados y mejora la resolución de las caseínas con respecto a otras electroforesis (Andrews, 1983; Shalabi y Fox, 1987; Creamer, 1991). Este método fue usado en el presente trabajo ya que se dispone de una amplia bibliografía con la cual comparar los resultados obtenidos. Recientemente Pardo y Natalucci (2002) han demostrado que la electroforesis empleando el sistema tricina-SDS-PAGE de alta resolución permite visualizar los péptidos formados durante la hidrólisis de las caseínas, aún los más pequeños y estimar sus PM.

2.1. Hidrólisis de caseínas bovinas

2.1.1. Análisis por urea PAGE

La electroforesis realizada empleando el sistema de urea-PAGE se muestra en la figura 4. Se pudieron identificar en orden creciente de movilidad la región de las γ -caseínas, β -caseína, la región correspondiente a las α_s -caseínas, que incluye α_{s2} - y α_{s1} -caseínas (Creamer, 1991).

Luego de 3 horas de incubación se observó degradación tanto de β -caseína como de α_{s1} -caseínas (45 y 65 %, respectivamente). Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros autores, quienes reportaron que la fracción β -caseína de leche bovina es menos susceptible que las α_s -caseínas a la proteólisis por extractos de flores de *Centaurea calcitrapa* (Tavaria *et al.* 1997) y *Cynara cardunculus* (Silva *et al.* 2002), dos especies pertenecientes a la familia *Asteraceae*, de las que también se aislaron aspartilendopeptidasas.

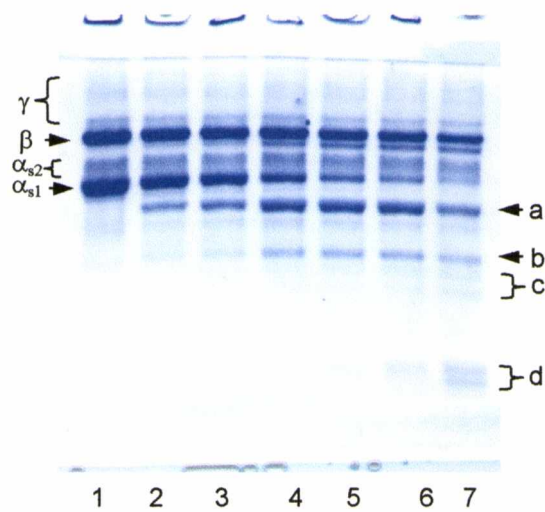


Figura 4. Urea-PAGE de hidrolizados de caseinatos bovinos. Calles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: hidrolizados a 0 y 30 minutos, 1, 3, 6, 12 y 24 horas, respectivamente

En la figura 5 pueden observarse los densitogramas obtenidos a partir del gel obtenido por urea-PAGE para los distintos tiempos de reacción. Estos gráficos son coherentes con lo expresado anteriormente respecto a la mayor susceptibilidad de la fracción de α_{s1} -caseína a la hidrólisis respecto a la de la fracción β -caseína.

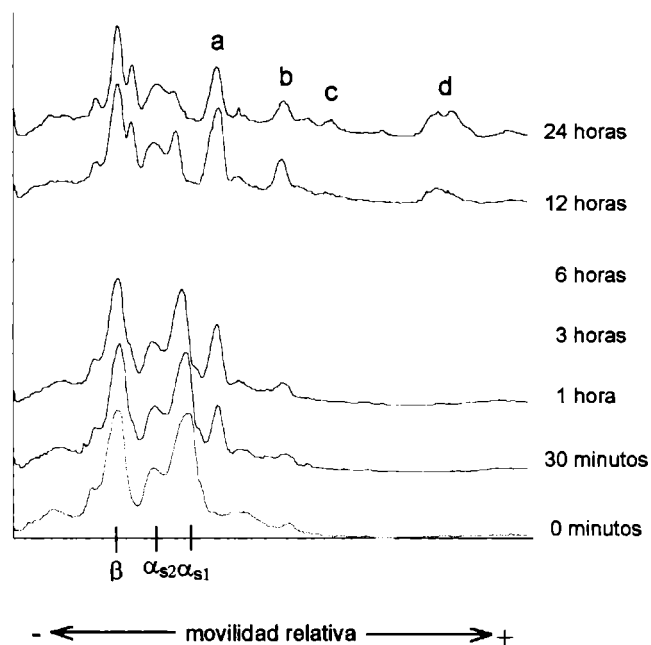


Figura 5. Análisis por densitografía del gel obtenido por urea-PAGE

Luego de 30 minutos de reacción se observa la aparición de una fracción (a) de mayor movilidad que las caseínas, que se va intensificando a medida que transcurre la reacción (Figs. 4 y 5). Por su parte, la fracción (b) aumenta hasta las 3 horas de reacción y luego se mantiene prácticamente constante. Los grupos de bandas (c) y (d) comienzan a visualizarse a las 6 horas de incubación y se van intensificando hacia las 24 horas.

En la figura 6 se observa el porcentaje de hidrólisis de las fracciones α_s - y β -caseína a lo largo del tiempo. Los valores fueron obtenidos mediante el cálculo del área de los picos densitográficos con el programa Scion Image. La curva de velocidad de hidrólisis demostró, tal como se había indicado previamente, que los dos principales grupos de caseínas son digeridas por la enzima a diferente velocidad.

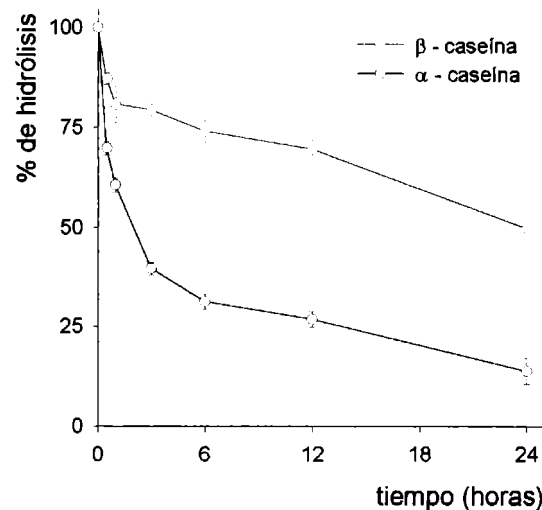


Figura 6. Cinética de hidrólisis de β y α_{s1} -caseínas bovinas

Como se observa en las figuras 4, 5 y 6 la velocidad de hidrólisis fue máxima hasta las tres horas de reacción, especialmente para la región de α_{s1} -caseína. A partir de ese momento disminuyó la pendiente de la velocidad de reacción.

Luego de 24 horas la degradación de la α_{s1} -caseína fue de un $86 \pm 4\%$, en tanto que la β -caseína fue degradada en un $50 \pm 1\%$. Otros investigadores (Tavaria *et al.*, 1997) han reportado que luego de 24 horas de hidrólisis la fracción β -caseína de caseinato bovino es degradada por extractos de flores frescas de *C. calcitrapa* (*Asteraceae*) hasta un 50% con respecto a la degradación de las fracciones α_s . Este comportamiento puede ser explicado pues la caseína α_{s1} bovina es una proteína rica en residuos hidrofóbicos, presentando un 43% de los residuos con cadenas laterales hidrofóbicas (Ramalho-Santos *et al.*, 1996); como ya se discutió en el Capítulo 1 (ítem 5.1.3 de R&D) las peptidasas aspárticas tienen preferencia por los enlaces entre este tipo de residuos.

Se sabe además que la α_{s1} -caseína bovina es clivada durante la maduración de los quesos y el grado en que ella es hidrolizada es un factor importante en el rendimiento, la textura y las propiedades organolépticas del queso (Dalglish, 1982).

2.1.1.1. Comparación del comportamiento con cuajo bovino comercial

Con el objetivo de comparar el perfil hidrolítico obtenido empleando silprosinina parcialmente purificada con el obtenido empleando un cuajo bovino comercial se realizó la hidrólisis parcial de caseínas con este último preparado, llevando la solución enzimática a una actividad coagulante de leche de 0,083 unidades/ml y manteniendo los restantes parámetros iguales a los empleados con silprosinina (M&M, ítem 2). Los hidrolizados fueron sometidos a electroforesis empleando el sistema urea-PAGE y los resultados obtenidos se muestran en las figuras 7 y 8.

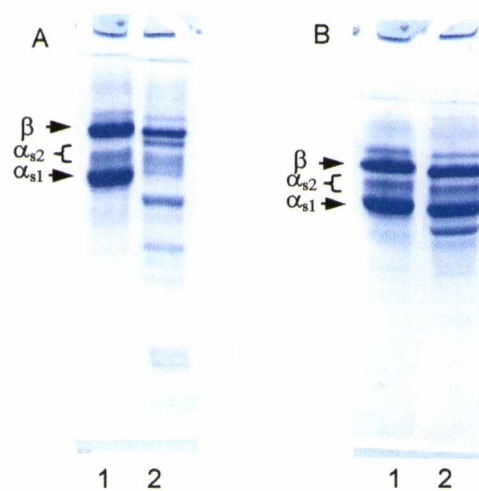


Figura 7. Urea-PAGE de hidrolizados de caseínas bovinas. A: Hidrólisis realizada con silprosinina. B: Hidrólisis realizada con cuajo bovino comercial. Calles 1: tiempo 0, calles 2: 24 horas.

La preparación enzimática parcialmente purificada de flores de *S. marianum* hidrolizó parcialmente, como ya habíamos observado en el ítem 2.1.1, tanto la fracción α_{s1} - como la fracción β -caseína, mientras que en el caso del cuajo bovino prácticamente no fue apreciable la actividad sobre estas fracciones en las condiciones del ensayo. Por otro lado la figura 8 muestra en ambos hidrolizados de 24 horas la aparición de una fracción (a) de idéntica movilidad relativa.

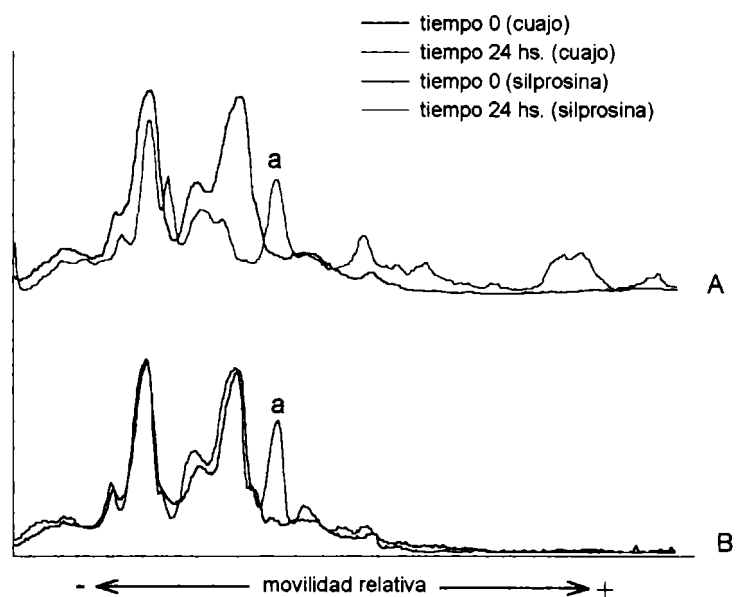


Figura 8. Densitograma de la hidrólisis de caseínas bovinas a tiempo 0 y 24 horas por silprosin (A) y por cuajo bovino comercial (B)

2.1.2. Análisis por tricina SDS-PAGE

El método de tricina SDS-PAGE (M&M, ítem 4) tiene la ventaja de que se pueden visualizar separadas α_{s2} -, α_{s1} -, β - y κ -caseínas y además se logra una buena separación de los péptidos de bajo PM. κ -caseína es la fracción de caseína con mayor movilidad empleando esta técnica, mientras que β -caseína mostró una movilidad intermedia, la fracción de menor movilidad fue la región de las α_s -caseínas (Pardo & Natalucci, 2001). La figura 9 muestra el perfil de hidrólisis obtenido por esta técnica.

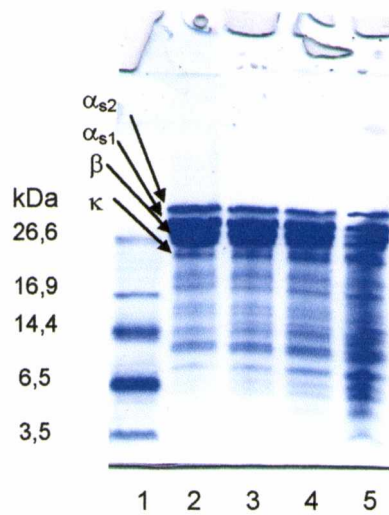


Figura 9. Tricina SDS-PAGE de hidrolizados de caseinatos bovinos. Calle 1: marcadores polipeptídicos de peso molecular, calles 2, 3, 4 y 5: tiempos; 0, 6; 12 y 24 horas de hidrólisis, respectivamente.

Como lo muestra la figura 9 luego de seis horas de incubación aparecieron nuevas bandas de menor masa molecular que las caseínas (alrededor de 15,0; 8,0; y 6,7 kDa), dichas bandas se hicieron más intensas después de 24 horas de hidrólisis. El hidrolizado de 12 horas mostró también tres nuevas bandas (alrededor de 24,0; 5,0; y 3,0 kDa) que se intensificaron a las de 24 horas de hidrólisis. Con respecto hidrolizado de 24 horas se produjeron otras tres nuevas bandas (alrededor de 21,5; 17,0 y 13,0 kDa). Por otro lado, una banda de 10,0 kDa se hizo más intensa a las 24 h de incubación.

2.2. Hidrólisis de caseínas caprinas

2.2.1. Análisis por urea-PAGE

La figura 10 presenta el electroforetograma típico obtenido por urea-PAGE del caseinato caprino y los perfiles de hidrólisis a distintos tiempos de dicho caseinato empleando silprosinina parcialmente purificada como endopeptidasa.

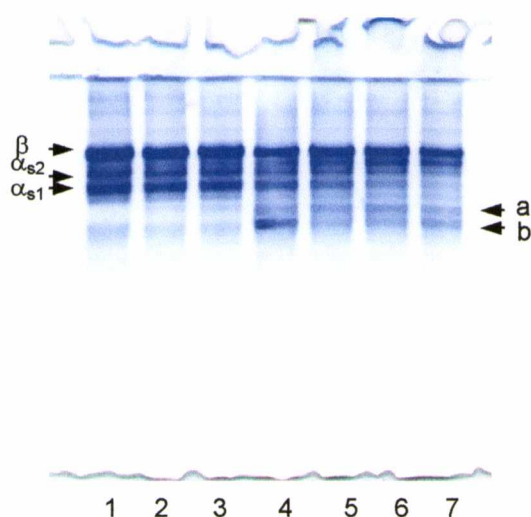


Figura 10. Urea-PAGE de hidrolizados de caseinatos caprinos. Calles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: tiempos 0, 1, 3, 6; 12 y 24 horas, respectivamente

El grupo con menor movilidad electroforética en la figura 10 es la fracción β -caseína (Richardson & Creamer, 1974), que a veces se subdivide en dos variantes β_1 - y β_2 -caseína, en este caso las dos bandas están juntas como región β -caseína (Tavaria *et al.*, 1997). El grupo de bandas con mayor movilidad es la región de las α_s -caseínas, que puede incluir un número variable de especies moleculares dependiendo el polimorfismo genético de las proteínas presentes en la leche de cabra (Carretero *et al.*, 1994).

Luego de 30 minutos de reacción comienza a visualizarse la banda (a) que se intensifica hasta las 3 horas de incubación y se mantiene casi constante hasta las 24 hs de reacción. Por su parte la banda (b) que aparece muy intensa a las 3 horas de hidrólisis se hace más tenue en los siguientes tiempos de reacción.

El gráfico de la figura 11 muestra los densitogramas correspondientes a las bandas obtenidas por urea-PAGE. Los picos (a) y (b) corresponden a las bandas (a) y (b) de la figura 10.

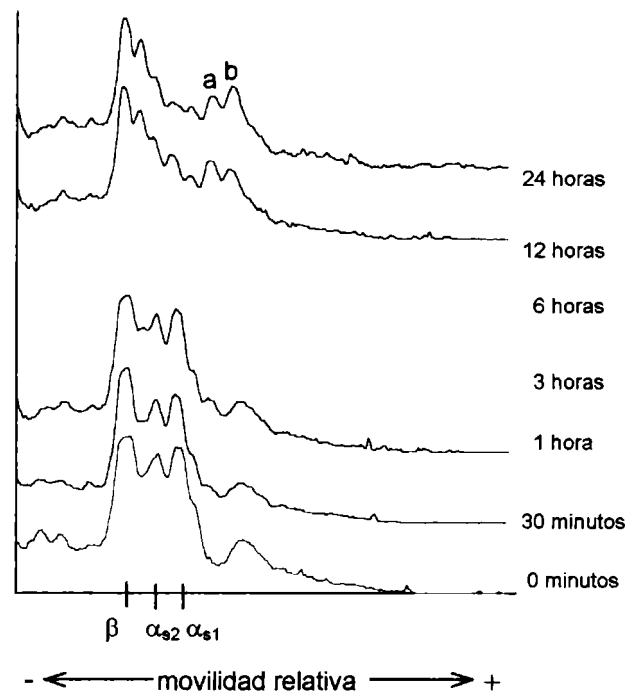


Figura 11. Análisis por densitografía de la urea-PAGE

La fracción β -caseína caprina luego de 24 horas de incubación muestra un 40% de degradación (Fig. 10 y 11. Por su parte, la fracción de α_{s1} -caseína, fue degradada un 68% a las 24 horas de incubación.

La cinética de hidrólisis (Fig. 12) medida como la disminución de las áreas de los picos del densitograma muestra que la velocidad de degradación fue semejante para ambas fracciones de caseínas durante las primeras 3 horas de reacción. Sin embargo al proseguir la hidrólisis la α_{s1} -caseína fue hidrolizada con mayor velocidad que la β -caseína.

Estos resultados son consistentes con lo hallado por Souza & Malcata (1998) quienes observaron que ambas fracciones del caseinato caprino durante 3 horas se hidrolizaban a la misma velocidad, al realizar la reacción con extractos acuosos de pH 5,9 obtenidos a partir de flores secas de *C. cardunculus* (*Asteraceae*).

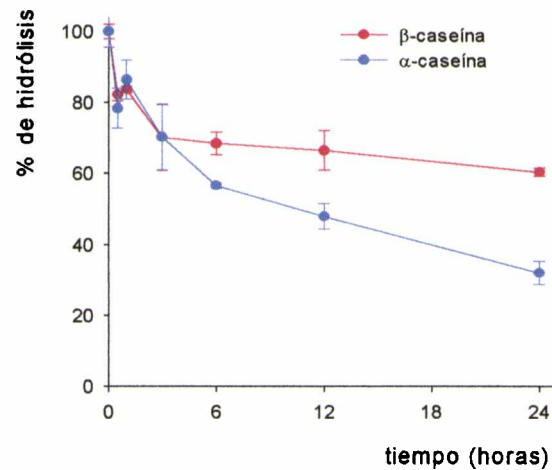


Figura 12. Cinética de hidrólisis de β y α_1 -caseínas caprinas

2.2.2. Comparación con cuajo bovino comercial

La hidrólisis del caseinato caprino se realizó con cuajo bovino comercial y con el extracto parcialmente purificado de flores de *S. marianum* en idénticas condiciones de reacción (M&M, ítem2). Los resultados obtenidos al analizar los hidrolizados por electroforesis empleando el sistema urea-PAGE (M&M, ítem 3) se muestran en la figura 13.

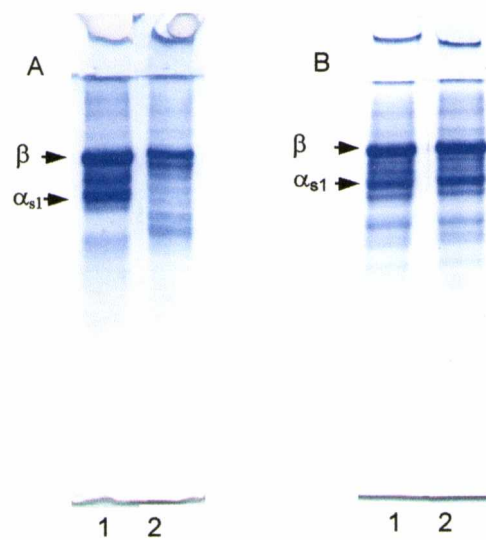


Figura 13. Urea-PAGE de hidrolizados de caseínas caprinas. A: Hidrólisis realizada con silpsosina. B: Hidrólisis realizada con cuajo bovino comercial. Calles 1: tiempo 0, calles 2: 24 horas.

Como puede observarse tanto en la electroforesis (Fig. 13) como en los correspondientes densitogramas (Fig. 14) el cuajo bovino comercial no produjo ningún efecto observable sobre las dos fracciones de caseína más importantes, sólo hidrolizó parcialmente la región de bandas de movilidad intermedia entre las regiones α_{s1} - y β -caseínas, que corresponden a α_{s2} -caseína. Por su parte, como ya lo observáramos en la Fig. 10, el extracto parcialmente purificado de flores de *S. marianum* produjo una extensa degradación de las α_s -caseínas y una más leve degradación de la β -caseína caprina.

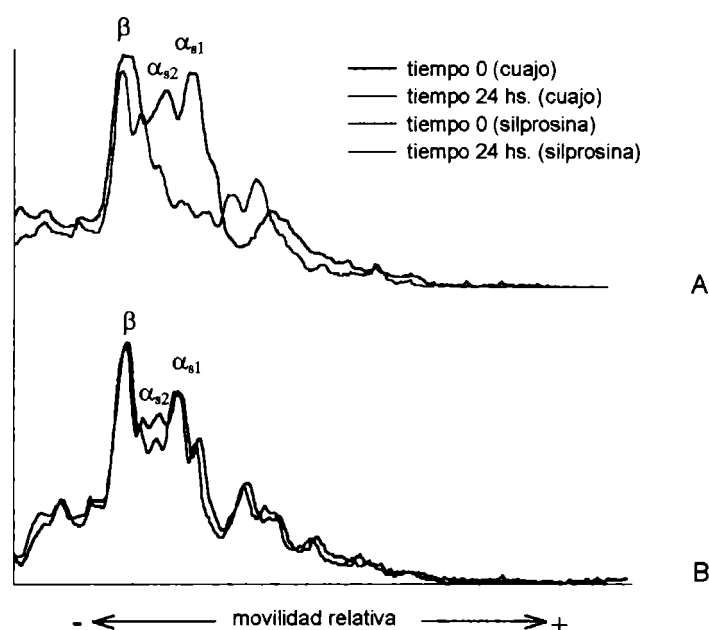


Figura 14. Análisis por densitografía del electroforetograma de las hidrólisis de caseínas caprinas a tiempo 0 y 24 horas por silprosin (A) y por cuajo bovino comercial (B)

2.2.3 Análisis por tinción SDS-PAGE

La electroforesis obtenida por tinción SDS-PAGE de los hidrolizados de caseinato caprino se muestra en la figura 15. La única banda importante y bien definida (a) aparece luego de doce horas de hidrólisis con un peso molecular de 14,4 kDa y se intensifica a las 24hs de reacción.

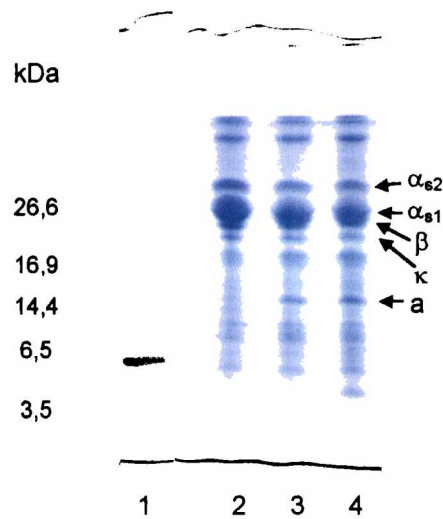


Figura 15. Tricina SDS-PAGE de hidrolizados de caseinatos caprinos. Calle 1: marcadores polipeptídicos de peso molecular; calles 2, 3 y 4 tiempos 0, 2 y 24 horas de hidrólisis, respectivamente.

2.3. Hidrólisis de Caseinato Ovino

2.3.1. Análisis por urea PAGE

En la electroforesis obtenida por urea-PAGE (Fig. 16) de los hidrolizados de caseinatos bovinos se identificaron dos grupos principales de caseínas, las regiones α_s - y β -caseínas, esta observación es consistente con las reportadas previamente por Richardson & Creamer, (1976).

El grupo con mayor movilidad corresponde a las α_s -caseínas que puede incluir 3 variantes (α_{s1} , α_{s2} y α_{s3}) esta microheterogeneidad proviene del grado de glicosilación y/o el grado de fosforilación además del polimorfismo genético. El grupo de menor movilidad corresponde a la región de la β -caseína, que está formada por dos variantes β_1 y β_2 que se diferencian por el nivel de fosforilación (Souza & Malcata, 1998).

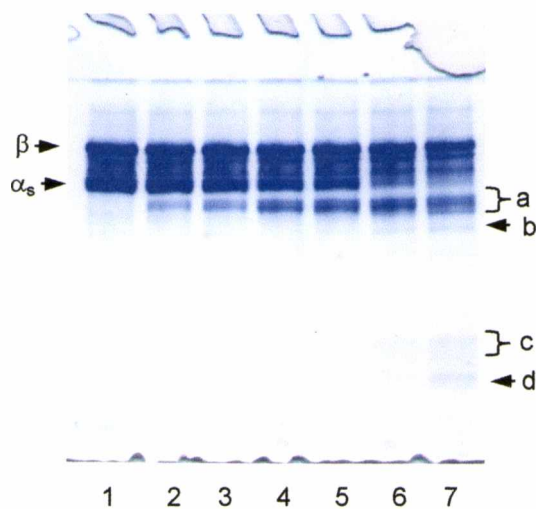


Figura 16. Urea-PAGE de hidrolizados de caseinatos ovinos. Calles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7: tiempos 0 y 30 minutos; 1, 3, 6, 12 y 24 horas, respectivamente

Si bien la hidrólisis procede mucho más lentamente que en el caso del caseinato bovino (Fig. 4 y 5), ya a los treinta minutos de reacción aparece una región (a) con bandas de mayor movilidad que las α_s -caseínas. Luego de 24 horas de incubación la fracción de α_s -caseínas fue degradada en un $76 \pm 4\%$, mientras que la fracción de la β -caseína sólo fue hidrolizada en un $19 \pm 4\%$. En el caso del queso Serra producido en Portugal a partir de leche ovina cuajada con extractos de flores de *C. cardunculus* se ha observado luego de la maduración que el grado de hidrólisis de β - y α_s -caseínas es extenso y similar para ambas fracciones, 75 y 82% respectivamente (Macedo & Malcata, 1997). Los hidrolizados que hemos obtenido con los extractos parcialmente purificados de silprosinas podrían predecir una diferencia de comportamiento entre ambas enzimas.

El densitograma de cada una de las bandas de la electroforesis obtenidas por urea-PAGE se muestra en la figura 17. En esta figura también se observa la región (a) de bandas con mayor movilidad que las α_s -caseínas como un pico que se va incrementando desde los 30 minutos hasta las 24 horas de reacción. Por otra parte a partir de las 6 horas de incubación se comienzan a ver otros picos más pequeños que se van incrementando hacia las 24 horas

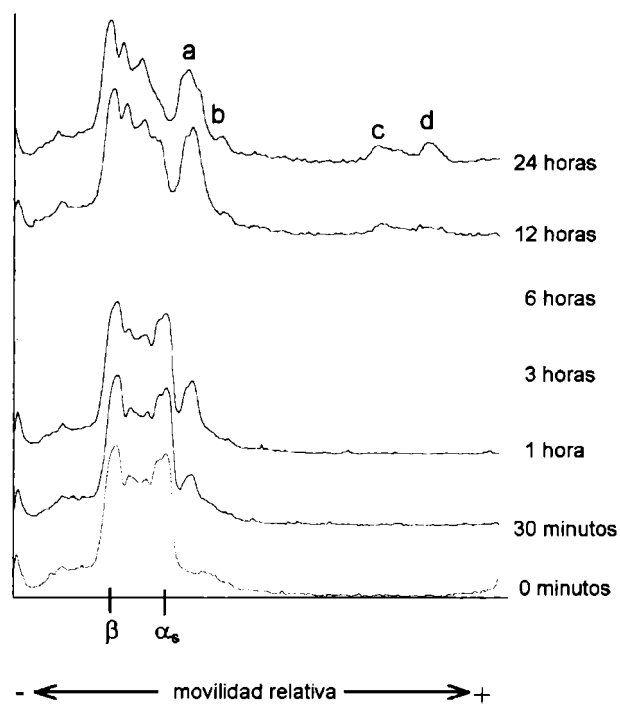


Figura 17. Análisis por densitografía del gel obtenido por urea-PAGE

Silva & Malcata (1999) reportaron que cardosina B degradó ambos tipos de caseínas ovinas, pero no hasta el mismo grado de hidrólisis. Cuando se encontraban como parte del caseinato de sodio, la fracción de las α_s - caseínas fue más susceptible frente a la proteólisis por cardosina B que la fracción de la β -caseína, mientras que cuando estas fracciones fueron aisladas y luego expuestas a hidrólisis se observó lo inverso.

El gráfico de la figura 18 presenta la cinética de hidrólisis de las caseína α_s - y β del caseinato ovino al ser degradadas con el extractivo parcialmente purificado de flores de *S. marianum*.

En concordancia con los resultados antes presentados, las α_s -caseínas son más rápida y extensamente degradadas que la β -caseína. Esto difiere con lo reportado por

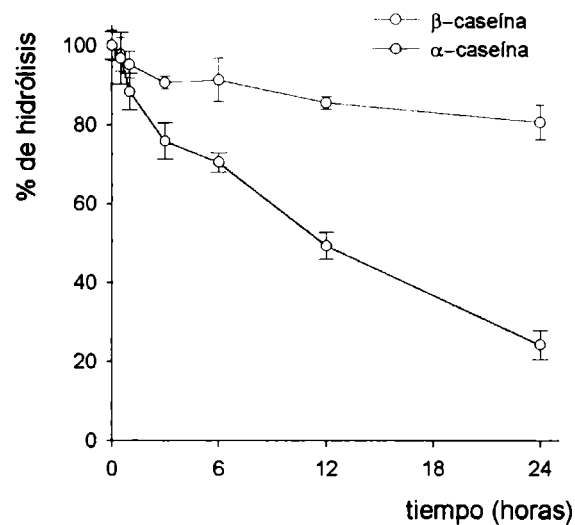


Figura 18. Cinética de hidrólisis de β y α_s -caseínas ovinas

Souza y Malcata (1998) quienes encontraron velocidades semejante de hidrólisis (hasta las 3 horas de reacción) para ambas fracciones del caseinato ovino al realizar la reacción con extractos acuosos (pH 5,9) de flores secas de *C. cardunculus* (*Asteraceae*).

2.3.2. Comparación con cuajo bovino comercial

El caseinato ovino fue hidrolizado con cuajo bovino comercial y con el extracto parcialmente purificado de flores de *S. marianum* en idénticas condiciones de reacción a fin de realizar la comparación de sus respectivos perfiles de degradación. La figura 19 presenta Los electroforetogramas obtenidos por urea-PAGE para cada uno de los hidrolizados.

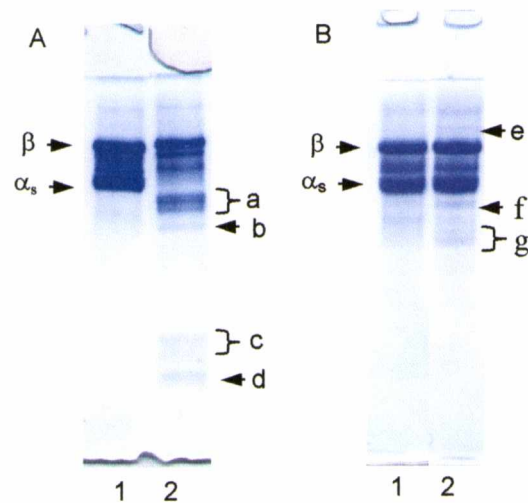


Figura 19. Urea-PAGE de hidrolizados de caseínas ovinas. A: Hidrólisis realizada con silposina. B: Hidrólisis realizada con cuajo bovino comercial. Calles 1: tiempo 0, calles 2: 24 horas.

Luego de 24 horas de hidrólisis se visualiza una región (a) y una banda (b) de movilidad cercana a las α_s -caseínas, y otra región de bandas (c) y una banda (d) de mucha mayor movilidad. El electroforetograma de la hidrólisis llevada a cabo con cuajo bovino comercial presenta a las 24 horas de reacción muy poca diferencia con respecto al de tiempo 0, en las condiciones del ensayo. Se aprecia una nueva banda (e) de menor movilidad que β -caseína, una banda (f) y una región de bandas (g) con movilidad mayor, pero cercana a la fracción de las α_s -caseínas.

Los densitogramas de cada una de las bandas electroforéticas se muestran en la Fig. 20. En la parte A de la figura se puede ver como luego de 24 horas de reacción el extractivo de flores degradó muy extensamente de las α_s -caseínas; también decrece, aunque en bastante menor medida, el pico de movilidad intermedia y la región de la β -caseína.

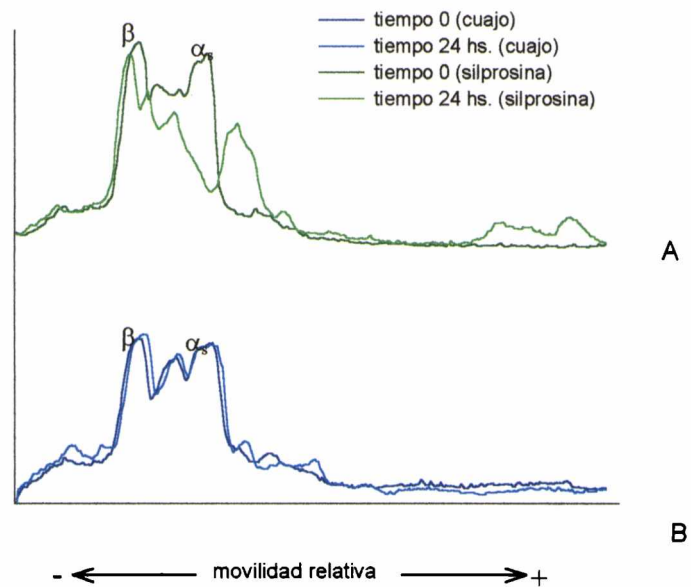


Figura 20. Análisis por densitografía de los geles obtenido por urea-PAGE de las hidrólisis de caseínas ovinas a tiempo 0 y 24 horas por silprosin (A) y por cuajo bovino comercial (B)

2.3.3 Análisis por tricina SDS-PAGE

La electroforesis obtenida por tricina SDS-PAGE de los hidrolizados de caseinato ovino se muestra en la figura 21.

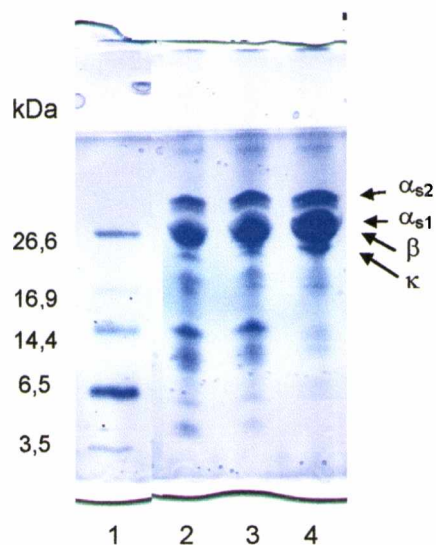


Figura 21. Tricina SDS-PAGE de hidrolizados de caseinatos ovinos. Calle 1: marcadores polipeptídicos de peso molecular; calles 2, 3 y 4 tiempos 24, 12 y 0 horas de hidrólisis, respectivamente.

Luego de que la hidrólisis progresara durante de 12 horas se intensifican bandas de 18,9; 16,5; 11,2; 8,6 kDa. Nuevas bandas de péptidos más pequeños (5,8; 4,3 kDa) aparecen luego de 12 horas de reacción.

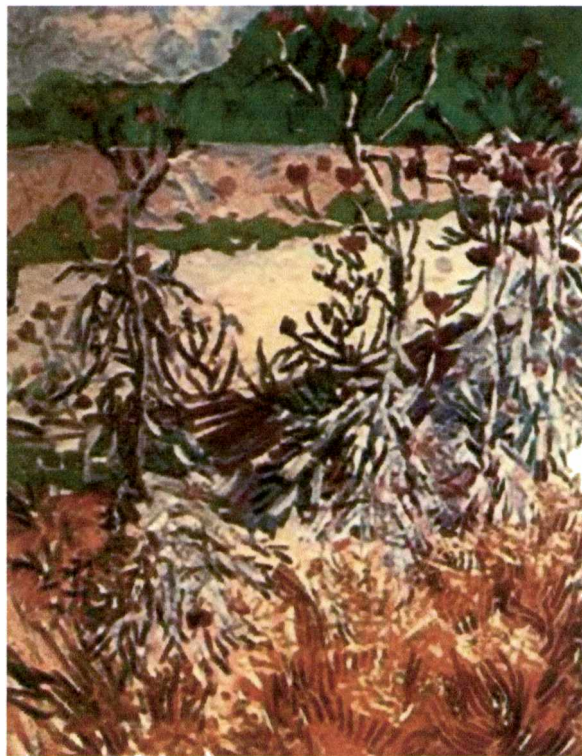
Referencias

- Andrews, A. T. (1983) Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research* **50**: 45-55
- Businco, L., S. Dreborg, R. Einarsson, P. G. Giampietro, A. Høst, K. M. Keller, S. Strobel, U. Whan (1993) Hydrolysed cow's milk formulae. Allergenicity and use in treatment and prevention. *Pediatric Allergy and Immunology* **4**: 101-111
- Carretero, C., A. J. Trujillo, M. Mor-Mur, R. Pla, B. Guamis (1994) Electrophoretic study of casein breakdown during ripening of goat's milk cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **42**: 1546-1550
- Castillo, M., F. A. Payne, C. L. Hicks, J. Laencina, M.B. López (2002) Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goats' milk using a light scattering sensor. *International Dairy Journal* **12**: 1019-1023
- Cordeiro, M., E. Jakob, Z. Puhán, M. S. Pais y P. E. Brodelius (1992). Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus* L. - a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft* **47**: 683-687
- Creamer, L. K. (1991) Electrophoresis of cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation* **261**: 14-28
- Dalgleish, D. G. (1987) The enzymatic coagulation of milk. En: *Cheese: chemistry, physics, and microbiology. Vol 1 General Aspects* (P. F. Fox ed.). Londres: Elsevier, pp. 63-96
- Dalgleish, D. G., P. A. Spagnuolo & H. D. Douglas (2004) A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal* **14**: 1025-1031
- de Kruif, C. G. (1999) Casein micelle interactions. *International Dairy Journal* **9**: 183-188
- Domingos, A., A. Clemente & M. S. Pais (1992) Studies on proteases with milk clotting activity from *Centaurea calcitrapa*. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* **57**: 1909-1910
- European Economic Community-EEC (1996) Foodstuffs. Protected geographical indications and designations of origin. *Official Journal L* **163**: N° 1263
- Esteves, C. L. (1995) Estudo comparativo das características bioquímicas dos coalhos de *Cynara cardunculus* L., *Cynara scolymus* L. e *Cynara humilis* L. Tesis de Maestría en Biología Celular, Universidad de Coimbra.
- Euston, S. R., D. S. Horne (2005) Simulating the self-association of caseins. *Food Hydrocolloids* **19**: 379-386
- Fox, P. F. (1989) Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science* **72**: 1379-1400
- Ginger, M. R. & M. R. Grigor (1999) Comparative aspects of milk caseins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **124**: 133-145
- Hayaloglu, A. A., M. Guven, P. F. Fox (2002) Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir'. *International Dairy Journal* **12**: 635-648
- Horne, D. S. (1998) Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal* **8**: 171-177

- Inda Cunningham, A. (2000) Capítulo II. La estructura de un queso blanco latinoamericano. En: "Optimización de Rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de la Quesería". Organización de los Estados Americanos
http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/QUESO/Queso_all.pdf
- Lourenço, P. M. L., S. de Castro, T. M. Martins, A. Clemente & A. Domingos (2002) Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 242-249
- Macedo, A. C., F. X. Malcata y J. C. Oliveira (1993) The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science* **76**: 1725-1739
- Macedo, A. C., F. X. Malcata (1997) Hydrolysis of α_s - and β -caseins during ripening of Serra cheese. *Food Chemistry* **58**: 43-48
- Mc Sweeney, P. H., N. F. Olson, P. F. Fox, A. Healy & P. Højrup (1993) Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. *Journal of Dairy Research* **60**: 401-412
- Piszkiwicz, D., Landon, M. & Smith, E.L. (1970) Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **40**: 1173-1178
- Reis, P. M., P. L. Lourenço, A. Domingos, A. F. Clemente, M. S. Pais y F. X. Malcata (2000) Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese. *International Dairy Journal* **10**: 775-780
- Richardson, B. C. & L. K. Creamer (1974) Comparative micelle structure. III. The isolation and chemical characterization of caprine β_1 - y β_2 -caseins. *Biochimica et Biophysica Acta* **365**: 133-137
- Richardson, B. C. & L. K. Creamer (1976) Comparative micelle structure. V. The characterization and isolation of major ovine caseins. *New Zealand Journal of Dairy Science* **11**: 46-53
- Shalabi, S. I. y P. Fox (1987) Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. *Irish Journal of Food Science and Technology* **11**: 135-151
- Silva, S. V. y F. X. Malcata (1999) On the activity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chemistry* **67**: 373-378
- Silva, S. V. y F. X. Malcata (2000) Comparative catalytic activity of two plant proteinases upon caprine caseins in solution. *Food Chemistry* **71**: 207-214
- Silva, S. V., R. M. Barros y F. X. Malcata (2002) Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. *Journal of Food Science* **67**: 1746-1751
- Silva, S. V., F. X. Malcata (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* **15**: 1-15
- Silvestre, M. P. C. (1997) Review of the methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry* **60**: 263-271
- Souza, M. J. y F. X. Malcata (1997) Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of *Cynara cardunculus*. *Z Lebensm Unters Forsch A* **205**: 97-103
- Souza, M. J. y F. X. Malcata (1998) Proteolysis of ovine and caprine caseins solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme and Microbial Technology* **22**: 305-314
- Tavaria, F. K., M. J. Sousa, A. Domingos, F. X. Malcata, P. Brodelius, A. Clemente y M. S. Pais (1997) Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **45**: 3760-3765

- Taverna, M. A. (2002) Composición química de la leche. Proyecto Nacional de Lechería del INTA. http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/produccion_animal/calidad/pnl_cql.pdf
- Uhlig, H. (1998) Industrial enzymes and their applications. Nueva York: Willey & Sons, pp. 1-11, 146-179
- Vairo Cavalli, S., S. Claver, N. Priolo & C. Natalucci (2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research*, en prensa
- Verissimo, P., C. Esteves, C. Faro, C. & E. Pires (1995) The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters* 17: 621-626
- Visser, S., P. J. van Roojen, C. Schattenkerk & K. E. T. Kerling (1976) Peptide substrates for chymosin (rennin). Kinetic studies with peptides including parts of the sequence 101-112 of bovine κ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta* 438: 265-272
- Visser, S. (1993) Symposium: Proteolytic Enzymes and Cheese Ripening. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science* 76: 329-350
- Walsh, G. (2004) Cap.10 En: Proteins. Biochemistry and Biotechnology. West Sussex: John Willey & Sons Ltd., pp. 393-417
- Yang, J., II. Shih, Y. Tzeng y S. Wang (2000) Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 406-413

Conclusiones



Cardos (Vincent Van Gogh)

1. Obtención de silprosinina

En el presente trabajo de tesis se han estudiado las peptidasas presentes en flores maduras de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Asteraceae*), especie conocida en nuestro país como “cardo mariano”, “cardo asnal” o “cardo blanco”, provenientes de los partidos de Tandil y La Plata (provincia de Buenos Aires).

Las preparaciones obtenidos por trituración en mortero congelando las flores frescas con N₂ líquido y extrayendo las proteínas a pH 3,0 tuvieron un tiempo de coagulación de leche de 17 ± 1 min, mientras que al obtener el extractivo a pH 7,0 el tiempo de coagulación fue de 240 ± 5 min. La extracción ácida tuvo además la ventaja de eliminar gran cantidad de impurezas de naturaleza proteica respecto a los extractivos obtenidos a pH 7,0, lo que fue demostrado por SDS-PAGE. La actividad coagulante de leche se mantuvo estable por el término de 12 meses al conservar los extractos crudos ácidos a -20 °C. Los extractivos ácidos presentaron escasa actividad enzimática a pH 6,0 con azocaseína, mientras que a pH 8,0 no mostraron actividad sobre el mencionado sustrato ni en presencia ni en ausencia de cisteína.

La aplicación de inhibidores específicos de grupo sobre la actividad coagulante de leche del extracto crudo demostró que esta actividad es consecuencia de la presencia de aspartilendopeptidasas inhibibles con peptatina A.

Mediante la aplicación de isoelectroenfoque y zimograma se determinó en el extracto crudo la presencia de una única banda polipeptídica activa a pH ácido con pI de 4,8, lo que confirma la naturaleza ácida de la peptidasa. Esta característica ha sido observada para otras peptidasas aspárticas de la familia *Asteraceae*.

El espectro visible del extracto crudo obtenido a pH 3,0 presentó un máximo de absorbancia en 533 nm debido a la presencia de pigmentos hidrosolubles (flavonoides) que se correspondió con el color fucsia intenso del extractivo. En tanto que el espectro ultravioleta presentó dos picos de absorbancia con máximos a 267 y 330 nm que se corresponden con la zona de máxima absorbancia de aminoácidos con restos aromáticos y de compuestos de naturaleza fenólica, respectivamente.

Los contaminantes de naturaleza no proteica presentes en el extractivo se eliminaron mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25)

obteniéndose una fracción que eluye dentro del volumen muerto que retuvo las actividades proteolíticas. Esta fracción presentó un contenido en proteínas de $264 \pm 4 \mu\text{g/ml}$, retuvo una actividad proteolítica con hemoglobina como sustrato de $0,40 \pm 0,02 U_{\text{Hb}}/\text{ml}$ y el tiempo de coagulación de la leche fue de 20 ± 2 minutos, presentando escasa diferencia con el tiempo de coagulación del extracto crudo sembrado (17 ± 1 minutos); a pH 6,6 no fue detectable actividad proteolítica empleando caseína como sustrato.

Tal como ha sido observado para otras peptidasas aspárticas la preparación enzimática parcialmente purificada tuvo una proteólisis óptima sobre hemoglobina como sustrato a pH ácido (3,8). Además la pepstatina A produjo la pérdida completa de la actividad coagulante de leche.

Al ser liofilizada en presencia de buffer cítrico-citrato de pH 3 la preparación parcialmente purificada retuvo un $85 \pm 3 \%$ de la actividad hemoglobinolítica y coaguló la leche 6 minutos más tarde que la muestra de partida (29,7 minutos contra 24 minutos). Este método fue además el más eficiente a la hora de ensayar distintas técnicas (liofilización, precipitación con acetona y redisolución en buffer y eliminación de agua por hidratación de Sephadex G-25) para la concentración de las preparaciones parcialmente purificadas, aunque sólo se recuperó el 50% de la actividad proteolítica esperada y la recuperación de proteínas no superó el 32% de las proteínas totales.

2. *Actividad coagulante de leche e hidrólisis controlada de caseínas*

La actividad coagulante de leche bovina del extractivo parcialmente purificado se vió afectada por la presencia de NaCl, decreciendo un $53 \pm 2 \%$ en presencia de una concentración 50 mM de sal, respecto a la actividad coagulante sin el agregado de dicho compuesto; para concentraciones mayores de sal la actividad continuó decreciendo. En presencia de concentraciones crecientes de CaCl_2 la actividad coagulante de leche mostró un comportamiento bifásico aumentando hasta un máximo que correspondió a una concentración de CaCl_2 de 30 mM y luego decreciendo al aumentar el contenido de la mencionada sal. Estos efectos fueron observados por otros autores para otras peptidasas coagulantes de leche.

La preparación enzimática parcialmente purificada perdió el 28 ± 4 % de la actividad coagulante de leche después de 14 minutos de incubación a 37 °C, mostrando que posee una baja estabilidad térmica.

Para degradar las caseínas se empleó una preparación enzimática parcialmente purificadas con las siguientes características: $0,128 \pm 0,002$ U_{FH}/ml, $0,083 \pm 0,003$ unidades de actividad coagulante de leche/ml (equivalente a un tiempo de coagulación de 20 ± 1 min) y 264 ± 4 µg/ml de proteína. En la hidrólisis de caseínas bovinas luego de 3 horas de incubación se observó degradación tanto de β-caseína como de α_{s1}-caseína (45 y 65 %, respectivamente). Para las caseínas caprinas la cinética de hidrólisis de β- y α_{s1}-caseínas fue idéntica durante las primeras 3 horas de reacción. La β-caseína caprina luego de 24 horas de incubación muestra un 40 % de degradación causada por la preparación enzimática parcialmente purificada, mientras que la fracción de α_{s1}-caseína fue degradado un 68 % luego del mismo período de incubación. Luego de 24 horas de incubación la fracción correspondiente a las α_s-caseínas ovinas fue degradada en un 76 %, mientras que la fracción de la β-caseína sólo fue hidrolizada en un 19 %.

La hidrólisis del caseinato bovino durante 24 horas produjo la formación de péptidos con los siguientes pesos moleculares: 24,0; 21,5; 17,0; 15,0; 13,0; 8,0; y 6,7; 5,0; y 3,0 kDa.

Por su parte en la hidrólisis del caseinato ovino durante 24 horas se intensifican bandas de 18,9; 16,5; 11,2; 8,6 kDa y se formaron nuevas bandas de péptidos más pequeños (5,8; 4,3 kDa). En el caso del caseinato caprino sólo se observó una banda importante de 14,4 kDa luego de 24 horas de hidrólisis.

Si se comparan los perfiles hidrolíticos de los caseinatos bovino, ovino y caprino realizados con cuajo comercial en los tres casos muestran un menor grado de hidrólisis que los perfiles de degradación obtenidos con el extracto crudo parcialmente purificado de *S. marianum*, especialmente los provenientes de leche ovina y caprina.

A partir de estos resultados el extracto crudo de flores de *S. marianum* podría probarse como un cuajo sustituto, preferentemente en quesos de leche ovina y/o caprina. Esto podría ser ventajoso en la producción de quesos con sabores

especiales aportados por los péptidos producidos en la hidrólisis enzimática especialmente aquellos provenientes de la hidrólisis de las α_s -caseínas.

3. Purificación de silprosina

La estrategia de purificación empleando FPLC incluyó exclusión molecular (Superdex S200) y cromatografía de intercambio aniónico. El empleo de estas técnicas permitió purificar a homogeneidad una peptidasa contenida en el extracto crudo. El nombre para la nueva peptidasa se propone de acuerdo a la nomenclatura utilizada para nombrar las peptidasas obtenidas a partir de flores de la familia *Asteraceae*.

De acuerdo al esquema de purificación silprosina fue purificada con un rendimiento de 70% y un grado de purificación de 2,45 veces respecto a la fracción con actividad proteolítica obtenida por cromatografía de exclusión molecular. El valor bajo de las veces de purificación se puede explicar por la alta proporción de peptidasa aspártica presente en las flores.

4. Caracterización de silprosina

Esta peptidasa demostró ser una enzima heterodimérica compuesta por dos subunidades de pesos 29,3 y 12,5 kDa, por lo tanto la enzima completa tendrían un peso de 41,8 kDa, este peso está dentro del orden del obtenido por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (44,7). Este resultado es concordante con los pesos obtenidos para otras peptidasas aspárticas de flores de *Asteraceae*.

La hidrólisis de la cadena β de insulina a pH 3,1 fue fuertemente inhibida por pepstatina A. El primer enlace escindido a pH ácido fue Tyr16-Leu17, aumentando los tiempos de reacción silprosina también hidrolizó el enlace Phe25-Tyr26. Con pequeñas variaciones de especificidad entre las distintas enzimas, las peptidasas aspárticas de plantas también muestran preferencia por aquellos enlaces en los que están involucrados residuos hidrofóbicos voluminosos o enlaces cercanos a este tipo de residuos.

Silprosina resultó ser más inespecífica al hidrolizar la cadena β de insulina a pH 6,0 que a pH 3,1, es decir a pH 6,0 la enzima fue capaz de hidrolizar el sustrato proteico en varios sitios distintos mientras que al pH más ácido hidrolizó un único enlace en el tiempo de reacción ensayado. Esta disminución de la especificidad de

corte al variar el pH ha sido observada por otros autores para otras enzimas aspárticas.

La actividad endopeptidásica de silprosina sobre el derivado fluorogénico del péptido sintético Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu fue máxima alrededor de pH 5,6, no mostrando actividad a valores de pH menores a 4,0.

Al ser incubada durante 15 minutos a 20 °C silprosina retuvo un 94,7% de actividad endosterolítica con el péptido sintético, mientras que luego de dos horas de incubación a la misma temperatura la actividad residual fue de 51,4%. Esta relativamente baja estabilidad de la actividad endosterolítica de la enzima purificada a la temperatura es coherente con lo observado para la actividad coagulante del extracto parcialmente purificado.

Los parámetros cinéticos de silprosina a pH 5,6 para el derivado fluorogénico del péptido Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu fueron: K_m 25,4 μ M, $V_{m\acute{a}x}$ 0,6044 μ M/min por mg de enzima. El valor de K_m es aproximadamente cuatro veces menor que el de las cardosinas A y B para el mismo péptido sintético.



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

DEDICACION.....
A.....
Fecha 04-04-05.....
Inv. B..... Inv..... B. 57390