

## Proteasas de Plantas Superiores. I. Características Generales, Rol Fisiológico y Aplicaciones.\*

NESTOR O. CAFFINI, LAURA M.I. LOPEZ\*\*, CLAUDIA L. NATALUCCI\*\*\*  
y NORA S. PRIOLO

*Laboratorio de Botánica Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas,  
Universidad Nacional de La Plata, calles 47 y 115, La Plata 1900, Argentina.*

RESUMEN. El presente trabajo es el primero de una serie destinada a actualizar el conocimiento de las enzimas proteolíticas de plantas superiores. En esta oportunidad se brinda información sobre los sistemas de clasificación de las proteasas y de algunos aspectos nomenclaturales de las mismas, así como de las modificaciones que habrían sufrido sus estructuras a través de la evolución de los seres vivos. Se incluyen, además, algunas interpretaciones sobre el rol de las enzimas proteolíticas en los procesos fisiológicos primarios y auxiliares de los vegetales y una breve reseña de sus principales aplicaciones.

SUMMARY. "Proteases of higher plants. I. General features, physiological role and applications". The present is the first paper of a series dealing with proteases of higher plants. General aspects of nomenclature, classification and evolution of proteolytic enzymes are here briefly described, together with their behaviour in primary and auxiliary physiological processes in plants. A short review on uses and applications of plant proteases is also given.

Las proteasas vegetales continúan ocupando una posición expectante en los estudios fisiológicos, bioquímicos, biotecnológicos y farmacológicos que se llevan a cabo en centros de investigación de todo el mundo. Por otra parte las enzimas proteolíticas en conjunto constituyen el grupo de hidrolasas de mayor aplicación en diversos procesos industriales y representan, en términos comerciales, bastante más de la mitad del total de enzimas que se comercializan en el mercado mundial.

Hace algunos años dimos a conocer una breve reseña<sup>1</sup> de las principales caracterís-

ticas de las proteasas de plantas superiores estudiadas hasta ese momento. El avance registrado a partir de entonces en el conocimiento de sus propiedades y mecanismos de acción, así como el descubrimiento de nuevas enzimas y la aparición de novedosas aplicaciones además de las ya conocidas nos ha movido a realizar una revisión seriada del tema, que en esta oportunidad se inicia con la discusión de los modernos criterios de clasificación utilizados, continúa con el rol fisiológico que se les atribuye a las proteasas y finaliza con la exposición de sus principales aplicaciones. Los aportes si-

\* Trabajo subsidiado por la CIC de la Provincia de Buenos Aires.

\*\* Becaria de la Universidad Nacional de La Plata.

\*\*\* Miembro de la Carrera del Investigador de la CIC de la Provincia de Buenos Aires.

PALABRAS CLAVE: Fitoproteasas; Plantas Superiores; Nomenclatura; Clasificación; Evolución; Rol Fisiológico; Usos.

KEY WORDS: *Plant Proteases; Higher Plants; Classification; Evolution; Physiological role; Uses.*

guientes estarán referidos a la obtención, purificación, caracterización y eventuales usos de los distintos grupos de fitoproteasas.

#### CLASIFICACION Y ASPECTOS NOMENCLATURALES

Las enzimas que desempeñan el rol central en la degradación de las proteínas han sido conocidas tradicionalmente como "proteasas", término equivalente al de "enzimas proteolíticas" y también al más moderno de "péptido-hidrolasas", pero ya hace sesenta años que Grassman y Dyckerhoff<sup>2</sup> hicieron una importante distinción entre las hidrolasas que actúan directamente sobre las proteínas ("proteinasas") y aquéllas que lo hacen sobre los péptidos que se producen durante el transcurso de la proteólisis ("peptidasas").

En el transcurso de la discusión de los mecanismos de acción hidrolítica surgieron los nombres alternativos de "endopeptidasas" para las que ejercen su acción en el interior de las cadenas y de "exopeptidasas" para las que hacen lo propio a partir de los extremos<sup>3</sup>, términos que manifiestan una obvia analogía con los que se usan para designar a las hidrolasas que actúan sobre otros biopolímeros (polisacáridos, polinucleótidos). Debe notarse que el sufijo "peptidasas" está utilizado aquí en el sentido amplio de "péptido-hidrolasas", por lo que la denominación actual de *endopeptidasas* resulta equivalente a la de *proteinasas*, en tanto que la de *exopeptidasas* se corresponde con la terminología anterior de *peptidasas* debida a Grassman y Dyckerhoff<sup>2</sup>.

Años más tarde el motivo de esta distinción resultó claro: depende de la aceptabilidad o no de los grupo amino o carboxilo terminales de la cadena polipeptídica en lugares específicos de la molécula de la enzima. Así, los grupos terminales no hacen falta —y típicamente no son tolerados— en los sitios activos de las endopeptidasas, razón

por la cual éstas actúan bien sobre cadenas largas, en puntos alejados de los extremos, pero su acción no es tan eficaz sobre los péptidos que aparecen como productos de la reacción inicial. En contraste, la especificidad de las exopeptidasas requiere que uno de los extremos ocupe un lugar específico dentro del sitio activo, por lo que estas enzimas ejercen escaso efecto degradativo sobre la proteína intacta, al estar limitada su acción a las uniones peptídicas cercanas a aquél.

Tanto los sitios activos de las endopeptidasas como los de las exopeptidasas cumplen el papel de permitir la unión con el sustrato apropiado y de catalizar luego la hidrólisis de la unión peptídica específica<sup>4</sup>. De acuerdo a la terminología introducida por Schechter y Berger<sup>5</sup>, la zona de unión del *sitio activo* puede ser dividida en *subsitios* o *sitios específicos* (S), cada uno de los cuales permite la ubicación de un residuo aminoacídico o de un grupo bloqueante (ver "omega-peptidasas") del sustrato. Los subsitios están ubicados a ambos lados del *sitio catalítico* y a partir de él son numerados correlativamente, ya sea en dirección al extremo N-terminal ( $S_1, S_2, S_3$ , etc.) o hacia el C-terminal ( $S'_1, S'_2, S'_3$ , etc.). Los aminoácidos de la zona del sustrato que interactúa con la proteasa son numerados ( $P_1, P_2, P'_1, P'_2$ , etc.) de acuerdo a los subsitios en los cuales se ubican. La Fig. 1 ilustra esquemáticamente la interacción enzima-sustrato en las inmediaciones del sitio activo de una endopeptidasa (a) y de una exopeptidasa (b).

La mayoría de las proteasas son inconfundiblemente endopeptidasas o exopeptidasas, pero algunas de ellas exhiben actividad de ambos tipos. Por convención, cualquier enzima que tenga acción proteínica distintiva es considerada como una endopeptidasa, aun cuando muestre además acción exopeptidásica.

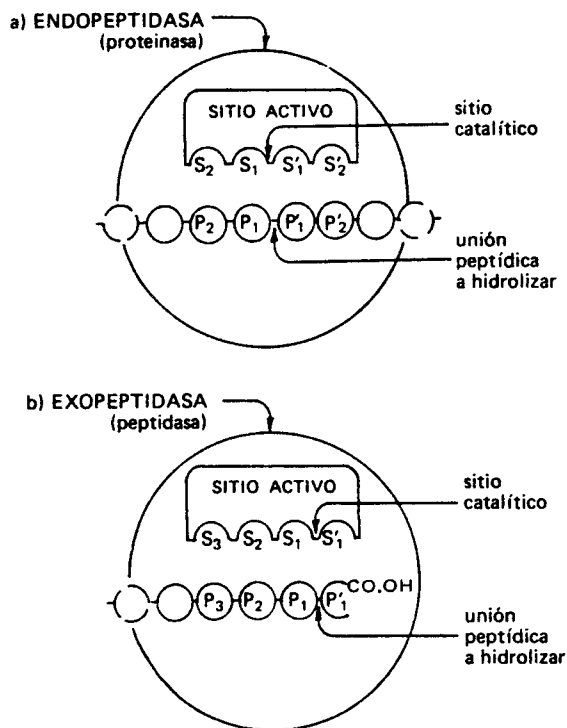


Figura 1. Representación esquemática de la forma de unión entre la enzima y el sustrato en (a) una endopeptidasa y (b) una exopeptidasa (en este caso una carboxipeptidasa). Ver en el texto la explicación de los símbolos adoptados y la terminología utilizada. (Adaptado de Mc Donald<sup>4</sup>).

Desde el punto de vista fisiológico, una consecuencia inevitable de las especificidades de ambos tipos de proteasas es que las endopeptidasas son las responsables de los primeros estadios de la proteólisis, en tanto que las exopeptidasas inician más tarde su acción y eventualmente completan la degradación hasta la liberación de los aminoácidos constitutivos. Como ocurre en la mayor parte de los procesos bioquímicos, la reacción inicial catalizada por la endopeptidasa es la que limita la velocidad de reacción; una vez que la degradación de la proteína ha comenzado, la reacción progresa rápidamente y es escasa o nula la acumulación de los productos de esa degradación parcial<sup>6</sup>.

## PROTEINASAS O ENDOPEPTIDASAS

Las proteinasas difieren de casi todas las demás enzimas en que, invariablemente, su especificidad de sustrato resulta extremadamente difícil de definir, hecho que movió a Hartley<sup>7</sup> a proponer una clasificación de las mismas basada en las características de sus respectivos mecanismos catalíticos. A partir de esa propuesta las endopeptidasas se dividen en cuatro grupos: *proteinasas serínicas* (EC 3.4.21), *tiolproteinasas* (EC 3.4.22, actualmente denominadas *proteinasas cisteínicas*), *proteinasas ácidas* (EC 3.4.23, modernamente llamadas *proteinasas aspárticas*) y *metalproteinasas* (EC 3.4.24), a los que debe agregarse un quinto grupo (EC 3.4.99) de existencia efímera, que incluye a proteinasas de mecanismos catalíticos aún no identificados<sup>8</sup>.

El mecanismo general de acción de los dos primeros grupos de proteinasas responde a un esquema que incluye la siguiente secuencia de reacciones, en la que los productos son liberados en pasos sucesivos.



La primera etapa consiste en la formación del complejo no covalente enzima-sustrato (ES), en donde  $K_s$  es la constante de equilibrio. Ello implica la existencia de interacciones entre subsitios específicos de la enzima y determinadas zonas del sustrato, factores decisivos en la selectividad de la enzima por el sustrato.

En el segundo paso se produce el ataque del grupo carbonilo de una unión peptídica sensible del sustrato por parte de un grupo químico activado perteneciente al sitio activo de la enzima, lo que provoca la liberación de la porción C-terminal ( $X_1$ ) de la cadena polipeptídica original (en la que su nuevo aminoácido N-terminal proviene de la unión peptídica escindida), en tanto que

la porción N-terminal del sustrato queda asociada a la enzima en forma de una acil-enzima (ES').

La última reacción que tiene lugar es la incorporación de una molécula de agua que regenera la enzima y libera el segundo producto ( $X_2$ ), representado por la fracción N-terminal de la cadena polipeptídica y en la que el nuevo aminoácido C-terminal procede de la unión peptídica hidrolizada.

Los distintos tipos de proteinasas pueden diferenciarse en base a las siguientes características: 1) el requerimiento de la existencia en el sustrato de determinados sitios de unión, que permitan la orientación correcta del mismo en la posición exigida por la maquinaria catalítica, 2) la naturaleza del grupo activo de la enzima responsable de la formación temporaria de la acil-enzima (ES') y 3) la identidad de los grupos que catalizan la descomposición de este intermedio<sup>6</sup>.

### *Evolución de las endopeptidasas*

Uno de los aspectos más valiosos de la clasificación de las proteinasas de acuerdo a su mecanismo de acción catalítica radica en que permite establecer relaciones evolutivas entre ellas. De este modo puede comprobarse que existe una homología evolutiva dentro de cada uno de los cuatro grupos y que algunos de ellos no son monofiléticos: las proteasas serínicas derivarían de dos líneas ancestrales y las cisteínicas de por lo menos cuatro, en tanto que la situación no es clara en el caso de las metaloproteiniasas; por el contrario, las proteinasas aspárticas —de origen más reciente— parecerían provenir de un único tronco enzimático primitivo<sup>9</sup>.

a) *Proteiniasas serínicas*. Hay dos "superfamilias" de proteiniasas serínicas: la superfamilia de la *tripsina* y la de la *subtilisina*<sup>10</sup>. Las enzimas que pertenecen a esta última han sido halladas únicamente en bacterias,

en tanto que las que integran la primera están presentes tanto en microorganismos procarióticos como eucarióticos, así como en plantas, invertebrados y vertebrados.

Dentro de la superfamilia de la tripsina, las proteiniasas primitivas de las myxobacterias y streptomycetes están formadas por una cadena polipeptídica de 200 a 220 aminoácidos, pero en la mayoría de los animales superiores la evolución se ha manifestado a través del alargamiento del extremo N-terminal para formar "péptidos de activación" (ej. tripsinógeno), que requieren ser removidos para generar la proteiniasa activa (tripsina, en este caso) integrada por alrededor de 250 restos aminoacídicos que contienen la denominada "tríada activa": serina, histidina y ácido aspártico.

b) *Proteiniasas cisteínicas*. Han sido halladas tanto en bacterias<sup>11</sup> y en microorganismos eucarióticos<sup>12</sup> como en animales<sup>13</sup> y plantas<sup>14</sup>.

La proteiniasa cisteínica más estudiada es la papaína, obtenida a partir del látex de *Carica papaya*, que encabeza la superfamilia cisteínica de mayor distribución. Muchos protozoos contienen endopeptidasas semejantes a papaína<sup>12</sup>, habiéndose postulado que los ancestros enzimáticos del grupo estuvieron localizados en las vacuolas digestivas de un protozoo primitivo, de donde habrían evolucionado hasta su ubicación en las vacuolas de las células vegetales (y de allí al látex) y animales<sup>6</sup>.

Dos cisteinil-proteasas de origen bacteriano son las representantes más conspicuas de otras dos superfamilias, cuyos miembros parecen estar restringidos a este grupo taxonómico: la *clostripaína* de *Clostridium histolyticum*<sup>15</sup> y una proteiniasa estreptocócica<sup>16</sup>. La clostripaína es altamente específica para sustratos con un residuo arginina en P<sub>1</sub> y es activada por iones calcio, en tanto que la última se presenta en forma de zimógeno inactivo que requiere de una proteo-  
li-

sis limitada para poner de manifiesto su actividad, hecho absolutamente infrecuente en las proteinasas cisteínicas.

Finalmente, la superfamilia cisteínica de la *calpaína* agrupa un conjunto de formas enzimáticas aisladas de vertebrados e invertebrados, que son calcio-dependientes y poseen una estructura molecular altamente conservativa, compuesta de dos subunidades de pesos moleculares 80.000 (que contiene el esencial residuo cisteínico) y 30.000<sup>17</sup>.

c) *Proteinimasas aspárticas*. Comprenden una única superfamilia confinada a los eucariotes, lo que sugiere que se trata de uno de los grupos de endopeptidasas más jóvenes. Su representante típico es *pepsina*, aparente precursor evolutivo de las demás proteinasas aspárticas integrantes de los fermentos gástricos de los mamíferos<sup>18</sup>. Las aspartilproteinimasas fúngicas (*Rhizopus chinensis*, *Penicillium ianthinellum*, *Endothia parasitica*) también pertenecen a la misma superfamilia<sup>12</sup> y es probable que ocurra lo propio con las proteinimasas de las plantas insectívoras.

d) *Metaloproteinimasas*. Son muy antiguas y están ampliamente distribuidas en bacterias y hongos, así como en organismos superiores. Se conoce mucho más de las metalo-exopeptidasas que de las metaloproteinimasas, como lo prueba la clasificación propuesta por Hartley<sup>7</sup>, en la que dentro de este grupo incluye tan sólo carboxipeptidasas, aminopeptidasas y dipeptidasas. Los sitios activos de algunas exopeptidasas poseen características similares a los de las metaloproteinimasas (metalo-endopeptidasas), donde el cinc es el metal catalíticamente activo, pero aún no está claro si esas similitudes reflejan una homología evolutiva o si se trata de un proceso de convergencia.

#### Sitios activos e inhibidores

a) *Proteinimasas serínicas*. El grupo hidro-

xilo de serina ataca al grupo carbonilo de la unión peptídica sensible —como ya se ha mencionado al hacer referencia al mecanismo general de acción— a través de una reacción catalizada por la histidina y que conduce a la formación de un intermediario tetrahédrico y a la transformación de la base imidazol en un ión imidazolío, que inhibe la liberación del protón al solvente. El intermediario se descompone por catálisis ácida originando la acil-enzima (ES') (con su base imidazólica regenerada) y liberando un grupo amino o alcohol, de acuerdo a que la unión hidrolizada sea una amida (actividad amidásica) o un éster (actividad esterásica), respectivamente. Finalmente, la acil-enzima resulta hidrolizada por reversión del mecanismo inicial, donde el hidroxilo del agua actúa como reactivo nucleofílico en lugar del hidroxilo de la serina<sup>19</sup>. Es de destacar que las enzimas pertenecientes a las dos superfamilias (tripsina y subtilisina) exhiben similares mecanismos de acción, lo que ciertamente constituye un fenómeno de evolución convergente. La actividad de las proteinimasas serínicas suele ser máxima a valores de pH ligeramente alcalinos y no requiere activadores, pero los iones calcio intervienen en la activación de algunas proenzimas y estabilizarían a algunas de las enzimas.

La especificidad de las endopeptidasas serínicas es extremadamente diversa, pero los subsitios S parecen ser más importantes que los S', de lo cual el ejemplo más simple es el de la tripsina, que requiere inevitablemente la ocupación del subsitio S<sub>1</sub> por una cadena lateral de lisina o arginina del sustrato.

El diisopropilfluorofosfato (DFP) es el inhibidor más útil para la identificación de proteinimasas serínicas, ya que tiene acción escasa o nula sobre otro tipo de endopeptidasas, pero su acción es irreversible. Se han ensayado, no obstante, inhibidores reversi-

bles naturales y sintéticos, aunque en estos casos la inhibición resulta ser más selectiva (actúan sólo sobre algunos tipos de proteínas serínicas) y con menor especificidad de grupo (también inhiben proteinasas cisteínicas).

b) *Proteinasas cisteínicas*. La sensibilidad de papaína, ficina y bromelina a ser inactivadas por reactivos que bloquean los grupos sulfhidrilo por conversión en puentes disulfuro y su ulterior reactivación por agentes reductores llevó a Hartley<sup>7</sup> a denominarlas "tiol-proteinasas". Dado que el aminoácido cisteína es el único que posee un grupo sulfhidrilo (tiol) en la cadena lateral (que en las tres proteinasas citadas corresponde al residuo aminoacídico Cys-25), se ha recomendado sustituir el término "tiol-proteinasas" por el de "proteinasas cisteínicas"<sup>8</sup>.

El mecanismo catalítico propuesto es similar al de las proteinasas serínicas, donde los grupos tiol e imidazol de cisteína e histidina, respectivamente, conforman el reactivo nucleofílico del sitio catalítico<sup>19</sup>.

Las condiciones requeridas para que se manifieste la actividad de las cisteinil-proteinasas varía considerablemente con la enzima y el tipo de sustrato sobre el que actúan: las ubicadas en los lisosomas lo hacen habitualmente a pH ácido, en tanto que la papaína tiene un amplio rango de pH óptimo y las calpaínas son activas a pH superiores a 7,5. En el caso de enzimas del tipo de la papaína es habitualmente necesario el agregado de agentes tales como la cisteína o el ditiotreitól y también el de sustancias quelantes, ya que los iones metálicos pueden provocar inhibición aún en presencia de sustancias reductoras. Obviamente en el caso de las calpaínas y clostripaína los agentes quelantes son contraproducentes, ya que los iones calcio hacen falta para que se exprese la actividad proteolítica.

Los subsitios específicos de papaína han

sido relativamente bien establecidos, consignándose 5 a 7 de ellos, de los cuales el más importante parece ser el S<sub>2</sub>, un "bolsillo" hidrofóbico que permite la unión de la cadena lateral de fenilalanina del sustrato<sup>20</sup>. Aunque la proteinasa estreptocócica integra otra superfamilia, tiene también un subsitio S<sub>2</sub> que muestra preferencia por la cadena lateral de la fenilalanina<sup>16</sup>; en contraste, la proteinasa de *Clostridium histolyticum* es altamente específica para la hidrólisis de uniones peptídicas en las que interviene arginina, tanto en sustratos naturales como sintéticos<sup>15</sup>.

La identificación de las proteinasas cisteínicas es sencilla, ya que su actividad se incrementa por el agregado de sustancias reductoras o de reactivos que contengan grupos sulfhidrilo y es inhibida fuertemente por el iodoacetato y en menor medida por la N-etilmaleimida, en tanto que los reactivos mercuriales inactivan reversiblemente estas enzimas.

c) *Proteinasas aspárticas*. Hartley<sup>7</sup> las denominó "proteinasas ácidas", ya que los bajos valores de pH óptimo (3,0-5,5) hacían suponer la participación de grupos carboxilo en el sitio catalítico, presunción luego confirmada por la inactivación de la pepsina por agentes bloqueantes de grupos carboxilo<sup>21</sup>. La denominación de "proteinasas aspárticas" se adoptó luego de comprobarse que los residuos Asp-32 y Asp-215 formaban parte del sitio activo<sup>22</sup>. El mecanismo catalítico implicaría la acción de una molécula de agua sobre el carbonilo sensible, con la mediación de los grupos carboxilato del centro activo en la transferencia de protones; es probable que no haya intermediarios acil-enzima ni amino-enzima.

En general las proteinasas aspárticas actúan mejor sobre uniones peptídicas de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas (Leu-Tyr, Tyr-Leu, Phe-Phe, Phe-Tyr, etc.), pero su afinidad por el sustrato varía

grandemente: la pepsina A degrada la mayor parte de las proteínas hasta pequeños péptidos, pero la quimosina ("rennin", en la antigua denominación inglesa) coagula la leche por medio de la escisión selectiva de una unión peptídica de la  $\kappa$ -caseína.

Las proteinasas aspárticas tienen relativamente pocos inhibidores: el complejo de la diazoacetil-norleucina metiléster con iones cobre inactiva la mayoría de ellas, pero el más efectivo es la pepstatina, un isovaleril-pentapéptido de origen microbiano<sup>23</sup>.

d) *Metaloproteinasas*. La termolisina, aislada de cultivos de *Bacillus thermoproteolyticus*, es una de las más estudiadas: en sus sitio activo posee un átomo de cinc unido a cadenas laterales de histidina y de glutámico; la molécula contiene también cuatro sitios para la unión de iones calcio, pero la acción de éstos estaría más relacionada con la estabilidad que con la actividad catalítica<sup>24</sup>.

El mecanismo de acción propuesto por Kester y Matthews<sup>25</sup> implica la participación de un átomo de zinc, de un residuo histidina (His-231) y uno de glutámico (Glu-143). El residuo Glu-143 promueve el ataque nucleofílico (directamente o a través de una molécula de agua) sobre el grupo carbonilo de la unión peptídica sensible, que ya ha sido parcialmente despolarizada por el zinc. Al mismo tiempo o a continuación del paso anterior, el residuo His-231 dona un protón al nitrógeno de la unión peptídica para formar un intermediario tetraédrico que luego permite la ruptura de aquélla para formar los productos de hidrólisis.

Como en las proteinasas aspárticas, dentro de las metaloproteinasas hay una amplia gama en cuanto a la especificidad de sustrato y, al igual que aquéllas, tienen preferencia por las uniones peptídicas integradas por aminoácidos con cadenas laterales no polares. Entre los inhibidores figuran, ob-

viamente, los agentes quelantes, en especial los que tienen marcada afinidad por el zinc.

## PEPTIDASAS O EXOPEPTIDASAS

En tanto que las endopeptidasas son casi siempre moléculas monoméricas de bajo peso molecular, muchas exopeptidasas están integradas por dos o más subunidades, con pesos moleculares relativos ( $M_r$ ) de varios cientos de miles. Una buena parte de ellas son metalo-enzimas con una fracción glucídica asociada y en general son menos estables que las proteinasas<sup>4</sup>.

Los diferentes tipos de exopeptidasas están esquematizados en la Fig. 2. Para clasificarlas se tienen en cuenta el tamaño del sustrato (esto permite separar a las di- y tripeptidasas del resto), la identidad del extremo atacable (N- o C-terminal), el estado de este último (bloqueado en el caso de las omega-peptidasas) y la magnitud del fragmento escindido (aminoácido, dipéptido o tripéptido terminales).

En razón de que las exopeptidasas se agrupan de acuerdo a características de especificidad y no de mecanismo de acción, las enzimas ubicadas dentro del mismo grupo no son necesariamente homólogas y las similitudes en especificidad sólo pueden explicarse en términos de convergencia, desde el punto de vista evolutivo<sup>6</sup>.

a) *Aminopeptidasas o aminoacil peptidasas*. Son también llamadas  $\alpha$ -aminoacil péptido-hidrolasas, pues muestran preferencia por separar el aminoácido N-terminal del péptido. La mayoría de las aminopeptidasas "reconocen" al aminoácido terminal, pero en algunos casos la enzima "reconoce" al aminoácido subterminal. Así, el nombre "prolil-aminopeptidasa" describe una exopeptidasa que requiere (o al menos prefiere) sustratos en los que prolina es el aminoácido N-terminal, en tanto que la denominación "prolin- $\gamma$ -amino peptidasa" se aplica

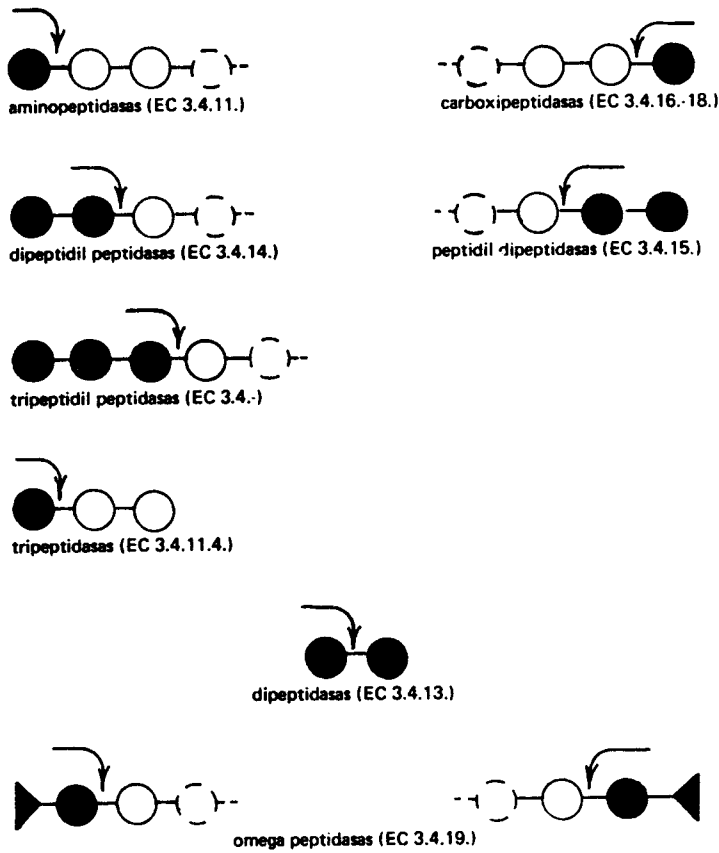


Figura 2. Tipos de exopeptidasas. Los círculos llenos representan los fragmentos liberados (adaptado de Barret <sup>6</sup>).

a una enzima que libera cualquier aminoácido N-terminal, siempre que esté unido a prolina <sup>4</sup>.

b) *Dipeptidil- y tripeptidilpeptidasas.* Hidrolizan la unión formada entre el grupo carboxilo de un di- o tripéptido y el grupo amino de un polipéptido (de allí el nombre), liberando dipéptidos o tripéptidos desde el extremo N-terminal, en la mayoría de los casos en forma secuencial, por lo que los sustratos resultan altamente degradados.

c) *Carboxipeptidasas.* Son responsables de la liberación de los aminoácidos C-terminales de las cadenas peptídicas. Al igual que las aminopeptidasas, pueden reconocer el

aminoácido terminal o el subterminal. A pesar de que las exopeptidasas no se clasifican en base a su mecanismo de acción, se han previsto códigos separados para las carboxipeptidasas serínicas (EC 3.4.16.), metalo carboxipeptidasas (EC 3.4.17.) y carboxipeptidasas cisteínicas (EC 3.4.18), dado el conocimiento que se posee del mecanismo catalítico de muchas de ellas <sup>8</sup>.

d) *Peptidil dipeptidasas.* Estas enzimas atacan la unión peptídica establecida entre el grupo carboxilo terminal de un polipéptido y el grupo amino terminal de un dipéptido, es decir que separan un dipéptido a partir del extremo C-terminal de la cadena polipeptídica.



e) *Dipeptidasas y tripeptidasas*. Actúan sobre di- o tripeptidos. Se conocen muchas dipeptidasas que exhiben especificidad absoluta (deben "reconocer" los dos aminoácidos) o parcial (solamente a uno de ellos). Las tripeptidasas se comportan usualmente como tripéptido-aminopeptidasas, liberando el aminoácido N-terminal de muchos tripeptidos, pero en algunos casos pueden actuar como tripéptido-carboxipeptidasas<sup>4</sup>.

f) *Omega peptidasas*. Se incluyen dentro de este grupo a un conjunto de enzimas que actúan sobre los extremos de sustratos en los que el grupo amino o carboxilo terminal está bloqueado o donde la unión no es  $\alpha$ -peptídica (casos en los que la unión peptídica terminal involucra al grupo  $\omega$ -carboxilo de los ácidos glutámico o aspártico o al grupo  $\epsilon$ -amino de lisina).

#### ROL DE LAS PROTEASAS EN PROCESOS FISIOLÓGICOS PRIMARIOS

La importancia fisiológica de las proteasas proviene del hecho de que la degradación de las proteínas y la reutilización de sus aminoácidos constitutivos resultan fundamentales para todos los procesos del desarrollo: la movilización de las proteínas de reserva contenidas en las semillas durante la germinación permite el desarrollo de la plántula, el recambio de las proteínas existentes y su reemplazo por otras durante el crecimiento y diferenciación constituyen la clave para la adaptación al medio ambiente y durante la senescencia foliar las proteínas son hidrolizadas y los aminoácidos almacenados para la siguiente generación.

#### *Movilización de proteínas de reserva en semillas*

a) *Cereales*. En razón de su importancia económica, los granos uniseminados de cereales han sido objeto de numerosos estudios en este sentido. Las proteínas de reser-

va están presentes en forma de cuerpos proteicos, localizados principalmente en el endosperma. Su origen intracelular es aún incierto, o al menos no único, ya que existen evidencias de su formación tanto en las vacuolas como en el retículo endoplasmático rugoso. Los cuerpos proteicos están limitados por una membrana, que en las etapas finales de la maduración de los granos puede ir degradándose para facilitar la acción de las proteasas presentes en el mismo<sup>26</sup>.

En 1924 Osborne<sup>27</sup> propuso dividir a las proteínas vegetales en cuatro grupos, atendiendo a sus características de solubilidad: 1) *albúminas*, solubles en agua a pH neutro o ligeramente ácido, 2) *globulinas*, insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas, 3) *glutelinas*, insolubles en agua o en soluciones salinas pero solubles en soluciones fuertemente ácidas o básicas y 4) *prolaminas*, solubles en soluciones etanólicas. Las albúminas y globulinas que se encuentran en los granos de cereales son de naturaleza citoplasmática, están presentes principalmente en el embrión y en la capa de aleurona y consisten esencialmente en enzimas e inhibidores enzimáticos<sup>28</sup>, pero durante el transcurso de la germinación su destino último parece ser similar al de las proteínas de reserva. Estas últimas están representadas mayoritariamente por prolaminas, con la excepción de arroz y avena, donde predominan las glutelinas<sup>29</sup>.

Cuando germinan los granos, las proteínas de reserva son degradadas a péptidos y aminoácidos, que son entonces transferidos al escutelo y utilizados para la formación de la plántula. Las proteasas responsables de este proceso deben tener una elevada afinidad por el sustrato endógeno, poseer una ubicación celular próxima al mismo y un alto nivel de actividad enzimática. En general, las endopeptidasas con pH óptimo ácido y las carboxipeptidasas serínicas son las que reúnen estas condiciones y hay acuerdo

en atribuir a la acción de las mismas la descomposición de las proteínas de reserva de los cereales<sup>30</sup>.

b) *Leguminosas*. Al igual que en los cereales, en la mayoría de semillas de Dicotiledóneas las proteínas de reserva están acumuladas en cuerpos proteicos, también llamados granos de aleurona. Estas organelas se distribuyen a lo largo de todo el embrión, de preferencia en los cotiledones, así como en el endosperma de las semillas albuminadas<sup>29</sup>. En algunos casos suelen aparecer inclusiones embebidas en la matriz del cuerpo proteico: los *globoides*, que contienen sales de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  o  $\text{K}^+$  del ácido fítico (hexafosfato de mioinositol) y los *crystaloides*, depósitos parcialmente cristalinos de las principales globulinas de reserva de la semilla.

Como ya se ha mencionado, las principales proteínas de reserva de los cereales son glutelinas y prolaminas, habitualmente ausentes o en bajas concentraciones en las Dicotiledóneas. Estas almacenan generalmente globulinas y en algún caso albúminas, como lectinas e inhibidores de proteasas, que se comportarían también como reservorios proteicos<sup>31</sup>.

Las proteínas de reserva más estudiadas, en mérito a su interés económico, han sido las de las Leguminosas. Son esencialmente globulinas y existen dos tipos principales: las *leguminas* y las *vicilinas*. La composición aminoacídica es similar, pero en tanto que las primeras tienen pesos moleculares relativos ( $M_r$ ) entre 300.000 y 400.000 y están compuestas por subunidades ácidas y básicas, las segundas son glicoproteínas de menor peso molecular ( $M_r$  110.000 a 190.000) y más heterogéneas<sup>32</sup>.

En muchas Dicotiledóneas, pero de manera especial en las Leguminosas, suelen acumularse cantidades importantes de *lectinas* (hasta el 20% del contenido total de proteínas), por lo que pueden ser conside-

radas como una fuente potencial de proteínas de reserva. Conocidas por su propiedad de aglutinar eritrocitos (también se las denomina por ello fitohemaglutininas), las lectinas pueden ser definidas como proteínas de origen no inmune con capacidad de unirse firmemente a los azúcares sin ejercer acción enzimática sobre ellos<sup>33</sup>. Su peso molecular promedio oscila entre 110.000 y 135.000 y son tetrámeros de subunidades de  $M_r$  25.000 a 35.000.

Las semillas de Leguminosas se caracterizan por ser productoras de *inhibidores de proteinasas*, proteínas de bajo peso molecular y alto contenido en aminoácidos azufrados, que pueden llegar a representar hasta el 6% de las proteínas totales. Si bien se les han atribuido funciones de defensa ante agentes exógenos y de regulación de la proteólisis endógena, su elevada concentración en la semilla y su concomitante desaparición durante la germinación autoriza a suponer que cumplen funciones secundarias como proteínas de reserva, al menos de aminoácidos azufrados.

Las enzimas proteolíticas responsables de la degradación de las proteínas de reserva contenidas en las semillas incluyen tanto a endopeptidasas como a exopeptidasas. Existen endopeptidasas en las semillas en dormancia, pero han sido aún poco estudiadas y no está claro que participen en la hidrólisis de las proteínas endógenas. Las endopeptidasas que aparecen durante la germinación han recibido mayor atención, por suponérselas involucradas en el proceso de movilización de las reservas proteicas: son proteasas cisteínicas de bajo  $M_r$  (20.000 a 40.000), su rango de pH óptimo está situado entre 3,5 y 6,5, serían sintetizadas *de novo* en el transcurso de la germinación y en algunas especies han sido localizadas en los cuerpos proteicos o en vacuolas que se producen como consecuencia de la fusión de los mismos<sup>34, 35</sup>.

Dentro de las exopeptidasas corresponde mencionar a las carboxipeptidasas, las arilamididasas y las peptidasas alcalinas. Al igual que en el caso de los cereales, las carboxipeptidasas son serínicas, de pH óptimo 5-6 y altamente inespecíficas, ya que habitualmente pueden liberar cualquier residuo aminoacídico ubicado en el extremo C-terminal. Las arilamididasas (así denominadas por su capacidad de hidrolizar uniones peptídicas en las que el grupo amino es aportado por un aminoácido aromático) son de naturaleza cisteínica y actuarían preferentemente sobre di-, tri- y oligopéptidos en un rango de pH entre 6,5 y 8,5. Finalmente, las peptidasas alcalinas (pH óptimo 7,5-10), capaces de hidrolizar di- y tripéptidos, completarían aparentemente la maquinaria proteolítica de las semillas de Leguminosas y de otras Dicotiledóneas.

La información disponible parece indicar que las proteínas de reserva de las semillas no constituyen el sustrato inicial de las proteasas presentes en la misma, tanto por estar ubicadas en compartimientos citoplasmáticos diferentes como porque la desecación las ha inactivado reversiblemente. Por el contrario, la proteólisis sería iniciada por una endopeptidasa (¿sintetizada *de novo*?) con alta especificidad para las proteínas de reserva, a las que degradarían parcialmente como consecuencia de la ruptura de algunas uniones peptídicas específicas. Las cadenas polipeptídicas que resultan de la acción anterior serían entonces aptas para la acción de las endopeptidasas hasta entonces inactivas y eventualmente de las carboxipeptidasas; la acción conjunta de ambas produciría los oligopéptidos sobre los que finalmente actuarían las arilamididasas y peptidasas alcalinas<sup>36</sup>.

#### *Procesos senescentes*

El más estudiado de todos ellos es el de la senescencia foliar. El metabolismo de la

hoja se ve sensiblemente modificado con la aparición de la senescencia: cesa la asimilación de nutrientes inorgánicos y se movilizan los existentes, decrece la actividad enzimática general y comienza la degradación de proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, carotenoides y lípidos de membrana. La senescencia foliar no constituye de ningún modo una etapa pasiva de decaimiento o decrepitud, sino un proceso bien organizado y regulado de la economía nutritiva de las plantas superiores, ya que los compuestos de bajo peso molecular producidos (entre ellos los aminoácidos) son transportados y utilizados en otros órganos de la misma planta<sup>37</sup>.

Las proteínas degradadas durante la senescencia foliar son diferentes a las proteínas de reserva movilizadas durante la germinación de las semillas y están constituidas esencialmente por enzimas y proteínas de membrana. Dada la trascendencia de la función fotosintética en las hojas, no es sorprendente que la ribulosadifosfatocarboxilasa (enzima responsable de la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico en las plantas C<sub>3</sub>) represente más de la mitad de las proteínas solubles de las mismas<sup>38</sup>.

A pesar de existir evidencias de una clara relación entre la senescencia foliar y la intensificación de la proteólisis, aún se está lejos de conocer cuáles son las proteasas involucradas y en qué lugar ejercen su acción. La mayor parte de las proteínas foliares tienen ubicación extravascular, pero tanto las endopeptidasas como las carboxipeptidasas están contenidas dentro de las vacuolas. No obstante, parece posible que sean varios los compartimientos celulares que contribuyan a la hidrólisis total, pero los conocimientos de los que actualmente se dispone no permiten asegurar si el mismo o diferentes sistemas enzimáticos son los que operan en cada uno de los casos<sup>39</sup>.

La eventual participación de proteasas

específicas en otros procesos de senescencia requiere todavía mucho aporte experimental. En nódulos radiculares (tanto cilíndricos como esféricos) de algunas Leguminosas se ha medido la variación de la actividad proteásica durante la ontogenia y senescencia de los mismos, e incluso se han aislado y caracterizado algunas proteasas<sup>40, 41</sup>, pero la información disponible no permite aún establecer una relación de causalidad entre la acción de las proteasas y la senescencia de los nódulos con respecto a la limitación de la fijación del nitrógeno por las raíces<sup>42</sup>.

Similares consideraciones pueden aplicarse a los cloroplastos. No existen pruebas evidentes de que alguna enzima proteolítica juegue un rol particular o específico en la senescencia de los cloroplastos, a pesar de haberse comprobado que éstos contienen un amplio espectro de hidrolasas, incluídas varias proteasas. Lo que sí parecería estar confirmado es que las enzimas responsables de los aspectos degradativos de la senescencia operan desde dentro del cloroplasto, descreditando la teoría de que la vacuola engloba los cloroplastos o fragmentos de ellos y que las hidrolasas vacuolares digieren sus componentes<sup>43</sup>.

#### PARTICIPACION DE LAS PROTEASAS EN PROCESOS FISIOLÓGICOS AUXILIARES

Resulta sorprendente que las proteasas vegetales primeramente descubiertas, más estudiadas y mejor caracterizadas no ejercen aparentemente ninguna función en los procesos de crecimiento y desarrollo. La gran mayoría de las proteasas vegetales codificadas<sup>8</sup> pertenece a este grupo, entre las que corresponde mencionar a papaína (EC 3.4.22.2), ficina (EC 3.4.22.3) y bromelina (EC 3.4.22.4) como sus representantes más conspicuas. Por analogía con los metabolitos secundarios de las plantas, estas proteasas podrían incluirse dentro de un grupo de

“proteínas secundarias”, cuya presencia —al igual que la de aquéllos— estaría más bien destinada a la interacción con otras especies animales y vegetales que a la participación en su propio metabolismo primario. Así, en muchas semillas y tubérculos se hallan presentes proteínas que inhiben la acción de enzimas digestivas de los animales (tripsina, quimotripsina, etc.), pero no de sus propias proteasas, en lo que constituye una eficiente defensa contra el ataque de herbívoros; las lectinas constituyen otro grupo de proteínas sin función aparente en el propio metabolismo vegetal, a quienes se han atribuido también funciones de defensa y de participación en la interacción leguminosa-*Rhizobium*; constituyen un tercer ejemplo las enzimas que carecen de sustrato en la propia planta, como ocurre con la quitinasa (la quitina es componente de la pared celular de hongos y bacterias), que actuaría como mecanismo defensivo frente a la acción de hongos y bacterias patógenas<sup>44</sup>.

#### *Influencia de las proteasas en la incorporación de nutrientes*

Muchos animales dependen de las proteínas producidas por otros organismos para su metabolismo nitrogenado, pero la mayoría de las plantas autotróficas utilizan para ello nutrientes inorgánicos, por lo que los procesos digestivos no revisten mayor trascendencia en la incorporación de nutrientes, salvo en los pocos casos que se mencionan a continuación.

a) *Plantas carnívoras*. La capacidad desarrollada por un reducido número de plantas para atrapar y digerir pequeños animales (esencialmente insectos) ha intrigado a los biólogos durante mucho tiempo. Las Nepenthaceae han modificado su arquitectura foliar, transformando las hojas en órganos huecos en cuya base se acumula un fluido

digestivo del cual se ha aislado y purificado una proteinasa aspártica —la nepenthesina o nepenthacina (EC 3.4.23.12)— similar a pepsina<sup>45</sup>. De hojas de *Drosera peltata* se ha extraído una proteasa semejante<sup>46</sup>, pero la presencia de proteinasas ácidas ha sido detectada también en *Dionaea* y *Drosophyllum* (Droseraceae), *Pinguicula* (Lentibulariaceae), *Sarracenia* (Sarraceniaceae) y *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae). De este modo, las secreciones digestivas de las plantas carnívoras hasta ahora investigadas exhiben un sorprendente parecido con la secreción gástrica de los vertebrados, con la diferencia de que no se presentan como zimógenos, si bien la producción de proteasas no responde a la misma ubicación celular que la provisión del medio ácido necesario para su acción<sup>44</sup>.

La utilización efectiva por parte de la planta del nitrógeno orgánico aportado por las presas capturadas ha sido fehacientemente comprobado en *Drosera erythrorhiza* alimentada con moscas marcadas (N<sup>15</sup>) del género *Drosophylla*<sup>47</sup>, pero algunas observaciones parecen demostrar que las plantas insectívoras incorporan también por este medio nutrientes minerales, e incluso algunas hacen gran acopio de ellos, como ocurre con el acúmulo de fosfatos en *Drosera whittakeri*<sup>48</sup>.

b) *Micorrizas*. En estas asociaciones el hongo recibe carbohidratos de la planta y le proporciona a cambio nutrientes minerales, en especial nitrógeno y fósforo, que de otra forma serían inaccesibles para la planta. El mecanismo de incorporación de estos nutrientes por las raíces fue atribuido a la acción de proteasas específicas sobre las hifas del hongo, pero estudios estructurales recientes<sup>49</sup> han descartado esta posibilidad, no sólo en ecto- sino también en endomicorrizas, excepto en algunos casos, cuando sobreviene la senescencia del simbiote fúngico.

c) *Simbiosis con procariotes fijadores de nitrógeno atmosférico*. La más conocida de estas asociaciones es la de raíces de Leguminosas con bacterias del género *Rhizobium*, manifestada a través de la formación de nódulos característicos. Como en el caso de las endomicorrizas, las bacterias son incorporadas a las células del huésped por medio de invaginaciones de la membrana plasmática, en un proceso que recuerda a la fagocitosis. Obviamente, la bacteria no es digerida, pero sufre cambios morfológicos que la transforman en un bacteroide con pared celular muy reducida, sin que se conozca hasta ahora si las proteasas de la planta participan en este proceso.

Durante la senescencia de los nódulos los bacteroides son digeridos, con participación de vesículas de tipo lisosomal, pero en el proceso podrían participar tanto proteasas del huésped como de la bacteria<sup>50</sup>.

#### *Proteasas acumuladas sin función aparente*

Todas las plantas recambian sus proteínas y en consecuencia contienen enzimas proteolíticas, pero habitualmente en concentraciones tan bajas que resultan difíciles de detectar. Sin embargo algunas especies poseen cantidades considerables de proteasas extremadamente activas en algunos tejidos: en el látex de algunas de ellas pueden representar hasta el 50% de las proteínas totales y en los frutos y órganos vegetativos de las Bromeliáceas y de otras familias están presentes en elevada proporción.

a) *Proteasas de látex*. Las dos proteinasas más importantes de este grupo son papaína y ficina, separadas del látex de *Carica papaya* y de diferentes especies de *Ficus*, respectivamente, ambas de vasta aplicación en distintos procesos industriales.

El látex de *Carica papaya* ("mamón" o "papaya") contiene al menos cuatro proteasas<sup>51</sup>, todas de naturaleza cisteínica.

También se han aislado proteinasas cisteínicas del látex de otras especies de Caricaceae, Moraceae, Asclepiadaceae y Apocynaceae, pero las de Euphorbiaceae pertenecen a la superfamilia de las endopeptidasas serínicas<sup>44</sup>. De ello podría inferirse que la presencia de enzimas proteolíticas es una constante en el látex, o al menos en el látex de las familias mencionadas, pero esto no es cierto ni siquiera a nivel genérico e incluso las variedades de una misma especie pueden contener diferente proporción de proteasas<sup>52</sup>.

A pesar de que se ha estudiado recientemente la ultraestructura de algunos laticíferos, la carencia de estudios bioquímicos paralelos hace imposible establecer alguna relación entre la ontogénesis de estas estructuras secretoras y el origen de las proteasas presentes en el látex<sup>53</sup>.

Las hipótesis sobre las funciones del látex son por ahora especulativas. Algunas han sido definitivamente descartadas, como la que considera al látex como un producto de desecho, que resulta inconsistente frente al elevado contenido proteico de muchos de ellos. Como ocurre con buena parte de los metabolitos secundarios, el látex de muchas plantas cumpliría funciones de prevención y defensa frente a eventuales ataques de agentes patógenos o de predadores, apoyada tanto en la presencia de metabolitos de alta toxicidad<sup>54</sup> como de lectinas<sup>55</sup> y potentes inhibidores de proteasas<sup>56</sup>. La ubicación de los laticíferos en las capas corticales periféricas y en la cara externa del floema también sugiere una función defensiva del látex, que podría proteger al cambium y a los tubos liberianos de la acción de agentes exógenos. Se han atribuido a las proteasas funciones de degradación de las proteínas en el curso de la ontogénesis de los laticíferos, pero para ello no haría falta una concentración tan elevada de enzimas. Por otra parte, las proteasas presentes son

endopeptidasas, con lo que resultaría imposible obtener aminoácidos libres y en consecuencia descalificaría la utilidad de la proteolisis<sup>44</sup>.

b) *Proteasas de órganos vegetativos*. Excepción hecha de las plantas con látex, sólo han sido detectadas altas actividades proteolíticas en los órganos vegetativos de algunas monocotiledóneas. De entre ellas, la más conocida es la "bromelina de tallo", obtenida por expresión del eje caulinar de *Ananas comosus* y posterior precipitación acetónica del zumo<sup>57</sup>, pero la presencia de proteinasas cisteínicas también ha sido señalada en hojas de la misma especie<sup>58</sup>. Los extractos crudos de tallo de ananá contienen también un inhibidor de la propia bromelina<sup>59</sup>, hecho realmente infrecuente en plantas superiores y que puede interpretarse como un mecanismo de defensa de la célula ante una ruptura accidental de las vacuolas que contienen la proteasa<sup>60</sup>.

Como ocurre en el caso de las proteasas presentes en el látex, la gran abundancia de estas enzimas en los órganos vegetativos de ciertas Bromeliaceae y de algunas otras pocas monocotiledóneas resulta difícil de explicar en términos de una función intrínseca. Quienes trabajan en la cosecha del ananá sufren dermatitis crónica y hasta desaparición de las huellas digitales; los frutos de *Bromelia pinguin* han ocasionado ulceraciones en la punta de los dedos de quienes manipulan los mismos en el laboratorio, hecho atribuido a la acción conjunta de microcristales aciculares de oxalato de calcio, responsables de minúsculas heridas en la piel, a través de las que actuarían las proteasas contenidas en el jugo<sup>61</sup>; la savia de algunas especies de *Agave*<sup>62</sup> y de otras monocotiledóneas también resulta irritante, hechos todos atribuidos a la acción de proteasas y que constituyen parte de la escasa información sobre la que se basa el preten-

dido papel de defensa que jugarían estas enzimas en los órganos que las contienen.

c) *Proteasas de frutos*. Además de la papaína, obtenida del látex que fluye cuando se practican incisiones en los frutos de *Carica papaya*, existen proteasas en cantidades destacadas en los frutos de unas pocas familias, que además de las Caricaceae incluyen a las Apocynaceae, Bromeliaceae, Cururbitaceae, Dilleniaceae, Moraceae, Solanaceae y Rutaceae<sup>1</sup>. La maduración del fruto debe ser considerada como un proceso de senescencia, en el que el recambio de proteínas —y en consecuencia las proteasas— juegan un importante papel. Sin embargo, las pequeñas cantidades de enzimas proteolíticas presentes en todos los frutos parecen ser suficientes como para contribuir a la maduración de los mismos en la gran mayoría de las especies, por lo que la abundancia de proteasas en algunos frutos debería obedecer al cumplimiento de otras funciones<sup>63</sup>.

En la búsqueda de tales funciones es necesario considerar a los frutos carnosos desde un punto de vista integral, ya que éstos han evolucionado con el objeto de ser comidos por herbívoros trashumantes, que de este modo aseguran la dispersión de las semillas contenidas en los frutos en amplios radios geográficos. El desarrollo de la capacidad de producir altas concentraciones de proteasas aparece entonces como un mecanismo selectivo adoptado por las plantas para alejar a los herbívoros que son ineficientes dispersores de las semillas. Como contrapartida, la fauna presente deberá haber adaptado su aparato gastrointestinal para que tolere la presencia de elevadas cantidades de enzimas proteolíticas. Según Janzen y Martin<sup>64</sup> los frutos carnosos ricos en proteasas sirvieron de alimento a los grandes herbívoros del neotrópico que se extinguieron ca. 10.000 años atrás y el mantenimiento de tales características en la ac-

tualidad representaría un relicto evolutivo de aquella adaptación a la dispersión de sus semillas por la megafauna.

## PRINCIPALES APLICACIONES DE LAS PROTEASAS

### *Tiernización de carnes*

Como la mayoría de los productos naturales, las enzimas proteolíticas han sido utilizadas empíricamente durante mucho tiempo, especialmente en materia de alimentación y de salud. Un buen ejemplo lo constituye el empleo del jugo de mamón (*Carica papaya* L.), con el que los habitantes de muchas regiones de Centro y Sudamérica hacen más tiernas las carnes que consumen. Las proteasas contenidas en dicho jugo provocan la tiernización por hidrólisis parcial de las proteínas del tejido conectivo (colágeno y elastina) y en menor grado las de las mismas fibras musculares. Si bien las proteasas pueden aplicarse de muy diversas maneras, actualmente en la industria de la carne se logra un excelente tiernizado inyectando por vía endovenosa al animal antes de ser faenado una solución de enzima reversiblemente inactivada. La proteasa es reactivada por el poder reductor que adquiere el músculo luego de la muerte<sup>65</sup> y manifiesta su máxima actividad con el incremento de la temperatura en el proceso de cocción<sup>66</sup>. Con este tratamiento también se mejora la digestibilidad del producto.

### *Elaboración de cerveza*

Otra aplicación importante de las proteasas es el uso que se hace de ellas en la industria de la cerveza, con el objeto de proporcionar a la misma una buena estabilidad coloidal a bajas temperaturas, es decir impedir que como consecuencia del enfriamiento se manifieste turbiedad o que sedimenten componentes que se mantenían so-

lubles a temperatura ambiente. El fenómeno anterior es debido a la presencia de un complejo tanoproteico (tanino-proteína) que resulta soluble en caliente o a temperatura ambiente, pero que tiene tendencia a precipitar en frío. Tanto las proteínas como los compuestos polifenólicos provienen de las materias primas usadas en la preparación de la cerveza (cebada y lúpulo). Un modo de resolver el problema es impedir la formación del complejo o digerirlo parcialmente luego de formado; en este último caso se usan enzimas proteolíticas, en especial papaína, aunque también se han ensayado ficina, bromelina y pepsina. Debe tenerse en cuenta que la hidrólisis requiere ser controlada, ya que la cerveza debe mantener una adecuada proporción de proteína coloidal, necesaria para que la misma tenga "cuerpo" y produzca espuma abundante y duradera<sup>67</sup>.

#### *Elaboración de quesos*

Las proteasas se utilizan en la industria láctea, en especial en la fabricación de quesos. La renina o quimosina, una endopeptidasa que integra los fermentos gástricos de los rumiantes, ha sido tradicionalmente usada para producir la coagulación de la leche. Este proceso ocurre en dos etapas, la primera de las cuales es de naturaleza enzimática y consiste fundamentalmente en la hidrólisis de una unión peptídica específica de la  $\kappa$ -caseína<sup>68</sup>, haciéndola susceptible a coagular englobando lípidos y proteínas, en presencia de  $\text{Ca}^{++}$  y calor (lo que constituye la segunda etapa). Como sustituyente de la renina se han ensayado otras enzimas: pepsina bovina y porcina, ficina y proteasas fúngicas de *Mucor miehei*, *M. pusillus* y *Endothia parasitica*, aunque su uso no se ha generalizado.

#### *Panificación*

Durante la panificación se adicionan proteasas fúngicas (*Aspergillus oryzae*), papaína

o bromelina para mejorar la manipulación de la masa, así como su elasticidad y la textura del gluten, lo que finalmente provoca un incremento sustancial del volumen de la masa, con la consiguiente reducción del tiempo de amasado<sup>67</sup>.

#### *Obtención de proteínas modificadas para la industria alimentaria*

En los párrafos anteriores se han analizado los principales procesos de elaboración de alimentos en los que intervienen enzimas proteolíticas. Otro importante uso de estas enzimas es la obtención de proteínas parcialmente hidrolizadas o de hidrolizados proteicos para ser luego empleados en la producción de otros alimentos.

Un ejemplo interesante es la producción de quesos modificados por enzimas (EMC), los que tienen un sabor 5 a 15 veces más intenso que los quesos no modificados. Estos EMC se utilizan como agentes saborizantes reemplazando total o parcialmente el ingrediente original en la fabricación de productos que normalmente contienen quesos<sup>69</sup>.

Por otra parte, la hidrólisis parcial de las proteínas permite modificar ciertas propiedades fisicoquímicas de las mismas; así es como se ha logrado incrementar la solubilidad de las proteínas de semillas de soja<sup>70</sup>, de algodón<sup>71</sup> y de maní, caso en el que han resultado adecuadas papaína, bromelina y ficina<sup>72</sup>. Los productos obtenidos pueden emplearse en la elaboración de bebidas, sopas y salsas. En cuanto al incremento de la capacidad emulgente, se obtuvieron buenos resultados con proteínas de soja y de trigo para su uso en mayonesas, salsas y aderezos<sup>73</sup>.

Es de particular importancia el incremento del poder espumígeno de las proteínas para ser utilizadas en la fabricación de "souffles", "mousses", merengues, helados y cremas. En tal sentido se han obtenido proteínas modificadas que producen espu-



mas abundantes y estables a partir de semillas de soja y de trigo.

También se obtienen por degradación enzimática hidrolizados proteicos, los que han encontrado creciente aplicación como aditivos alimentarios y proveen aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular<sup>69</sup>.

#### *Aditivos en polvos detergentes*

Una aplicación de las proteasas que ha adquirido gran importancia en los últimos tiempos es su incorporación a polvos detergentes<sup>74</sup>, habitualmente asociadas a lipasas y amilasas, siendo las de origen microbiano las más utilizadas.

#### *Manufactura de cueros*

Otro importante proceso industrial en el que se emplean enzimas proteolíticas es la manufactura de cueros, ya sea en la etapa previa de la depilación de la piel como en la posterior del "batido", cuyo objetivo es preparar el cuero para el teñido y que consiste en la remoción de restos de pelos, glándulas, células epiteliales y tejidos superficiales no separados por los tratamientos previos. En este caso se utiliza principalmente pancreatina, pero también se han ensayado con buenos resultados papaína, bromelina y proteasas bacterianas (en especial la obtenida de *Bacillus subtilis*) y fúngicas de variado origen<sup>67</sup>.

#### *Industria textil*

A los efectos de aumentar la resistencia a la tracción y a la abrasión, las fibras textiles son "encoladas" con una preparación de polímeros ("colas"). Con posterioridad al hilado se debe proceder a "desencolar" los hilos para restituir las propiedades de los mismos. Las fibras artificiales son habitualmente impregnadas en gelatina y para su desencolado se usa la proteasa neutra de *Bacillus subtilis* o la proteasa alcalina de *B. licheniformis*<sup>67</sup>.

#### *Integrantes de formulaciones farmacéuticas*

Las enzimas proteolíticas han sido utilizadas en tratamientos postquirúrgicos para el desbridamiento de heridas y en clínica médica gastroenterológica como coadyuvante en el tratamiento de trastornos digestivos, en este último caso asociadas a otras enzimas hidrolíticas<sup>75</sup>, pero la aplicación más trascendente de las mismas obedece a sus probadas propiedades antiinflamatorias<sup>76</sup>. Papaína, bromelina y ficina han sido ampliamente usadas en tal sentido. Un aspecto hasta hace poco inexplorado de las proteasas pero que podría estimular notablemente su estudio en el campo clínico es su uso como citostáticos, por ahora reducido a bromelina<sup>77-79</sup>.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Buttazzoni, M.S. y N.O. Caffini (1982) *Acta Farm. Bonaerense* 1: 23-38
2. Grassman, W. y H. Dyckerhoff (1928) *Hope-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 179: 41-78
3. Bergmann, M. y W.F. Ross (1936) *J. Biol. Chem.* 114: 717-26
4. Mc Donald, J. (1985) *Histochem. J.* 17: 773-85
5. Schechter, I. y A. Berger (1967) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 27: 157-62
6. Barret, A.J. (1986) "The classes of proteolytic enzymes" en "*Plant Proteolytic Enzymes*" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I, págs. 1-16
7. Hartley, B.S. (1960) *Ann. Rev. Biochem.* 29: 45-72
8. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1984) *Enzyme Nomenclature 1984*. Academic Press, New York-London, págs. 330-66
9. Dayloff, M.O., W.C. Barker y L.T. Hunt (1983) *Meth. Enzymol.* 91: 524-45

10. Hartley, B.S. (1970) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 257: 77-87
11. Morihara, K. (1974) *Adv. Enzymol.* 41: 179-243
12. North, M.J. (1982) *Microbiol. Rev.* 46: 308-40
13. Barret, A.J. y J.K. McDonald (1980) "*Mammalian Proteases: a Glossary and Bibliography*", Vol. 1, "*Endopeptidases*", Academic Press, London
14. Storey, R.D. (1986) "Plant Endopeptidases", en "*Plant Proteolytic Enzymes*" (M.J. Dalling, ed.), Vol. I, págs. 119-140
15. Siffert, O., I. Emöd y B. Keil (1976) *FEBS Lett.* 66: 114-9
16. Tai, J.Y., A.A. Kortt, T.-Y. Liu y S.D. Elliot (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 1955-9
17. Murachi, T. (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8: 167-9
18. Tang, J. (1979) *Mol. Cell. Biochem.* 26: 93-109
19. Polgar, L. y P. Halasz (1982) *Biochem. J.* 207: 1-10
20. Drenth, J., K.H. Kalk y H.M. Swen (1976) *Biochemistry* 15: 3731-8
21. Fruton, J.S. (1976) *Adv. Enzymol.* 44: 1-36
22. Tang, J., P. Sepulveda, J. Marciszyn, K.C.S. Chen, W.-Y. Huang, N. Tao, D. Liu y J.P. Lanier (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3437-9
23. Umezawa, H. (1976) *Meth. Enzymol.* 45: 678-95
24. Colman, P.M., J.N. Jansonius y B.W. Matthews (1972) *J. Mol. Biol.* 70: 701-24
25. Kester, W.R. y B.W. Matthews (1977) *Biochemistry* 16: 2506-16
26. Mifflin, B.J. y S.R. Burges (1982) *J. Exp. Bot.* 33: 251-60
27. Osborne, T.B., (ed.) (1924) "*The vegetable proteins*", 2nd. Ed., Longmans, Green, London
28. Richardson, M. (1977) *Phytochemistry* 16: 159-69
29. Pernollet, J.C. (1978) *Phytochemistry* 17: 1473-80
30. Preston, K.R. y J.E. Kruger (1986) "Mobilization of monocot protein reserves during germination", en "*Plant proteolytic enzymes*" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, Vol. II, págs. 1-18
31. Ashton, F.M. (1976) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 27: 95-117
32. Derbyshire, E., D.J. Wright y D. Boulter (1976) *Phytochemistry* 15: 3-24
33. Kocourek, J. y V. Horejši (1981) *Nature* 290: 188
34. Tully, R.E. y H. Beevers (1978) *Plant Physiol.* 62: 746-50
35. Baumgartner, B., K.T. Tokuyasu y M.J. Chrispeels (1978) *J. Cell Biol.* 79: 10-9
36. Wilson, K.A. (1986) "Role of proteolytic enzymes in the mobilization of protein reserves in the germinating dicot seeds", en "*Plant proteolytic enzymes*" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, Vol. II, págs. 19-47
37. Stoddart, J.L. y H. Thomas (1982) "Leaf senescence", en "*Encyclopedia of Plant Physiology, N.S.*", (D. Boulter y B. Parthier, eds.), Springer-Verlag, Berlin, Vol. 14 A, pág. 592
38. Wittenbach, V.A. (1979) *Plant Physiol.* 64: 884-7
39. Feller, U. (1986) "Proteolytic enzymes in leaf senescence", en "*Plant proteolytic enzymes*" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, Vol. I, págs. 49-68
40. Malik, N.S.A., N.E. Pfeiffer, D.R. Williams y F.W. Wagner (1981) *Plant Physiol.* 68: 386-92
41. Pladys, D. y J. Rigaud (1982) *Z. Pflanzenphysiol.* 108: 163-9
42. Vance, C.P., P.H. Reinbach y W.R. Ellis (1986) "Proteolytic enzymes of legume nodules and their possible role during nodule senescence", en "*Plant proteolytic enzymes*" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, Vol. II, págs. 103-24
43. Dalling, M.J. y A.M. Nettleton (1986) "Chloroplast senescence and proteolytic enzymes" en "*Plant proteolytic enzymes*" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, Vol. II, págs. 125-53
44. Boller, T. (1986) "Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms", en "*Plant proteolytic enzymes*" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, Vol. I, págs. 67-96
45. Tökés, Z.A., W.C. Woon y S.M. Chambers (1974) *Planta* 119: 39-46
46. Amagase, S. (1972) *J. Biochem.* 72: 73-81
47. Dixon, K.W., J.S. Pate y W.J. Bailey (1980) *Aust. J. Bot.* 28: 283-97
48. Chandler, G.E. y J.W. Anderson (1976) *New Phytol.* 76: 129-41
49. Scannerini, S. y P. Bonfante-Fasolo (1983) *Can. J. Bot.* 61: 917

50. Vance, C.P., P.H. Reibach y W.R. Ellis (1986) "Proteolytic enzymes of legume nodules and their possible role during nodule senescence" en "*Plant proteolytic enzymes*" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Ratón, USA, Vol. II, págs. 103-24
51. Brocklehurst, K. y E. Salih (1983) *Biochem. J.* 213: 559-60
52. Williams, D.C., V.C. Sgarbieri y J.R. Whitaker (1968) *Plant Physiol.* 43: 1083-8
53. Rachmilewitz, T. y A. Fahn (1982) *Ann. Bot.* 49: 13
54. Esau, K. (1965) *Plant Anatomy*, 2nd. ed., John Wiley & Sons, New York
55. Barbieri, L., A. Falasca, C. Franceschi, F. Licastro, C.A. Rossi y F. Stirpe (1983) *Biochem. J.* 215: 433-9
56. Archer, B.L. (1983) *Phytochemistry* 22: 633-9
57. Murachi, T. (1976) *Meth. Enzymol.* 45: 475-85
58. Daley, L.S. y H.M. Vines (1978) *Plant Sci. Lett.* 11: 59-67
59. Heinriksen, R.L. y F.J. Kézdy (1976) *Meth. Enzymol.* 45: 740-51
60. Boller, T. y H. Kende (1979) *Plant Physiol.* 63: 1123-32
61. Asenjo, C.F., J.A. Goyco y M. del C. Fernández (1944) *J. Am. Pharm. Assoc.* 33: 344
62. Du Toit, P.J. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 429: 895-911
63. Adams, C.A. y R.W. Rinne (1981) *New Phytol.* 89: 1-14
64. Janzen, D.H. y P.S. Martin (1982) *Science* 215: 19-27
65. Kang, C.K. (1978) "*Encyclopedia of Food Science*" (M.S. Peterson y A.H. Johnson, eds.) The Avi Publishing Co. Inc., Westport, pág. 598
66. Bernholdt, H.F. (1982) "The use of enzymes in the tenderization of meat" en "*Use of enzymes in food technology*" (P. Dupuy, ed.) Technique et Documentation Lavoisier, Paris, págs. 395-8
67. Sicard, P. (1982) "Applications industrielles des enzymes" en "*Les enzymes. Productions et utilisations industrielles*" (G. Durand y P. Monsan, eds.) Gauthier-Villars, Paris, págs. 121-64
68. Fox, P.F. (1982) "Exogenous enzymes in dairy technology" en "*Use of enzymes in food technology*" (P. Dupuy, ed.) Technique et Documentation Lavoisier, Paris, págs. 135-56
69. Kilara, A. (1985) *Process Biochem.* 20: 149-57
70. Puski, G. (1975) *Cereal Chem.* 52: 654
71. Jost, R. y J.C. Monti (1977) *J. Dairy Sci.* 60: 1387-93
72. Arzu, A., H. Mayorga, J. González y C. Rolz (1972) *J. Agric. Food Chem.* 20: 805-9
73. Sekul, A.A. y R.L. Ory (1977) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 54: 32-5
74. Whitaker, J.R. (1982) "Enzymes of importance in high protein foods" en "*Use of enzymes in food technology*" (P. Dupuy, ed.) Technique et Documentation Lavoisier, Paris, págs. 329-58
75. Mantell, S.H., J.A. Matthews y R.A. Mc Kee (1985) "*Principles of plant biotechnology*", Blackwell Sci. Pub., London, págs. 211-2
76. Netti, C., G.L. Bandi y A. Peciele (1972) *Il Farmaco* (Ed. Pr.) 27: 453-66
77. Batkin, S., S.J. Taussing y J. Szekerczes (1988) *Cancer Invest.* 6: 241
78. Batkin, S., S.J. Taussing y J. Szekerczes (1988) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114: 507-8
79. Maurer, H.R., M. Hozumi, Y. Honma y J. Okabe-Kado (1988) *Planta Medica* 1988: 377-80