

Obtención, caracterización y encapsulamiento de peptidasas de *Bromelia hieronymi* Mez y *Bromelia serra* Griseb (Bromeliaceae) para uso industrial

Salese, Lucía; Bernik, Delia; Bruno, Mariela

lusalese@gmail.com

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

Resumen

Se obtuvieron cinco extractos crudos a partir de frutos y ejes de *Bromelia hieronymi* Mez y tres a partir de frutos de *B. serra* Griseb. (Bromeliaceae). Se determinó la presencia de actividad proteolítica sobre caseína, presentando $5,7\pm 0,3$ y $1,8\pm 0,8$ Ucas/mg los extractos de frutos inmaduros de *B. hieronymi* y frutos maduros de *B. serra*, respectivamente. Este último presentó la mayor actividad antioxidante correspondiente a $4,92\pm 0,03$ mg/ml de Trólox. El perfil proteico fue analizado por isoelectroenfoque, detectándose seis bandas para *B. hieronymi* y cuatro para *B. serra*. Por SDS-PAGE se observó la presencia en todos los extractos de fruto de una banda de alrededor de 25 kDa, típica de las peptidasas cisteínicas de plantas. Por otra parte, se iniciaron estudios de encapsulamiento en almidón de mandioca (*Manihot esculenta*) empleando el extracto concentrado de *B. hieronymi*, que presentó la mayor actividad por unidad de volumen ($10,5\pm 0,3$ Ucas/ml), recuperándose un porcentaje significativo de la actividad original. Estos extractos, obtenidos a partir de recursos autóctonos, serían promisorios como fuente de peptidasas para uso industrial. La posibilidad de encapsular estas enzimas en matrices biopoliméricas podría permitir su empleo en tecnología de alimentos.

Palabras clave: proteasa, antioxidante, *Bromelia serra*, *Bromelia hieronymi*, encapsulamiento.

Introducción

1. Las proteasas son enzimas hidrolíticas que escinden uniones peptídicas y se las clasifica en seis grupos según las características de su sitio catalítico. Gracias a su diversidad estructural y funcional realizan variadas funciones biológicas (Li *et al.*, 2013; Sawant y Nagendran, 2014). Constituyen el 60% del mercado de enzimas y se emplean en la formulación de detergentes, como tiernizantes de carne, en la manufactura de quesos, en la elaboración de pan y cerveza, y en el tratamiento de efluentes industriales, entre otros usos (Gupta y Khare, 2007; Kalpana Devi *et al.*, 2008). Específicamente, en la industria alimentaria, las proteasas son utilizadas para modificar las propiedades funcionales, la calidad sensorial o para degradar proteínas alergénicas (Tavano, 2013). Las proteasas vegetales cumplen los requerimientos del estatus “GRAS” (Generally Recognized As Safe), hecho facilitado por la fuente de origen (vegetal no tóxico), existiendo actualmente algunas comerciales, entre las que se destacan la bromelaina del ananá y la papaína de la papaya, ambas con aplicaciones industriales (Maurer, 2001; Owoyele *et al.*, 2008). En Argentina existe una amplia diversidad de especies vegetales nativas, lo cual constituye una potencial riqueza para obtener enzimas de aplicación industrial. Algunas especies de la familia Bromeliaceae contienen inusuales cantidades de peptidasas. *Bromelia hieronymi* Mez (Bruno *et al.*, 2008) y *Bromelia serra* Griseb (Caffini *et al.*, 1988) son dos especies del norte-centro de Argentina que poseen peptidasas parcialmente estudiadas. Algunas de estas enzimas, presentan propiedades promisorias para la industria biotecnológica y alimentaria (Bruno *et al.*, 2010).

Para el uso industrial de enzimas es necesario mantener su estabilidad y lograr que la catálisis sea controlada durante el proceso. La técnica de encapsulamiento en diversas matrices poliméricas ha resultado exitosa para superar estos problemas, mejorando adicionalmente la estabilidad durante el almacenamiento y su liberación controlada en el alimento (Thu y

Krasaekoopt, 2016). Un ejemplo de encapsulamiento exitoso constituye el empleo de flavourzima, proteasa de *Aspergillus oryzae*, en partículas de k-carragenano incluidas en quesos (Akin, 2012).

2. Objetivos

El presente trabajo incluye como objetivos la obtención y caracterización de extractos proteolíticos obtenidos a partir de ejes caulinares de la infrutescencia de *B. hieronymi*, y de frutos de *B. hieronymi* y de *B. serra*, así como su encapsulamiento en almidón de mandioca, con la finalidad de obtener productos promisorios para su empleo en la industria alimentaria.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

Se emplearon los frutos de dos especies nativas del género Bromelia (Bromeliaceae), *B. hieronymi* “cháguar” colectados en Santiago del Estero (Argentina) por el Prof. Ing. Manuel Palacio de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (abril de 2014), así como de *B. serra* “cháguar, caraguatá”, colectados por la Lic. Graciela Klekailo en el Campo Experimental Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (mayo de 2017). Se analizaron diferentes estadios de maduración de los frutos de ambas especies, además de los ejes primarios y secundarios de las infrutescencias de *B. hieronymi*. En el laboratorio, el material vegetal fue lavado con agua corriente para retirar suciedad y gomas, enjuagado con agua destilada, secados al aire, envasados herméticamente y almacenados a -20°C.

3.2. Obtención de los extractos crudos

Los frutos o ejes congelados (según el extracto) fueron cortados en pequeños trozos y triturados en una procesadora durante 1 min, en intervalos de 10 s con igual tiempo de espera, con buffer fosfato 0,1 M de pH 6,0 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM. La preparación obtenida se filtró con un colador para eliminar materiales insolubles y se centrifugó durante 30 min, a 4°C y 10.000 g. El sobrenadante fue denominado extracto crudo (EC), el cual se fraccionó y almacenó a -20°C. La Tabla 1 muestra la composición de los ocho EC preparados.

Nombre	Material vegetal	Composición	
Bh A	<i>B. hieronymi</i>	Fruto inmaduro	0,2 g/ml
Bh B		Fruto inmaduro	0,4 g/ml
Bh C		Eje primario	0,2 g/ml
Bh D		Eje secundario	0,2 g/ml
Bh E		Fruto maduro	0,2 g/ml
Bs A	<i>B. serra</i>	Fruto inmaduro	0,2 g/ml
Bs B		Fruto inmaduro	0,2 g/ml
Bs C		Fruto maduro	0,2 g/ml

Tabla 1. Detalle de la preparación de lo EC.

3.3. Actividad enzimática

Se empleó como sustrato una suspensión de caseína al 1% en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5 con el agregado de cisteína 15 mM. El ensayo se llevó a cabo a 37°C mezclando 1,1 ml de caseína con 0,1 ml de EC. Se adicionaron 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% para

detener la reacción. Los ensayos en blanco fueron realizados inactivando la enzima con TCA previo al agregado del sustrato (López *et al.*, 2000). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se detuvieron a los 2 minutos. Luego se llevaron todos los tubos a 4°C durante 30 min y finalmente fueron centrifugados a 4500 g durante 30 min, determinándose la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm en un lector de placas Infinite Pro M200-TECAN. La actividad enzimática se expresó en Unidades caseinolíticas (Ucas).

3.4. Concentración de proteínas

Se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976). Para poder cuantificar el ensayo se realizó una curva de calibración utilizando como patrón seroalbúmina bovina (100-1000 µg/ml). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Las mediciones de absorbancia se tomaron con un lector de placas.

3.5 Actividad antioxidante ABTS

Se determinó la actividad antioxidante de los EC mediante el ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS^{•+} (Re *et al.*, 1999). La solución de ABTS^{•+} se preparó previamente según las indicaciones de los autores. Se ensayó la actividad antioxidante mediante la adición de 200 µl de ABTS^{•+} a 2 µl de EC. Los resultados fueron expresados en mg/ml de 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) mediante una curva de calibración (0,5-0,0125 mg/ml). Se midió la absorbancia a 734 nm en un lector de placas.

3.6. Isoelectroenfoque (IEF)

Las muestras se concentraron y desionizaron en 2 ciclos, por precipitación con 4 volúmenes de acetona, a -20°C durante de 30 min, y centrifugación a 10.000 g y 4°C; luego del segundo ciclo, el sobrenadante obtenido se eliminó y el precipitado fue redisolto con un volumen de agua bidestilada (concentración de proteína: 1 mg/ml).

El IEF se llevó a cabo en una Mini IEF Cell, Mod. 111 (Bio-Rad), en tres etapas sucesivas: 15 min a 100 V, 15 min a 200 V y 60 min a 450 V. Una vez finalizada la corrida, el gel obtenido fue fijado, coloreado y lavado hasta la obtención de un fondo incoloro. El gel fue escaneado y los valores de los pI se determinaron realizando una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas patrón en función de la distancia recorrida por ellas en el gel.

3.7. SDS-PAGE en geles con tricina

Para estimar las masas moleculares de los polipéptidos presentes en los EC se realizó una SDS-PAGE al 12,5% empleando la técnica ideada por Schägger & von Jagow (1987). Se agregó 4 µl de buffer de muestra a 14 µl de EC concentrado a 1 mg/ml y las mezclas fueron llevadas a ebullición por 5 min. La corrida electroforética se desarrolló en una celda Miniprotean III (Bio-Rad) a 30 V durante el apilamiento y 120 V durante la separación. Una vez finalizada la corrida, el gel fue colocado 1 h en una solución fijadora, seguido de 2 h en solución colorante y finalmente lavado con solución decolorante hasta la obtención de un fondo incoloro. El gel fue escaneado y el patrón de bandas fue analizado por densitometría.

3.8. Encapsulamiento

Se iniciaron estudios de encapsulamiento con el Bh B en almidón de mandioca. Se realizaron pruebas preliminares de capacidad de encapsulamiento del almidón. Una vez transcurrido el tiempo de encapsulamiento, se eliminó la solución remanente, se lavó con el mismo buffer y se determinó la actividad caseinolítica con el método empleado en el inciso 3.3. Dado que estos estudios están en una etapa preliminar, no es posible aun mostrar más detalles del procedimiento óptimo.

3.9. Análisis de datos

Las determinaciones de actividades caseinolítica y antioxidante, y la concentración de proteínas fueron expresadas como el promedio del triplicado \pm el desvío standard. Los valores de pI y los densitogramas de la SDS-PAGE fueron calculados empleando los programas Adobe Photoshop CS3, ImageJ 1.46r. y Microsoft Office Excel 2007.

4. Resultados y Discusión

4.1. Caracterización de los EC

Se obtuvieron ocho EC a partir del mencionado material vegetal.

Extracto	Proteínas (μ /ml)	Actividad caseinolítica (Ucas/ml)	Actividad específica (Ucas/mg)
Bh A	1063 \pm 44	6,1 \pm 0,2	5,7 \pm 0,3
Bh B	2135 \pm 52	10,5 \pm 0,3	4,9 \pm 0,2
Bh C	246 \pm 21	0,3 \pm 0,2	1,2 \pm 0,8
Bh D	252 \pm 32	0,1 \pm 0,0	0,4 \pm 0,1
Bh E	1141 \pm 44	3,9 \pm 0,3	3,4 \pm 0,3
Bs A	289 \pm 30	No detec.	No detec.
Bs B	321 \pm 18	0,3 \pm 0,2	0,9 \pm 0,6
Bs C	163 \pm 46	0,3 \pm 0,1	1,8 \pm 0,8

Tabla 2. Datos de Concentración proteica, actividad caseinolítica y actividad específica (cociente: actividad/concentración proteica).

En La Tabla 2 se puede observar que los extractos de fruto de *B. hieronymi* poseen mayor contenido de proteínas y de actividad caseinolítica que los de *B. serra*. Por otra parte, los ejes primarios y secundarios de *B. hieronymi* poseen bajos valores para estos dos parámetros con respecto a los extractos de frutos. El Bh A presenta la mayor actividad específica mostrando un valor de 5,7 \pm 0,3 Ucas/mg, del mismo orden que el obtenido en estudios previos (Bruno *et al.*, 2008). El Bh B, obtenido con el doble de peso de fruto, no presenta el doble de actividad específica (4,9 \pm 0,2 Ucas/mg) que el anterior, lo que podría ser debido a que la cantidad de buffer empleada tiene un límite de capacidad para resuspender las proteínas, y éste fue superado al preparar el Bh B. Sin embargo la actividad caseinolítica de este extracto es la mayor de todas, hecho por el cual sería el más adecuado para ser empleado en procesos industriales y fue seleccionado para realizar pruebas de encapsulamiento en almidón de mandioca. Por otra parte, entre los extractos de *B. serra*, el Bs C presentó la mayor actividad específica.

Se analizó la presencia de actividad antioxidante en los extractos ya que los frutos suelen poseer compuestos de este tipo (Kuskoski *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2010). La Fig. 1 muestra la curva de calibración de Trólox empleada para expresar los datos de actividad antioxidante en base a un compuesto de referencia (Tabla 3).

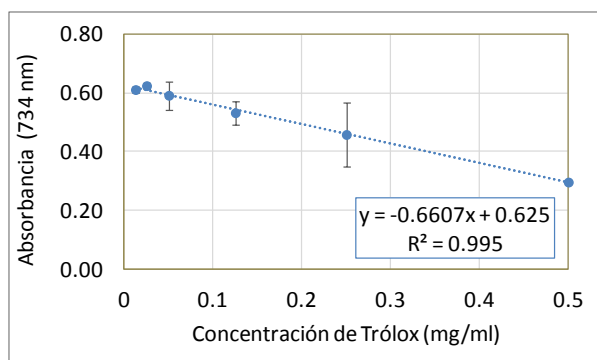


Figura 1. Curva de referencia (Trólox) para la actividad antioxidante. Las barras verticales indican el desvío standard.

Extracto	mg/ml trólox
Bh A	3,76±0,02
Bh B	3,32±0,01
Bh C	2,71±0,10
Bh D	3,72±0,02
Bh E	3,61±0,04
Bs A	3,72±0,02
Bs B	3,39±0,30
Bs C	4,92±0,03

Tabla 3. Datos de actividad antioxidante de los EC expresados en mg/ml de trólox.

Se puede observar que las valores de actividad antioxidante son bastante similares en todos los EC, destacándose el de Bs C (4,92±0,03 mg/ml de trólox) correspondiente a fruto maduro de *B. serra*.

4.2. Caracterización del perfil proteico

Por IEF se obtuvieron los valores de pI de las principales fracciones proteicas. Para los frutos maduros de *B. hieronymi* se corroboró la presencia de las mismas seis bandas típicas observadas en trabajos previos en frutos inmaduros (pI = 5,9; 6,4; 7,6; 8,3 y dos bandas > 9,3), aunque en los ejes hay una menor cantidad de bandas y la intensidad es considerablemente menor.

En el caso de *B. serra* se observa la presencia de una banda mayoritaria de pI 6,6 y otra de baja intensidad (pI 8,0) en los tres extractos, una de pI 3,5 presente en Bs A y Bs B, y una de pI 7,4 en Bs B y Bs C (Fig. 2).

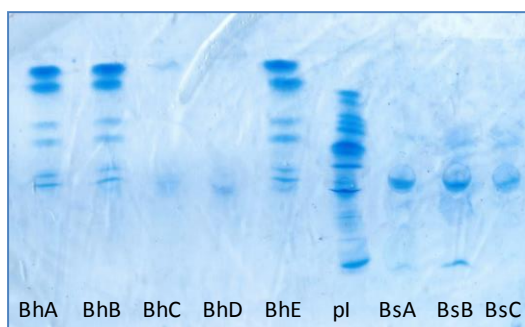


Figura 2. IEF. PI: patrones de punto isoeléctrico de rango (rango de pI 3,5–9,3; GE).

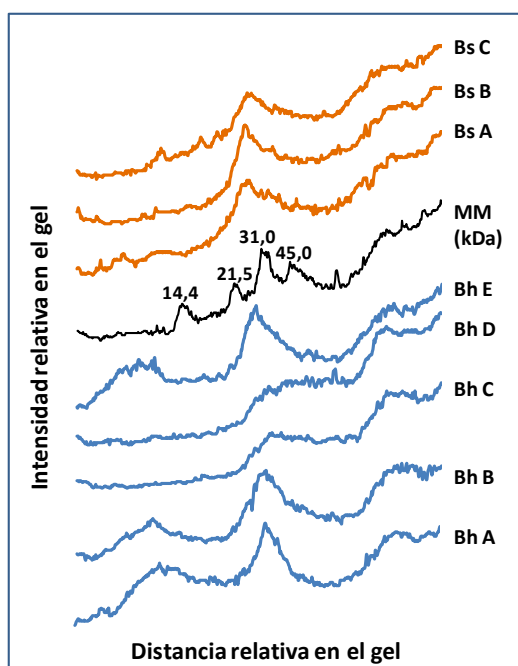


Figura 3. Densitograma de la SDS-PAGE. Líneas azules: EC de *B. hieronymi*; línea negra: patrones de masa molecular (Low range, BioRad). Líneas anaranjadas: EC de *B. serra*.

Por análisis densitográfico de las imágenes de la SDS-PAGE (Fig. 3) se observa la presencia de un pico del orden de los 25 kDa en todos los EC de frutos, típico de las peptidasas cisteínicas vegetales (Grudkowska, M. y Zagdanska, B., 2004).

4.3. Encapsulamiento de Bh B en almidón de mandioca

Se logró encapsular Bh B en almidón de mandioca. La actividad caseinolítica en las mismas condiciones que las aplicadas para dicho EC, el cual tenía una actividad de $10,5 \pm 0,3$ Ucas/ml. mediante este procedimiento, se logró recuperar un 21% de la actividad original. Comparando con otros estudios de encapsulamiento, este rendimiento es ligeramente menor que el obtenido por Thu y Krasaekoopt (2016), ya que recuperaron un 28,2% de la actividad enzimática al encapsular flavourzima de *Aspergillus oryzae* en un copolímero de maltodextrina y alginato. Dado a que se han realizado muy pocos ensayos, se intentará optimizar esta capacidad de encapsulamiento.

Conclusiones

De los ocho EC obtenidos a partir de plantas autóctonas, el Bs C tuvo la mayor actividad antioxidante, lo cual resulta interesante por su posible aplicación como aditivo en alimentos. La mayor actividad específica se detectó en el Bh B, siendo el extracto más adecuado como fuente de peptidasas para uso industrial. Por otra parte, el ensayo realizado con Bh B en pruebas de encapsulamiento es nuestro punto de partida para profundizar en estudios futuros. El encapsulamiento en diversas matrices de las enzimas obtenidas brindaría la posibilidad de emplearlas en tecnología de alimentos.

Bibliografía

Akin, M. S. (2012). Accelerated ripening of Kashar cheese with encapsulated protease. *African Journal of Biotechnology*, 11(66), 13007-13015.

- Bradford M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bruno, M. A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., y López, L. M. (2008). Purification and characterization of hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *The protein journal*, 27(7-8), 426-433.
- Bruno, M. A., Lazza, C. M., Errasti, M. E., López, L. M., Caffini, N. O., y Pardo, M. F. (2010). Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 695-701.
- Caffini, N. O., Natalucci, C. L., Priolo, N. S., y Buttazzoni, M. S. (1988). Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrónica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb. *Acta Farm. Bonaerense*, 7(1), 9-14.
- Coelho, R., Honda, N., Vieira, M., Brum, R., Pavan, F., Leite, C., y Cardoso, C. A. L. (2010). Chemical composition and antioxidant and antimycobacterial activities of *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). *Journal of medicinal food*, 13(5), 1277-1280.
- Grudkowska, M., y Zagdanska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3):609-624.
- Gupta, A., y Khare, S. K. (2007). Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(1), 11-16.
- Kalpana Devi, M., Banu, A. R., Gnanaprabha, G. R., Pradeep, B. V., y Palaniswamy, M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian journal of science and technology*, 1(7), 1-6.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Morales, M., y Fett, R. (2006). Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. *Ciência Rural*, 36(4), 1283-1287.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., y Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS letters*, 587(8), 1155-1163.
- López, L., Sequeiros, C., Natalucci, C., Brullo, A., Maras, B., Barra, D. y Caffini, N. (2000). "Purification and characterization of macrodonta I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodonta* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)". *Protein Expres. Purif.* 18:133-40.
- Maurer, H. R. (2001). Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(9), 1234-1245.
- Owoyele, B. V., Adebukola, O. M., Funmilayo, A. A., y Soladoye, A. O. (2008). Anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Carica papaya* leaves. *Inflammopharmacology*, 16(4), 168-173.
- Re R., Pellegrini A., Proteggente A., Pannala M., Yang C. & Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1231-1237.
- Shägger & Von Jagow (1987). Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-79. 1987
- Sarath, G., R. S. de la Motte & F. Wagner (1989). 'Protease assay methods', en "Proteolytic enzymes, a practical approach" (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.), IRL Press, Oxford, pág. 27.
- Sawant, R., y Nagendran, S. (2014). Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 568-579.

- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Thu, T. T. M., y Krasaekoopt, W. (2016). Encapsulation of protease from *Aspergillus oryzae* and lipase from *Thermomyces lanuginoseus* using alginate and different copolymer types. *Agriculture and Natural Resources*, 50(3), 155-161.

Agradecimientos

Por su amable contribución a este estudio, se agradece al Prof. Ing. Manuel Palacio de la UNSE, Director del Jardín Botánico de la ciudad de Santiago del Estero (Argentina) por identificar y coleccionar infrutescencias de *B. hieronymi*, y a la Lic. Graciela Klekialo de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario por coleccionar y facilitar infrutescencias de *B. serra*.

Financiamiento

Proyectos: número de código: X-682 (Aplicaciones biotecnológicas de enzimas hidrolíticas provenientes de la flora nativa) y X-746 (Optimización de la obtención de proteínas vegetales con potencial acción biotecnológica y biomédica) de la UNLP.