



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DE BROMELIAS AUTÓCTONAS Y
SU APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE BIOPÉPTIDOS A PARTIR DE
PROTEÍNAS ALIMENTARIAS**

Tesista: Lucía Salese

Directora: Mariela Anahí Bruno

Codirectora: Delia Leticia Bernik

Año: 2023

El presente trabajo para optar por el título de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CiProVe-UNLP- Centro Asociado a la CICpBA) perteneciente al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección la Dra. Mariela Anahí Bruno y la codirección de la Dra. Delia Leticia Bernik. El mismo fue financiado a través de una beca doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Asimismo, la realización del trabajo de tesis doctoral contó con el respaldo y el apoyo de los siguientes proyectos:

- *Optimización de la obtención de proteínas vegetales con potencial acción biotecnológica y biomédica. Proyecto tetra anual, 2016-2019. UNLP. X-746.*
- *Desarrollo de cosmecéuticos conteniendo péptidos antioxidantes obtenidos por acción de fitoproteasas de la flora autóctona. PICT-2013-2531. período de ejecución 2014-2017*
- *Obtención de péptidos bioactivos con acción sobre el sistema cardiovascular, mediante la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias. Proyecto tetra anual, 2018-2022. UNLP X-834.*
- *Obtención de productos funcionales con aplicación en la industria alimentaria empleando peptidasas de la flora argentina. Proyecto tetra anual, 2020-2024. UNLP. X-914.*

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a los organismos que hicieron posible el presente trabajo de investigación:

A la Universidad Nacional de La Plata, que permitió la realización de mis estudios de grado en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo y mis estudios de posgrado en la Facultad de Ciencias Exactas, por la formación de excelencia, pública y gratuita.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por brindarme una beca para la realización del presente Trabajo de Tesis Doctoral.

En segundo lugar, quiero agradecer a las personas que me formaron y acompañaron durante el desarrollo de este trabajo, especialmente a mi directora, Dra. Mariela A. Bruno, por su dedicación, paciencia y acompañamiento tanto en el ámbito científico como personal, y a mi co-directora Delia L. Bernik, por sus enseñanzas.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio con quienes tuve el placer de compartir el trabajo diario durante este proceso, por el aprendizaje mutuo, la agradable compañía, y la contención en los momentos más difíciles. A mi colega, Costi, que siempre estuvo dispuesta para darme una mano cuando así lo necesité y me acompañó en el trabajo experimental. A Cacho, quien me recibió en el CIPROVE y de quien aprendí que nadie lo sabe todo, siempre hay cosas nuevas por saber.

Por último, a mi familia y amigos, a mi mamá que me dio la posibilidad de estudiar y de elegir, a mi papá que me inspiró en el amor por la naturaleza, a mi hermana y a mi hermano con quienes he sabido disfrutar la vida, a mis amigos por el apoyo incondicional.

A continuación, se detallan los trabajos científicos elaborados a partir de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral:

- Bertucci, J. I., Salese, L., Liggieri, C. S., Garrote, G. L., Bruno, M. A. (2023). Preparation of whey protein hydrolysates with ACE-inhibitory activity using cysteine peptidases from *Bromelia hieronymi* Mez. (Bromeliaceae). *International Journal of Dairy Technology*. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12943>
- Salese, L., Liggieri, C. S., Bernik, D. L., & Bruno, M. A. (2022). Characterization of the fruit proteolytic system of *Bromelia serra* Griseb. (Bromeliaceae) and its application in bioactive peptides release. *Journal of Food Biochemistry*, 46(1), e14016. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfbc.14016>

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	4
Abreviaturas.....	12
Capítulo I	14
I.1. Introducción general.....	15
I. 1.1. Enzimas.....	15
I.1.1.1. Primeros usos.....	16
I.1.1.2. Clasificación de las enzimas.....	18
I.1.1.3 Rol de las enzimas proteolíticas en las plantas.....	22
I.1.1.4 Usos actuales de las proteasas.....	23
I.1.2 Importancia del conocimiento de la diversidad biológica.....	24
I.1.3 Fuentes de proteínas.....	25
I.1.4. Hidrolizados proteicos.....	25
I.2 Objetivos.....	27
I.2.1 Objetivo general.....	27
I.2.2 Objetivos específicos.....	27
I.3 Hipótesis.....	28
I.4 Bibliografía.....	30
Capítulo II	35
II.1 Introducción.....	36
II.1.1 Familia Bromeliaceae.....	36
II.1.2 Etnobotánica.....	39
II.1.3 Estudio de proteasas de origen vegetal.....	39
II.1.3.1 <i>Bromelia hieronymi</i> Mez.....	40
II.1.3.2 <i>Bromelia serra</i> Griseb.....	40
II.1.3.3 <i>Deinacanthon urbanianum</i> (= <i>Bromelia urbaniana</i>).....	41
II.2 Materiales y métodos.....	42
II.2.1 Material vegetal.....	42
II.2.2 Histoquímica: localización de las proteasas <i>in situ</i>	43
II.2.3 Obtención de los extractos proteolíticos.....	44
II.2.3.1 <i>Bromelia hieronymi</i> Mez.....	44
II.2.3.2 <i>Bromelia serra</i> Griseb.....	44
II.2.3.3 <i>Deinacanthon urbanianum</i> (Mez) Mez.....	45
II.2.4 Purificación parcial con solventes orgánicos.....	45
II.2.5 Concentración proteica.....	45
II.2.6 Actividad enzimática.....	46

II.2.6.1 Determinación de las condiciones óptimas para medir la actividad caseinolítica de los extractos de <i>B. serra</i>	47
II.2.6.2 Actividad enzimática sobre sustratos sintéticos	48
II.2.7 Determinación de las masas moleculares por SDS-PAGE	49
II.2.8 Determinación de los puntos isoeléctricos por isoelectroenfoque (IEF)-zimograma	51
II.2.9 Análisis estadístico de resultados	53
II.3 Resultados y discusión	55
II.3.1 Identificación de las peptidasas por histoquímica enzimática	55
II.3.2 Caracterización de los extractos obtenidos	55
II.3.2.1 Purificación parcial con solventes orgánicos	59
II.3.2.2 Caracterización enzimática de <i>B. serra</i>	60
II.3.2.3 Actividad enzimática sobre sustratos sintéticos	66
II.3.3 Determinación de las masas moleculares por SDS-PAGE	68
II.3.4 Determinación de los puntos isoeléctricos por IEF-zimograma	69
II.4 Conclusiones	73
II.5 Bibliografía	75
Capítulo III	80
III.1 Introducción	81
III.1.1 Métodos de purificación	81
III.1.2 Separación cromatográfica	81
III.1.2.1 Exclusión molecular	81
III.1.2.2 Intercambio iónico	82
III.1.2.3 Afinidad	82
III.1.2.4 Hidrofobicidad	83
III.1.3 Peptidasas purificadas a partir de bromeliáceas	83
III.1.3.1 Ananas comosus (L.) Merr., "ananá"	84
III.1.3.2 Especies del género Bromelia L.	84
III.1.3.3 Pseudananas macrodentes	85
III.2 Materiales y métodos	86
III.2.1 Precipitación isoeléctrica	86
III.2.2 Separación cromatográfica	86
III.2.2.1 Exclusión molecular	87
III.2.2.2 Intercambio iónico	87
III.2.2.3 Esquemas cromatográficos empleados	87
III.2.3 Análisis de las fracciones cromatográficas	89
III.2.3.1 Actividad enzimática	89

III.2.3.2 Determinación de puntos isoeléctricos	89
III.2.3.3 Determinación de la huella peptídica por espectrometría de masas.....	90
III.3 Resultados	92
III.3.1 Fraccionamiento por precipitación isoeléctrica	92
III.3.2 Separación cromatográfica.....	93
III.3.2.1 Cromatografía de exclusión molecular	93
III.3.2.2 Cromatografía de intercambio iónico	96
III.3.3 Actividad caseinolítica y tabla de purificación	103
III.3.4 Huella peptídica de la proteasa de pI < 3,5.....	104
III.4 Conclusiones	107
III.5 Bibliografía	109
Capítulo IV	113
IV.1 Introducción	114
IV.1.1 Hidrolizados de proteínas alimentarias.....	114
IV.1.1.1 Sustratos proteicos.....	115
IV.1.1.1.1 Aislado proteico de soja	115
IV.1.1.1.2 Proteínas de leche bovina.....	116
IV.1.1.2 Péptidos bioactivos.....	117
IV.1.2.1 Actividad antioxidante	118
IV.1.2.2 Actividad antihipertensiva.....	119
IV.2 Materiales y métodos	120
IV.2.1 Preparación de los hidrolizados	120
IV.2.1.1 Preparación de las soluciones enzimáticas.....	120
IV.2.1.2 Preparación de los sustratos proteicos.....	120
IV.2.1.3 Determinación de las condiciones óptimas de reacción.....	121
IV.2.1.4 Determinación de la concentración proteica por los métodos de Lowry, Kjeldahl y/o Hull	121
IV.2.2 Seguimiento de los productos de hidrólisis	124
IV.2.2.1 Determinación del grado de hidrólisis	124
IV.2.2.2 Determinación de masas moleculares	126
IV.2.2.3 Determinación de actividades biológicas	129
IV.2.4 Purificación de los péptidos de interés.....	133
IV.2.4.1 Fraccionamiento con tubos Millipore.....	133
IV.2.4.2 Separación cromatográfica.....	133
IV.2.4.3 Exclusión molecular	133
IV.2.4.4 Secuenciamiento de péptidos por fragmentación mediante espectrometría de masas (ESI-Orbitrap)	133

IV.2.5 Análisis estadístico de resultados.....	134
IV.3 Resultados	135
IV.3.1 Caracterización de los hidrolizados obtenidos con enzimas de <i>B. serra</i>	135
IV.3.1.1 Seguimiento de los productos de hidrólisis	135
IV.3.1.2 Actividad biológica de los hidrolizados	139
IV.3.2 Caracterización de los hidrolizados obtenidos con enzimas de <i>B. hieronymi</i>	142
IV.3.2.1 Liberación de péptidos bioactivos utilizando el Bh A	142
IV.3.2.2 Liberación de péptidos bioactivos utilizando el Bh B.....	148
IV.3.3 Hidrolizados seleccionados.....	154
IV.3.3.1 Fraccionamiento de los hidrolizados seleccionados	156
IV.4 Conclusiones.....	163
IV.5 Bibliografía	165
Capítulo V	173
V.1 Introducción	174
V.1.1 Almidones naturales	174
V.1.1.1 Gelatinización y retrogradación del almidón	174
V.1.1.2 Estructura química	175
V.1.2 Complejos de inclusión con almidones	175
V.1.3 Almidones resistentes (RS)	176
V.1.4 Complejo de inclusión almidón-iodo	177
V.2 Materiales y métodos.....	178
V.2.1 Encapsulamiento de proteasas	178
V.2.1.1 Obtención del ligando.....	178
V.2.1.2 Material encapsulante.....	178
V.2.1.3 Protocolo de encapsulamiento.....	179
V.2.1.4 Evaluación del rendimiento	179
V.2.2. Encapsulamiento de péptidos bioactivos	179
V.2.2.1 Obtención del ligando.....	179
V.2.2.2 Elección del material encapsulante	180
V.2.2.3 Protocolo de encapsulamiento.....	180
V.2.2.4 Caracterización del AM-HT mediante la formación de complejos con iodo	181
V.2.2.5 Identificación de la formación del complejo de inclusión mediante difracción de rayos X.....	182
V.3 Resultados	184
V.3.1 Caracterización de los ligandos	184
V.3.2 Encapsulamiento de proteasas de <i>B. hieronymi</i>	184

V.3.3 Encapsulamiento de péptidos bioactivos	185
V.3.3.1 Encapsulamiento mediante gelatinización y retrogradación del AM	185
V.3.4 Estudio del AM-HT	186
V.3.4.1 Obtención y descripción de las características de la muestra	186
V.3.4.2 Descripción del reactivo de yodo	187
V.3.4.3 Complejos de inclusión iodo-almidón.....	188
V.3.4.4 Evaluación de la capacidad encapsulante del AM-HT.....	189
V.3.4.5 Evaluación del encapsulamiento de péptidos utilizando AM-HT	191
V.4 Conclusiones	194
V.5 Bibliografía	196
Capítulo VI	200
VI.1 Conclusiones generales	201
VI.2 Bibliografía	203
Anexo I	204

Abreviaturas

AA: actividad antioxidante	GH%: grado de hidrólisis porcentual
aac: aminoácido	GMP: glicomacropéptido
AAPH: 2,2'-Azobis(2-metilpropionamida) dihidrocloruro	HCCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
AB: bicarbonato de amonio	IAA: iodoacetamida
ABD: agua bidestilada	IEF: isoelectroenfoque
ABTS: ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	LAC: lactosuero bovino
AC: actividad caseinolítica	LR: patrones <i>Low range</i>
ACN: acetonitrilo	m/z: relación masa/carga
AD: agua destilada	MP: patrones multipéptidos
AE: actividad específica	NR: no retenido
AF: ácido fórmico	OPA: O-ftaldehído
AIA: ácido iodoacético	PAR: precipitado acetónico redissuelto
AM: almidón de mandioca	PER: precipitado etanólico redissuelto
AM-HT: almidón de mandioca con tratamiento hidrotérmico	pI: punto isoelectrónico
AP: antes del presente	PM: peso molecular
BHT: butilhidroxitolueno	PMF: <i>peptide mass fingerprint</i>
c.s.p: cantidad suficiente para	PSA: persulfato de amonio
CAS: sustrato caseína	RS: almidón resistente
CV: volumen de columna	RT: tiempo de retención
DMSO: dimetilsulfóxido	SAB: seroalbúmina bovina
DS: desvío estándar	SDS: dodecilsulfato sódico
DTT: ditioneitol	SOJ: aislado proteico de soja
EC: extracto crudo	TCA: ácido trifluoroacético
ECA: enzima convertidora de Angiotensina I	TEMED: tetrametiletilendiamina
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	TFA: ácido trifluoroacético
ELF: electroforesis	TNBS: ácido trinitrobenzeno sulfónico
EM: esferas de mandioca	UA: unidades de absorbancia
FI: Fase inferior	Uca: unidad caseinolítica
FS: fase superior	α -LA: alfa lactoalbúmina
	β -LG: beta lactoglobulina

Capítulo I

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

En este capítulo se desarrolla la introducción general, se exponen los objetivos generales y específicos, así como también se enuncian las hipótesis a partir de las cuales se desprende el presente trabajo de tesis.

I.1. Introducción general

I. 1.1. Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos y en su gran mayoría, son biomoléculas de naturaleza proteica, aunque excepcionalmente se han encontrado algunas moléculas de ARN catalíticas denominadas ribozimas. Un catalizador es una sustancia que incrementa la velocidad de una reacción química sin consumirse (Karp, 2014; Chang, 2007). Muchas enzimas son proteínas conjugadas, ya que contienen componentes no proteicos denominados cofactores, que pueden ser inorgánicos como metales u orgánicos, denominados en este último caso coenzimas (Karp, 2014). Los catalizadores pueden ser compuestos inorgánicos u orgánicos e Independientemente de su naturaleza química, poseen tres características fundamentales: 1) incrementan la velocidad de una reacción; 2) forman un complejo de transición con los reactivos; 3) no tienen efecto sobre el equilibrio de la reacción (Becker *et al.*, 2007).

Las enzimas son biomoléculas que catalizan reacciones químicas de manera eficiente y selectiva. Poseen una importancia central en la existencia de la vida ya que son las mediadoras del metabolismo interviniendo en cada reacción que ocurre en la célula. En ausencia de catalizadores, las reacciones químicas de los organismos vivos, que son necesarias para mantener su vitalidad, no tendrían lugar o procederían tan lentamente que serían imperceptibles (Curtis *et al.*, 2011; Karp, 2014).

Las enzimas sólo se requieren en pequeñas cantidades y no se alteran de forma irreversible durante la reacción. Su mecanismo de acción no afecta la termodinámica de la reacción en la que intervienen y por lo tanto no determinan la proporción de reactivos y productos en el equilibrio, ya que no afectan el equilibrio químico. Sólo actúan incrementando la velocidad en la que procede una reacción química termodinámicamente favorable. Los catalizadores inorgánicos como el platino metálico y el magnesio aceleran las reacciones cientos a miles de veces con respecto a la velocidad sin catalizador. Las enzimas elevan la velocidad de 10^6 a 13^{18} o incluso más. Actúan en condiciones fisiológicas y son muy específicas con respecto a los reactivos, denominados sustratos, a los que se unen y a la reacción que catalizan (Chang, 2007: Karp, 2014).

Las enzimas disminuyen la energía de activación, necesaria para lograr el encuentro eficiente entre los reactivos en el denominado *estado de transición*, que constituye un complejo activado transitorio en el cual ciertos enlaces se forman y otros se rompen. Esto se produce gracias a la formación de un complejo enzima-sustrato que se establece en un lugar específico de la enzima denominado *sitio activo* o *catalítico*, siendo las superficies de la enzima y de los sustratos complementarias entre sí, lo cual favorece su unión con mucha precisión. Esta interacción explica la elevada especificidad de las enzimas (Karp, 2014).

Como se mencionó anteriormente, las enzimas tienen un gran poder catalítico, a menudo muy superior al de los catalizadores inorgánicos. Poseen un elevado grado de especificidad y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH (Nelson & Cox, 2009). Por ejemplo, durante la síntesis de D-manosa, ampliamente utilizada en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética, generalmente se producen muchos subproductos o productos tóxicos, debido a la débil especificidad de los catalizadores inorgánicos utilizados en la reacción. Se requiere de un control estricto de temperatura (98-150 °C), pH (2-3), tiempo y presión en el proceso de reacción, por lo que el costo de la producción se ve incrementado. Es por esto que se han investigado diferentes catalizadores biológicos que trabajan a temperaturas más bajas (30-60 °C) y condiciones de pH cercanos a la neutralidad (6-8) (Wu *et al.*, 2019).

1.1.1.1. Primeros usos

Si bien el término “enzima” fue acuñado por Khune recién en 1876, estas moléculas han sido empleadas desde hace miles de años antes del presente (AP). Durante la Edad de Piedra (2500 millones de años - 6000 años AP) los seres humanos hacían uso de organismos y sus productos para producir nuevos alimentos a partir de diferentes materias primas, por ejemplo, el pan y el vino. De esta manera, las sociedades humanas llevaban a cabo procesos que hoy son estudiados por el área de la Biotecnología. Además de producir panificados, otros productos que se obtenían a partir de procesos enzimáticos eran el vino y la cerveza, y fermentos para conservar vegetales y leche como, por ejemplo, la elaboración de chucrut y de queso (Uhlig, 1998).

Se considera que la tecnología de la fermentación se expandió desde la Mesopotamia hacia el resto del mundo. Varios autores han reportado que la elaboración de cerveza y del vino surgieron hace más de 6000 años (Fonseca, 2007; Legras *et al.*, 2007; Díaz, 2010). Sin embargo, existe evidencia arqueológica de la producción de bebidas fermentadas en China desde hace 9.000 años AP y registros de la elaboración de vino en Irán y Egipto que datan de 8.000 y 5.000 años AP (McGovern *et al.*, 1997; 2004; Cavalieri *et al.*, 2003). Las nuevas tecnologías de análisis permitieron documentar evidencia biomolecular de la elaboración de vino y viticultura en

muestras arqueológicas del cercano Oriente de 8.000-7.800 años AP (**Figura I.1**) (McGovern *et al.*, 2017).



Figura I.1. Vasija representativa del Neolítico temprano proveniente del sitio arqueológico Khramis Didi-Gora (región de Georgia, sur del Cáucaso). Tomado de McGovern *et al.* (2017).

A través de la historia, las comunidades de cada región a lo largo de todo el mundo han elaborado fermentos a partir de materias primas vegetales y animales (**Figura I.2**). La mayoría de los alimentos y bebidas fermentados se originaron de forma espontánea sin el agregado intencional de iniciadores (*starters*), como se realiza en la actualidad (Tamang *et al.*, 2020).



Figura 1.2. Distribución global de los sustratos y principales grupos de microbios involucrados en la fabricación de alimentos y bebidas fermentados. Los sustratos principales se indican en negrita (BAL: bacterias ácido-lácticas). Adaptado de Tamang *et al.* (2020).

1.1.1.2. Clasificación de las enzimas

Para denominar a las enzimas, generalmente se emplea el sufijo “asa” añadido al nombre del sustrato sobre el cual actúa o a una palabra o frase que describe su actividad. Así, la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la ADN polimerasa cataliza la polimerización de desoxirribonucleótidos en la síntesis del ADN. Otras enzimas reciben nombres muy generales, acuñados previamente a que se conozca la reacción específica en la cual están involucradas. Por ejemplo, una enzima que actúa en la digestión de los alimentos se llamó pepsina, derivado del griego *pepsis*, “digestión” (Nganzeu *et al.*, 2020). A veces la misma enzima tiene dos o más nombres, o dos enzimas diferentes tienen el mismo nombre. Por ejemplo, la enzima quimosina (E.C.3.4.23.4) del estómago de los terneros, que es empleada como coagulante de la leche en la manufactura de quesos, es en ciertas oportunidades denominada renina (en inglés *rennin*) por numerosos autores (Rojas *et al.*, 2009; Bensmail *et al.*, 2020), aunque también se denomina renina a una de las enzimas que regulan la presión sanguínea (en inglés *renin*; sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona; E.C.3.4.23.15; Ames *et al.*, 2019). Debido a esto último y al número creciente de enzimas identificadas, se ha adoptado por acuerdo internacional un sistema de nomenclatura y clasificación de las enzimas. A cada enzima se le asigna un número clasificatorio que consta de cuatro dígitos y un nombre sistemático, el cual identifica la reacción catalizada. El sistema de clasificación de las enzimas creado por la Comisión de Enzimas (*Enzyme Commission*, E.C.) perteneciente a la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) distribuye a las mismas en siete clases, según el tipo de reacción catalizada: Oxidorreductasas (1),

Transferasas (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5), Ligasas (6) y Translocasas (7) de acuerdo con la reacción que catalizan (**Tabla I.1.**). Esta última clase fue incorporada en el año 2018 por la E.C. y corresponde a enzimas que regulan o permean iones o moléculas a través de membranas. Su incorporación impulsó la reclasificación de enzimas de otros grupos y su incorporación al grupo 7 (Tipton, 2018; Balaji, 2022).

Tabla I.1. Clasificación internacional de enzimas. Adaptado de Nelson & Cox (2009).

Nº de clase	Nombre de clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidorreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP o a un cofactor similar
7	Translocasas	Translocación de iones o moléculas a través de membranas (Tipton, 2018; Balaji, 2022)

1.1.1.2.1 Peptidasas

Las peptidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace peptídico, es decir, la unión amida entre los aminoácidos que conforman proteínas y péptidos. Se trata de moléculas esenciales para la existencia de todos los organismos vivos debido a las funciones que se les atribuye modificando proteínas por hidrólisis, las cuales constituyen una de las principales macromoléculas de los organismos. Su síntesis depende de la disponibilidad de los aminoácidos precursores, y parte de ellos pueden ser obtenidos mediante hidrólisis enzimática por degradación de proteínas celulares, formando parte del recambio proteico que continuamente ocurre en la célula. Varios mecanismos proteolíticos participan del mismo, los que incluyen a las calpaínas activadas por Ca^{+2} , las catepsinas lisosómicas y las proteasas que conforman el proteasoma, el cual capta proteínas marcadas con ubiquitina (Rodríguez López, 2009). Los procesos de crecimiento y remodelación celular y de tejidos en los organismos multicelulares,

requieren la descomposición de moléculas preexistentes de proteína junto con la síntesis de otras nuevas. Hay muchas formas de proteólisis parcial que también son muy importantes para el desarrollo de la vida. Por ejemplo, muchas moléculas de proteína recién sintetizadas requieren de la eliminación de un péptido contenido en la misma proteína, para convertirla a la forma biológicamente activa. Diversas proteasas son sintetizadas como pro-enzimas que son catalíticamente inactivas y subsecuentemente, son activadas en el lugar y momento apropiado para cumplir su función. Por ejemplo, las proteasas pancreáticas no son sintetizadas en forma activa sino como zimógenos, los cuáles se activan por hidrólisis de un segmento proteico en el duodeno donde ejercerán su acción biológica (Becker *et al.*, 2007). Este mecanismo tipo “interruptor” que permite activar las proteínas es una forma importante de regulación biológica. Sin embargo, así como se puede iniciar rápidamente la actividad de una proteína mediante la proteólisis de un péptido señal, también puede fácilmente inactivarse. Un ejemplo drástico, es el de las caspasas, que median la apoptosis realizando cortes específicos en enzimas que son vitales para el metabolismo celular. Debido a que los organismos están compuestos por proteínas, los mismos pueden ser atacados por medio de proteólisis, aunque también un mecanismo proteolítico puede contribuir al sistema de defensa, como en el reconocimiento de fragmentos peptídicos de proteínas foráneas que desencadenan una respuesta inmunitaria (Nelson & Cox, 2009; Barret, 2000).

Según la clasificación del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, NC-IUBMB) las peptidasas integran la subclase 3.4 de la clasificación EC, las cuales se agrupan en diferentes sub-subclases según el tipo de enlace químico sobre el cual actúen, como muestra la **Figura I.3**. Las exopeptidasas hidrolizan solamente en los extremos de las cadenas polipeptídicas. Pueden atacar el extremo N-terminal, pudiendo liberar un único residuo aminoácido (aminopeptidasas, EC 3.4.11), o un dipéptido o tripéptido (di/tripeptidilpeptidasa, EC 3.4.14); o también pueden actuar sobre el extremo C-terminal, pudiendo liberar un único aminoácido (carboxipeptidasas, EC, 3.4.16-18), o un dipéptido (peptidil-dipeptidasas, EC 3.4.15). En cambio, las endopeptidasas, hidrolizan las uniones internas de las cadenas polipeptídicas. Se agrupan de acuerdo a sus mecanismos catalíticos y la nomenclatura está relacionada con los aminoácidos involucrados en el sitio activo. En las peptidasas serínicas (EC 3.4.23), la actividad catalítica depende de la interacción entre un nucleófilo, una base general y un ácido, que generalmente son residuos de los aminoácidos serina, histidina y ácido aspártico. En las peptidasas cisteínicas (EC 3.4.21) el nucleófilo es el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína. El mecanismo es similar al de las peptidasas serínicas y treonínicas (EC 3.4.25) en las cuales también se requiere un nucleófilo y un donante de protones que es representado por un

residuo de histidina. Las peptidasas aspárticas (EC 3.4.22) presentan una estructura bilobal característica donde cada lóbulo contribuye al sitio catalítico con un residuo del ácido aspártico. Por otra parte, las metalopeptidasas (EC 3.4.24) generalmente contienen Zn en el sitio activo. Generalmente los aminoácidos His, Glu, Asp y Cys actúan como ligando y, muchas veces, no sólo forman complejos con Zn sino también con Co y Mn (NC-IUBMB, 1992; Rawlings *et al.*, 2007; Caffini *et al.*, 2009).

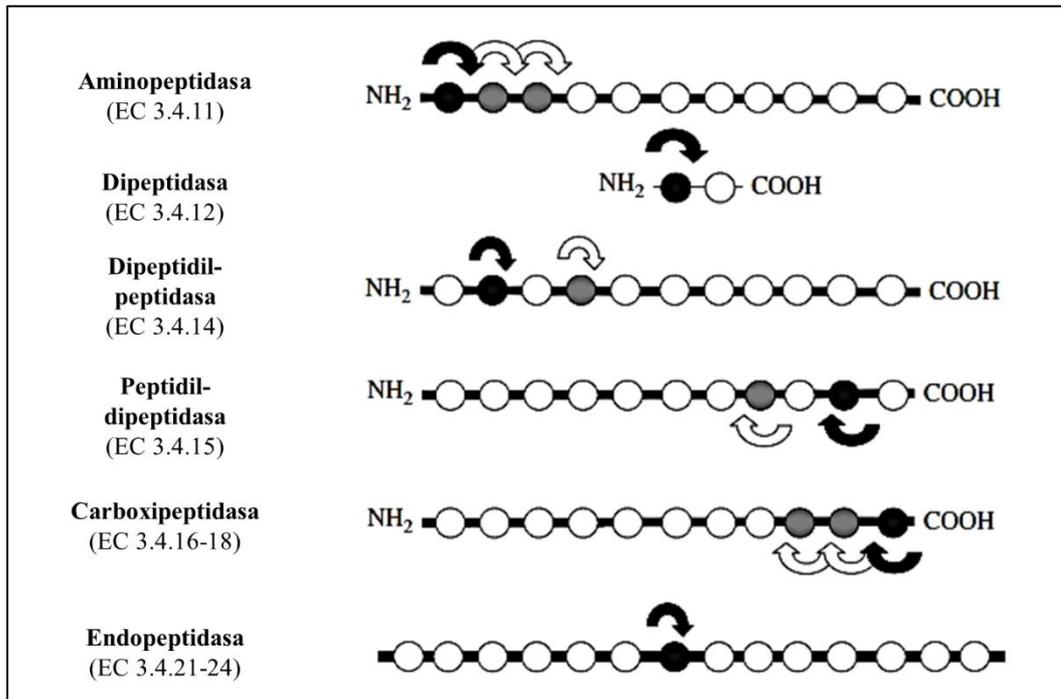


Figura 1.3. Clasificación de las peptidasas según la reacción catalizada. Cada círculo representa un aminoácido y la línea negra que los une representa la unión peptídica. Las flechas negras indican el primer corte y las blancas los subsiguientes. En el primer corte, el aminoácido hacia el cual se dirige la escisión está coloreado de negro y, para los siguientes clivajes, los aminoácidos se muestran en gris. Tomado de Rawlings *et al.* (2007).

1.1.1.2.2 Peptidasas cisteínicas tipo papaína

La papaína (EC 3.4.22.2) es la proteasa cisteínica más conocida. Fue aislada en 1879 a partir de los frutos de *Carica papaya* L. (Caricaceae) y fue la primera proteasa a la cual se le determinó su estructura cristalográfica. El mecanismo de acción de las peptidasas cisteínicas ha sido muy bien estudiado, siendo la papaína la enzima modelo de este grupo (Grzonka *et al.*, 2007). Las proteasas de este tipo muestran un núcleo (*core*) conservado, el cual está conformado por dos dominios claramente diferenciados, una hélice α y una estructura tipo barril β (dominios L y R, respectivamente). La estructura tridimensional de la papaína se puede identificar con la de una proteína globular con tres enlaces disulfuro y dos dominios L y R catalíticos (**Figura 1.4**). El sitio activo se encuentra en la interfaz de los dominios L y R, aparece como una hendidura en forma

de “V”, y está formado por residuos de Cys, His, Asn y Gln, que se conservan en todas las proteasas tipo papaína. En la proteína madura, Cys₂₅ e His₁₅₉ forman un bolsillo catalítico con un par iónico estabilizado por Asn₁₇₅, el cual orienta el anillo de imidazol His₁₅₉. El grupo sulfhidrilo de Cys₂₅ realiza un ataque nucleofílico (Streitwieser & Heathcock, 1989) en el carbono carbonílico del enlace peptídico de un sustrato, lo que lleva a la formación de un intermediario tetraédrico inestable. Este intermediario colapsa espontáneamente para regenerar el grupo carbonilo, lo que deriva en un complejo enzima-acilo, que se hidroliza en la enzima libre y la porción N-terminal del sustrato. Otro residuo importante es Gln₁₉, que precede a Cys₂₅ y se cree que ayuda a formar un hueco oxianiónico al estabilizar al intermediario tetraédrico. La Asn₁₇₅ forma un enlace de hidrógeno con His₁₅₉ (que muestra un rol similar al del ácido aspártico en la tríada catalítica de las proteasas serínicas), pero no es necesario para la catálisis. Por otra parte, Trp₁₇₇ está involucrado en la generación del carácter nucleofílico del par de iones Cys₂₅/His₁₅₉ (Fernández-Lucas *et al.*, 2017).

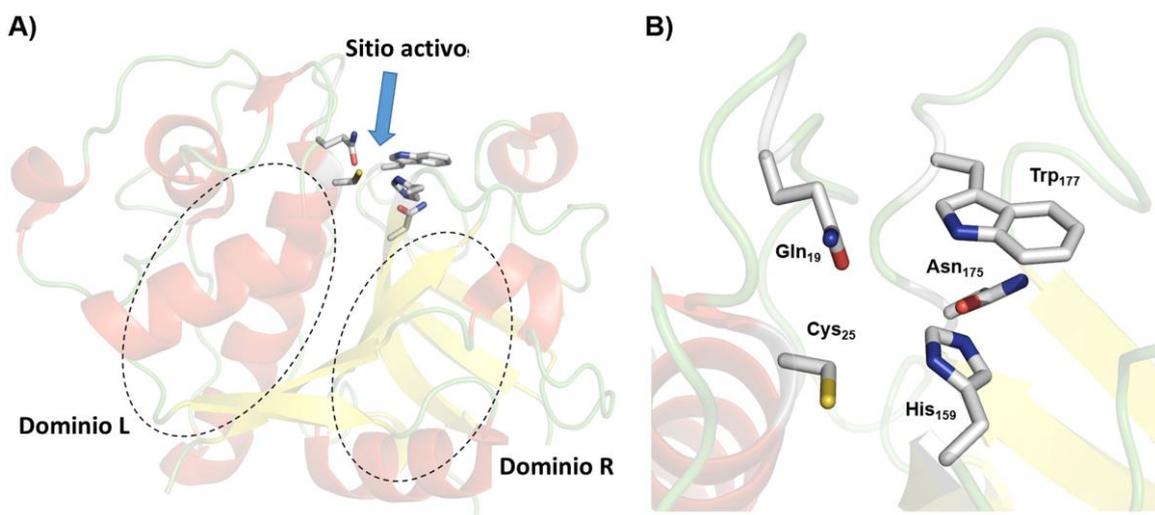


Figura 1.4. Estructura tridimensional de la papaína (A). Residuos catalíticos del sitio activo (B). Adaptado de Fernández-Lucas *et al.* (2017).

1.1.1.3 Rol de las enzimas proteolíticas en las plantas

Las proteasas se encuentran en las plantas cumpliendo diversas funciones. Uno de los principales roles está relacionado con los procesos regulatorios en la modificación y degradación de proteínas, como se mencionó anteriormente. En este sentido, Buono *et al.* (2018) explican cómo las proteasas están implicadas en procesos biológicos como lo son la muerte celular programada de diferentes tejidos vegetales y la senescencia. Por otro lado, las enzimas proteolíticas están involucradas en procesos de almacenamiento de los cuerpos proteicos en las

semillas, así como en la degradación y movilización de las proteínas en el proceso de germinación (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

Otro aspecto importante en cuanto a la función de las proteasas en las plantas tiene que ver con el reconocimiento y/o inducción de respuestas defensivas ante el ataque de patógenos como es el caso de las proteasas presentes en el látex de frutos (Ramos *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2020).

Si bien las proteasas se encuentran generalmente en cantidades relativamente bajas y muchas veces son difíciles de detectar, algunas especies vegetales son capaces de sintetizarlas en cantidades extremadamente altas, principalmente se trata de especies de las familias Caricaceae, Bromeliaceae y Moraceae. Este hecho poco habitual podría estar relacionado con los mecanismos de defensa contra agentes patógenos, parásitos y herbívoros (Dussourd, 1993; Ramos *et al.*, 2019).

1.1.1.4 Usos actuales de las proteasas

Las proteasas constituyen más del 60 % del mercado de enzimas, pudiendo ser obtenidas a partir de diferentes fuentes biológicas (Morellón-Sterling *et al.*, 2020). En la actualidad las peptidasas son utilizadas en diversas industrias como por ejemplo para el curtido de cueros, en la industria alimentaria, para el tratamiento de efluentes industriales y en la síntesis de compuestos específicos (Morellón-Sterling *et al.*, 2020; da Silva & de Castro, 2018). En el campo de los alimentos se emplean en la tiernización de carnes, en la preparación de productos lácteos, panificados, en el proceso de elaboración de cerveza y para la obtención de hidrolizados proteicos.

A las proteasas vegetales provenientes de fuentes no tóxicas se las considera como GRAS (*Generally Recognized As Safe*), estatus que corresponde a productos de origen natural que pueden ser aplicados en tecnologías agrícolas, alimentarias y farmacéuticas (*U. S. Food and drugs administration*, 2022). Existen preparaciones comerciales ampliamente estudiadas que poseen fitopeptidasas, como la bromelina del ananá (*Ananas comosus* (L.) Merr.), cuyo sistema proteolítico es derivado mayormente del fruto y del tallo y contiene cuatro peptidasas principales de tipo cisteínico: bromelina de tallo (EC 3.4.22.32), ananaína (EC 3.4.22.31), comosaína y bromelina de fruto (EC 3.4.22.33). Estas proteasas también están presentes en otras partes de la piña, como la piel, el corazón, la corona y las hojas (Arshad *et al.*, 2014; Ramli *et al.*, 2018). Esta preparación posee aplicaciones biomédicas como antiinflamatoria, antitumoral, antiedematosa, antitrombótica y fibrinolítica, así como usos en biotecnología alimentaria en la tiernización de

carnes, panificación y en la producción de hidrolizados (Ketnawa *et al.*, 2012; Arshad *et al.*, 2014; Ramli *et al.*, 2017). Por su parte, la papaína, es obtenida a partir del látex de la planta de la papaya, la cual es una fuente natural de otras endopeptidasas como la quimopapaína (EC 3.4.22.6), la caricaína (EC 3.4.22.30) y la glicil endopeptidasa (EC 3.4.22.25). La papaína posee la capacidad de degradar diversas proteínas y actúa en un amplio rango de condiciones de trabajo. Es empleada en la industria cervecera y quesera, y alternativamente, como suplemento enzimático para tratar diferentes problemáticas gastrointestinales, tales como el síndrome del intestino permeable, la hipoclorhidria y la respuesta inmunogénica producida por la intolerancia al gluten (Fernández-Lucas *et al.*, 2017; Silva-López & Gonçalves, 2019; Bradauskiene *et al.*, 2022).

I.1.2 Importancia del conocimiento de la diversidad biológica.

La diversidad biológica puede ser definida como la variabilidad presente en todas las especies de plantas y animales, su material genético y los ecosistemas en los cuales se desarrollan. Se pueden mencionar tres niveles: diversidad genética, referida a la variación a nivel de genes y genotipos; la diversidad de especies, referida a la riqueza específica; y la diversidad de ecosistemas, referida a las comunidades de especies y su ambiente. La importancia de la biodiversidad ha sido reconocida en las últimas décadas, mostrando un papel fundamental para el desarrollo sustentable de muchas actividades humanas (Ramanatha Rao & Hodgkin, 2002).

Por su parte, las plantas verdes (Viridiplantae) son esenciales para el desarrollo de la vida. Constituyen la principal fuente de materias primas a nivel global y son utilizadas por la humanidad con fines nutricionales, como alimento para la producción de ganado, como combustible, en la elaboración de textiles y en el área de la medicina, entre otros. Se estima que existen 391.000 especies de plantas terrestres, además de 8.000 especies de algas (Kersey, 2019).

Desde el Ministerio de Ambiente de la Nación Argentina se ha impulsado la “Estrategia Nacional sobre Biodiversidad y Plan de Acción 2011-2020” (ENBPA), una política de estado que incluye dentro de sus objetivos específicos la conservación de especies silvestres y su diversidad genética. En el mismo se argumenta que el territorio argentino posee una complejidad geográfica y ambiental significativa en su extensa superficie de 3,7 millones de km². Como resultado de ello, presenta una importante variedad de paisajes y climas, y una diversidad de ecosistemas que conllevan a una gran diversidad de especies. En Argentina se han registrado 10.006 especies de plantas vasculares, siendo el mayor número de especies de la Región del Cono Sur. De todas estas especies, 1.749 son endémicas de Argentina, representando el 17,5 % del total de especies del

país (Zuloaga & Belgrano, 2015). En este sentido, el registro y estudio de las plantas nativas es de relevancia tanto a nivel global como así también regional, existiendo políticas de estado que lo respaldan.

I.1.3 Fuentes de proteínas

Según la FAO (*Food and Agriculture Organization*), se considera que un tercio del peso total de las partes comestibles de los alimentos producidos para consumo humano se pierde o se desecha. Los subproductos y residuos de alimentos presentan componentes muy complejos, muchos de los cuales pueden poseer un gran valor. Los mismos pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos productos o insumos comerciales ya sea para la industria alimentaria, u otras tales como el área farmacéutica, biomédica o cosmética (Mullen *et al.*, 2015).

Los residuos industriales representan una problemática ambiental y social debido a que muchas veces son desechados de manera inadecuada provocando alteraciones en los ecosistemas, atrayendo plagas y con ellas, enfermedades que ponen en riesgo la salud de las comunidades aledañas (Clichevsky, 2002). Numerosas investigaciones se enfocan en la utilización de residuos de diversas industrias para la obtención de nuevos productos como, por ejemplo, la producción de biogás a partir de desechos de la industria alimentaria, del sector agrícola y de los residuos sólidos urbanos (Atelge *et al.*, 2020), o la generación de bioestimulantes a partir de la transformación de residuos lácteos o desechos ricos en queratina (Caballero *et al.*, 2020; 2020). Muchos residuos presentan altos valores proteicos y pueden ser aprovechados para distintos fines. Entre los principales desechos ricos en proteínas se encuentran derivados de la industria alimentaria, los cuales contienen entre un 10 y un 20 % (p/p) de proteínas (Pleissner & Venus, 2016). Por ejemplo, el bagazo resultante de la producción de cerveza a base de malta constituye una importante fuente de proteínas que suele ser aprovechada para la alimentación de ganado. Por otra parte, los subproductos resultantes de la producción de alimentos a base de legumbres y de la producción de aceite a partir de semillas, pueden contener compuestos bioactivos beneficiosos para la salud por lo que son atractivos para su valorización ya sea para consumo humano u otras aplicaciones (Mullen *et al.*, 2015).

I.1.4. Hidrolizados proteicos

La hidrólisis de proteínas puede llevarse a cabo mediante procesos enzimáticos o químicos. Los procesos químicos, que incluyen a la hidrólisis alcalina o ácida, tienden a ser difíciles de controlar y derivan en productos con aminoácidos modificados, pudiendo ocurrir en algunos

casos la destrucción de algunos de ellos. Por otra parte, la hidrólisis enzimática se puede realizar en condiciones suaves y podría evitar los entornos extremos que requieren los tratamientos químicos. Por lo general, durante los procesos enzimáticos no se producen reacciones secundarias o suceden con mucha menor frecuencia y no disminuyen el valor nutricional de la fuente de proteína. Además, las enzimas presentan especificidad de sustrato lo que permite desarrollar hidrolizados de proteínas con características químicas y nutricionales mejor definidas. Sin embargo, el procesamiento enzimático puede presentar ciertas dificultades ya que ciertos cambios relativamente pequeños en la estructura de las proteínas, la presencia de inhibidores, la necesidad de cofactores y la autólisis, pueden causar alteraciones en la función enzimática (Tavano, 2013). De esta manera, las proteasas se pueden considerar una herramienta importante en los procesos involucrados en la obtención de hidrolizados para la obtención de péptidos específicos, siempre y cuando se realice una elección adecuada de las mismas.

I.2 Objetivos

I.2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es obtener, purificar y caracterizar fitopeptidasas de bromelias autóctonas (Bromeliaceae) y emplearlas en la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias, con el fin de ser evaluados como posibles componentes en alimentos funcionales y nutracéuticos.

I.2.2 Objetivos específicos

1. Aislar, purificar y caracterizar peptidasas de bromelias autóctonas.
2. Utilizar las preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de bromelias en reacciones de hidrólisis de proteínas alimentarias.
3. Determinar, la presencia de péptidos antioxidantes y antihipertensivos en los hidrolizados.
4. Caracterizar, fraccionar y secuenciar los péptidos bioactivos de interés.
5. Encapsular los péptidos bioactivos más promisorios en matrices polihidroxiladas (almidones).

1.3 Hipótesis

- Algunas peptidasas presentes en *Bromelia hieronymi* Mez, *B. serra* Griseb. y *Deinacanthon urbanianum* (Mez) Mez son promisorias como biocatalizadores industriales debido a sus características específicas.
- Las fitopeptidasas en estudio son capaces de liberar péptidos bioactivos encriptados en proteínas alimentarias.
- Los almidones constituyen una matriz adecuada para encapsular los péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis enzimática.

El trabajo de investigación está enfocado en la caracterización de enzimas vegetales de *B. serra* que han sido escasamente estudiadas, y de *D. urbanianum*, que no han sido estudiadas anteriormente, por lo que constituye un importante aporte en relación a la búsqueda de nuevas enzimas vegetales que puedan ser utilizadas con fines industriales. Estos sistemas enzimáticos son comparados con las proteasas de *B. hieronymi*, las cuales han sido previamente caracterizadas en el CIPROVE. Las peptidasas obtenidas y caracterizadas en este trabajo de tesis provienen de especies nativas de Argentina, aportando al conocimiento de la biodiversidad regional para una potencial aplicación de este bien natural.

Varias especies de la familia Bromeliaceae producen proteasas en cantidades inusuales, las cuales pueden ser utilizadas con fines industriales. En este trabajo de tesis se utilizan los extractos proteolíticos de dos especies nativas para la obtención de hidrolizados funcionales y péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias. Estos hidrolizados constituyen alimentos funcionales en sí mismos o pueden ser incorporados como ingredientes en la formulación de uno de ellos, aportando beneficios para la salud. Adicionalmente, una preparación con péptidos bioactivos podría devenir en la generación de compuestos con alto impacto de aplicación en el campo de la biomedicina. Se propone la utilización de algunos sustratos proteicos que representan subproductos de la industria y de comercios locales, por lo que su aprovechamiento contribuiría a disminuir el impacto ambiental y a darle valor agregado a la producción regional.

Finalmente, el material biológico de partida constituye especies del género *Bromelia* cuyas hojas son colectadas por integrantes de pueblos originarios, quienes emplean su fibra de alta calidad en la confección de artesanías, mientras que los frutos ricos en peptidasas no son utilizados. Por lo tanto, el uso total del bien natural generaría un mejor aprovechamiento del mismo, y su intento por cultivar estas bromelias de manera eficiente lograría mejorar su accesibilidad, tanto para el uso artesanal como para la utilización a mayor escala de sus proteasas.

I.4 Bibliografía

Ames, M. K., Atkins, C. E., & Pitt, B. (2019). The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *Journal of veterinary internal medicine*, 33(2), 363-382.

Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(17), 7283-7297.

Atelge, M.R., Krisa, D., Kumar, G. et al. (2020). *Waste and Biomass Valorization*, 11, 1019–1040.

Balaji, S. The transferred translocases: An old wine in a new bottle. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, vol. 69, no 4, p. 1587-1610.

Barrett, A. J. (2000). Proteases. *Current protocols in protein science*, 21(1), 21-1.

Becker, W., Kleinsmith, L., & Hardin, J. (2007)a. Capítulo 6: “Enzimas: los catalizadores de la vida”, en “*El mundo de la célula*”, Sexta edición. Pearson Educación S. A. Págs. 139-164.

Bensmail, S., Boudjema, K., & Naimi-Fazouane, F. (2020). Production of extracellular rennin-like enzyme by a newly isolate *Mucor circinelloides* (von Tieghem) and its application in Camembert cheese making.

Bradauskiene, V., Vaiciulyte-Funk, L., Cernauskas, D., Dzingeleveciene, R., Lima, J. P., Bradauskaite, A., & Tita, M. A. (2022). The efficacy of plant enzymes bromelain and papain as a tool for reducing gluten immunogenicity from wheat bran. *Processes*, 10(10), 1948.

Buono, R. A., Hudecek, R., & Nowack, M. K. (2019). Plant proteases during developmental programmed cell death. *Journal of Experimental Botany*, 70(7), 2097-2112.

Caballero, P., Macías-Benítez, S., Revilla, E., Tejada, M., Parrado, J., & Castaño, A. (2020). *European Journal of Soil Biology*, 101, 103244.

Caballero, P., Rodríguez-Morgado, B., Macías, S., Tejada, M., & Parrado, J. (2020). *Waste and Biomass Valorization*, 11, 3281-3292.

Caffini, N. O.; Natalucci, C. L. & Salas Bravo, C. E. (2009). Tipos de proteasas, distribución y rol en los vegetales en N. O. Caffini (Ed.), *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales* (pp. 151–162). Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTED.

Cavalieri, D., McGovern, P. E., Hartl, D. L., Mortimer, R., & Polsinelli, M. (2003). Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of molecular evolution*, 57(1), S226-S232.

Chang, R. (2007). Capítulo 13: “Cinética Química” en “química”, Novena edición. McGraw-Hill Interamericana de España S.L. Págs. 581-589

Clichevsky, N. (2002). *Pobreza y políticas urbano-ambientales en Argentina*. Cepal.

Curtis H., Barnes N. S., Schnek, A. y Massarini A. (2011). Capítulo 4: Metabolismo y energía. En “*Biología*” 7ma edición. Editorial Panamericana, ISBN 978-950-06-0334-8. Pgs. 81-91.

Da Silva, V. G., & de Castro, R. J. S. (2018). Biocatalytic action of proteases in ionic liquids: Improvements on their enzymatic activity, thermal stability and kinetic parameters. *International journal of biological macromolecules*, 114, 124-129.

Díaz, F. V. (2010). "Historia del vino" en *Enología: vinos, aguardientes y licores*. Editorial Vértice. Págs. 1-11.

Dussourd, D.E. (1993). "Foraging with finesse: caterpillar adaptations for circumventing plant defenses", en "Caterpillars: Ecological and evolutionary constraints on foraging" (Stamp, N.E. & T.M.Cassey, eds.), págs. 92-131. Chapman & Hall, New York.

Estrategia Nacional de Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad - Plan de Acción (ENBPA) 2011-2020. <https://www.argentina.gob.ar/ambiente/biodiversidad/estrategia-nacional>

Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., & Hormigo, D. (2017). New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 91-101.

Fonseca, V. (2007). Breve historia de la cerveza. *Virtual Pro*, vol. 64.

Freitas, C. D., Silva, R. O., Ramos, M. V., Porfírio, C. T., Farias, D. F., Sousa, J. S., ... & Grangeiro, T. B. (2020). Identification, characterization, and antifungal activity of cysteine peptidases from *Calotropis procera* latex. *Phytochemistry*, 169, 112163.

Grudkowska, M., & Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3), 609-624.

Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., & Wiczak, W. (2007). Cysteine proteases. *Industrial enzymes: structure, function and applications*, 181-195.

Karp, G. (2014) "Bioenergética, enzimas y metabolismo" en *Biología Celular y Molecular, conceptos y experimentos*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., Séptima Edición. Págs. 94-107

Kersey, P. J. (2019). Plant genome sequences: past, present, future. *Current opinion in plant biology*, 48, 1-8.

Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and bioproducts processing*, 90(3), 385-391.

Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular ecology*, 16(10), 2091-2102.

McGovern, P. E., Hartung, U., Badler, V. R., Glusker, D. L., & Exner, L. J. (1997). The beginnings of winemaking and viticulture in the ancient Near East and Egypt. *Expedition*, 39(1), 3-21.

McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., ... & Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre-and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(51), 17593-17598.

Morellon-Sterling, R., El-Siar, H., Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, Á., & Fernández-Lafuente, R. (2020). Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. *International journal of biological macromolecules*, 162, 394-404.

- Mullen, A. M., Álvarez, C., Pojić, M., Hadnadev, T. D., & Papageorgiou, M. (2015). Classification and target compounds. In *Food waste recovery* (pp. 25-57). Academic Press.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Principios de bioquímica de Lehninger*. (5ª ed.). Ediciones Omega.
- Nganzeu, C., Bock, J. M., & Johnston, N. (2020). Gastric Acid and Pepsin Roles in Reflux Disease. *Laryngopharyngeal and Gastroesophageal Reflux: A Comprehensive Guide to Diagnosis, Treatment, and Diet-Based Approaches*, 23-38.
- Pleissner, D., & Venus, J. (2016). Utilization of protein-rich residues in biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 2133-2140.
- Ramanatha Rao, V., & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant cell, tissue and organ culture*, 68, 1-19.
- Ramli, A. N. M., Aznan, T. N. T., & Illias, R. M. (2017). Bromelain: from production to commercialisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1386-1395.
- Ramli, A., Manas, N., Hamid, A., Hamid, H. A. & Illias R. M. (2018). Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from *Ananas comosus*. *Food Chemistry*, 266: 183-191.
- Ramos, M. V., Demarco, D., da Costa Souza, I. C., & de Freitas, C. D. T. (2019). Laticifers, latex, and their role in plant defense. *Trends in plant science*, 24(6), 553-567.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., & Barrett, A. J. (2007). An introduction to peptidases and the MEROPS database. In *Industrial enzymes* (pp. 161-179). Springer, Dordrecht.
- Rodríguez López, J. N. (2009). "Proteólisis intracelular: Recambio proteico". UMU, Facultad de Biología, Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular. URL: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/6236>. Sitio web visitado el 12/05/2023.
- Rojas, E., Valbuena, E., Torres, G., Piñero, M., & Galindo, L. M. (2009). Aislamiento y rendimiento del GMP mediante precipitación de lactosuero con ácido tricloroacético. *Revista Científica*, 19(3), 295-302.
- Silva-López, R. E., & Gonçalves, R. N. (2019). Therapeutic proteases from plants: biopharmaceuticals with multiple applications. *J Appl Biotechnol Bioeng*, 6(2), 101-109.
- Streitwieser, A. & Heathcock, C. (1989). Capítulo 9 "Sustitución nucleofílica" en *Química orgánica*. Tercera edición, Mc Graw-Hill, Interamericana de México, pág. 176-209.
- Tamang, J. P., Cotter, P. D., Endo, A., Han, N. S., Kort, R., Liu, S. Q., ... & Hutkins, R. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 184-217.
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Tipton, K. (Agosto de 2018). *Translocases (EC 7): A new EC Class*. <https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/10/Translocases-EC-7>.
- U. S. Food and drugs administration. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>, consultado en marzo de 2022.

Uhlir, H. (Ed.). (1998). *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons.

UK, G. P. M., & Ireland, K. F. T. (1992). IUPAC-IUBMB joint commission on biochemical nomenclature (JCBN) and nomenclature committee of IUBMB (NC-IUBMB) Newsletter 1996. *Eur. J. Biochem*, 204, 1-3.

Wu, H., Zhang, W., & Mu, W. (2019). Recent studies on the biological production of D-mannose. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 8753-8761.

Zuloaga, F. O., & Belgrano, M. J. (2015). The catalogue of vascular plants of the Southern Cone and the Flora of Argentina: their contribution to the World Flora. *Rodriguésia*, 66, 989-1024.

Capítulo II

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS PROTEOLÍTICOS

En este capítulo se aborda parte del objetivo N° 1, en cuanto al aislamiento y caracterización de las peptidasas presentes en las distintas especies de bromelias autóctonas.

II.1 Introducción

II.1.1 Familia Bromeliaceae

La familia Bromeliaceae comprende un grupo de plantas perennes que presentan generalmente porte herbáceo. El tallo suele ser un eje corto sobre el cual se disponen las hojas en roseta. También pueden presentar un porte arbustivo, por lo que las bromeliáceas pueden medir desde unos pocos centímetros hasta varios metros de altura. Pueden presentar hábito terrestre, saxícola o ser epífitas. Las hojas se disponen en espiral, son rígidas, acanaladas, a menudo cubiertas con cutícula escamosa, con tricomas peltados, al menos cuando son jóvenes. Constan de una vaina dilatada en la base y lámina entera, con margen liso o serrado espinoso, inermes o con fuertes agujones. Las hojas de algunas especies epífitas del género *Tillandsia*, además de ser los órganos fotosintéticos, se encuentran también cumpliendo una función de fijación. En algunos casos las vainas foliares forman un receptáculo donde se forma un reservorio de agua de las precipitaciones atmosféricas, constituyendo un factor importante para su nutrición (Smith & Till, 1998).

En cuanto a la fase reproductiva, las bromeliáceas presentan inflorescencias terminales que a menudo se vuelven pseudolaterales por crecimiento simpodial, pudiendo ser escaposas o sésiles, compuestas o simples. Generalmente presentan brácteas conspicuas de colores brillantes o también pueden encontrarse brácteas del escapo petaloides. Las flores son perfectas o, a veces, funcionalmente unisexuales (*Hechtia*, *Catopsis*), generalmente actinomorfas, rara vez zigomorfas, con perianto heteroclamídeo con tres tépalos externos sepaloideos, libres o soldados en la base, persistentes, y tres tépalos internos petaloideos, libres o unidos en la base, generalmente con dos escamas internas basales. Los estambres se presentan en dos verticilos, tres opuestos a los tépalos externos y tres a los internos, libres o soldados, ya sea por sus filamentos o a la corola formando un tubo pétalo-estamíneo; las anteras son bitecas, introrsas, de dehiscencia longitudinal. El ovario es tricarpelar, trilocular, con placentación axilar o central, ínfero en las Bromelioideae, semisúpero en las Pitcarnioideae o súpero en las Tillandsioideae, con un estilo y tres estigmas. El fruto es una cápsula en todas las Bromeliaceae de ovario súpero o semisúpero, de dehiscencia septicida, a veces loculicida; o una baya (**Figura II.5**) cuando procede de ovario

ínfero, formando a veces un fruto compuesto. Las semillas son pequeñas pueden ser aladas, plumosas o desnudas, de albumen farinoso (Smith & Till, 1998).

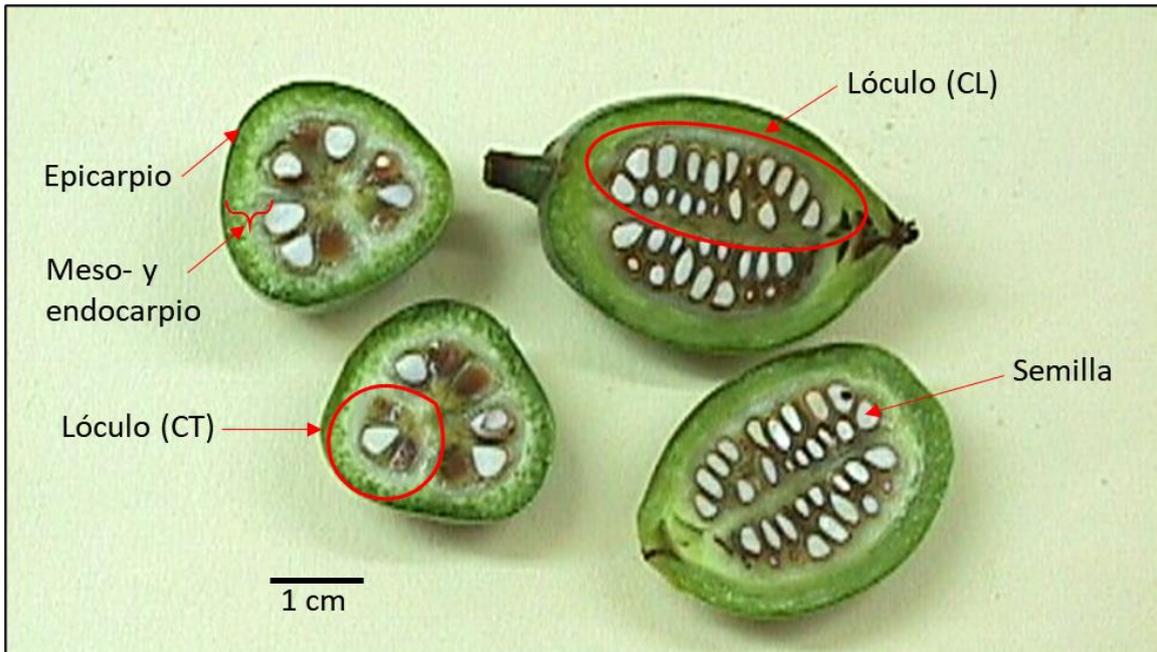


Figura II.5. Fruto de *B. hieronymi* en corte transversal (CT, izquierda) y corte longitudinal (CL, derecha).

La familia Bromeliaceae se encuentra distribuida en la región neotropical, desde América del Norte (Virginia) hasta América del Sur (Patagonia), y es representada por una sola especie en el oeste de África (**Figura II.6**). Su localización geográfica abarca amplios rangos de alturas, latitudes y climas, lo que se ve reflejado en la enorme variabilidad anatómica, morfológica y ecológica de sus más de 3300 especies que se distribuyen en 58 géneros (Smith & Till, 1998; Palma-Silva, 2016).



Figura II.6. Distribución geográfica de ejemplares de bromeliáceas. La escala de colores indica la cantidad de especímenes reportados. Tomado del sitio <https://tropicos.org/> (07/01/23).

Tradicionalmente, las bromeliáceas fueron divididas en tres subfamilias: Pitcairnioideae, Bromelioideae y Tillandsioideae; sin embargo, estudios filogenéticos confirman la monofilia de las subfamilias Bromelioideae y Tillandsioideae, mientras que Pitcairnioideae resulta parafilética. En consecuencia, esta subfamilia ha sido dividida en 5 subfamilias monofiléticas: Pitcairnioideae s.s., Brocchinioideae, Lindmanioideae, Navioideae y Hechtioideae (Barfuss *et al.*, 2005; Givnish *et al.*, 2011; Gitaí *et al.*, 2014).

Las especies endémicas son aquellas que se distribuyen en un área geográfica restringida. La importancia del endemismo radica en la necesidad de conocer y proteger los atributos biológicos e historia evolutiva que representan los taxones endémicos y sus patrones biogeográficos (Noguera-Urbano, 2017). En un estudio realizado por Zizka *et al.* (2020) se analiza la ocurrencia de 3.272 especies de bromelias (93,4 % del total de especies que integran la familia), encontrando que los principales centros de diversidad y endemismo de bromelias están comprendidos por el Bosque Atlántico en el este de Brasil, las laderas andinas, América Central y las tierras altas de Guayana. Las subfamilias de bromelias filogenéticamente más antiguas se centran en las tierras altas de Guayana, mientras que las grandes radiaciones del grupo se extienden a través de diferentes hábitats y una gran área geográfica. Los centros de endemismo se encuentran en la Mata Atlántica, los Andes centrales, el sur de Venezuela y el sur de México. En contraste, la mayor parte de la Amazonia y el centro de América del Sur tienen un endemismo más bajo (**Figura II.7**).

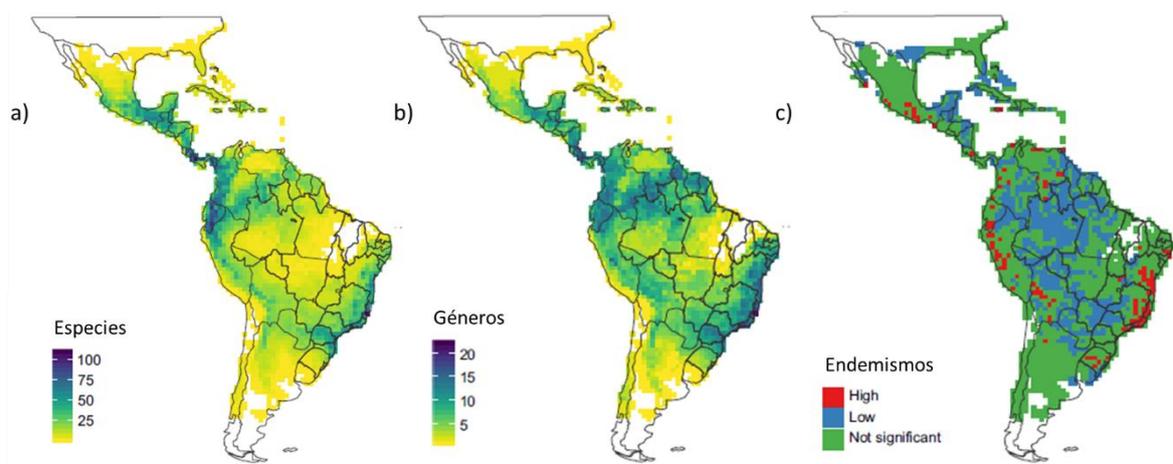


Figura II.7. Distribución de la riqueza de especies (a) y géneros (b), y de los endemismos (c) de las bromeliáceas de América. La escala de colores indica el número de especies (a), número de géneros (b) o el grado de endemismo (c). Tomado de Zizka *et al.* (2020).

II.1.2 Etnobotánica

Según Van Dam (2000) la voz *chaguar* es de origen quechua y con ella se designa un conjunto de seis bromeliáceas comestibles y textiles que crecen en el chaco. En la zona de influencia guaranítica, reciben el nombre de caraguatá. Las voces “caraguatá”, “chaguar” y “cardo”, suelen ir acompañadas de un epíteto que describe alguna cualidad de la planta. Estas varían mucho localmente y se adjudican a una y otra especie. Se reproducen algunos de esos nombres para ilustrar la situación: “chaguar blanco”, “chaguar santiagueño”, “chaguar rosado”, “cardo gancho”, “cardo gancho blanco” asignados a *B. hieronymi*; “cardo gancho”, “chaguar morado”. “chaguar chaqueño” para *B. serra*; “chaguar salado”, “chaguarillo”, para *D. urbanianum*; “caraguata'y”, “caraguatá chuza”, “cardo gancho” aplicados a *Aechmea distichantha* Lem. (Arenas, 2004).

Se trata de plantas del sotobosque y del tapiz vegetal del chaco, que cumplen una función importante en la conservación del suelo de este ecosistema en creciente proceso de desertificación. Son ampliamente utilizadas por las comunidades Wichí y los demás pueblos chaqueños y han sido objeto de numerosos estudios botánicos, además de haber recibido mucha atención de parte de los antropólogos en todo lo concerniente a procesos de recolección y transformación de chaguar (Arenas, 2012).

Las comunidades nativas han dado diferentes usos a los llamados “chaguares”, principalmente a sus fibras foliares. Por ejemplo, Suárez (2019) realizó un relevamiento de las especies silvestres que son utilizadas con fines medicinales por la comunidad Wichí de Salta (Argentina), en el cual aparecen dos especies de chaguares, *B. hieronymi* y *D. urbanianum*, utilizadas con fines farmacológicos en el tratamiento de heridas. Arenas (2004) documenta que *B. serra* y *B. hieronymi* son empleadas para consumo entre distintos grupos étnicos de la región chaqueña. Sin embargo, su principal uso ha sido reportado en la fabricación de textiles y cordelería. Suárez & Montani (2010) describen la fabricación de bolsos por parte de las mujeres de la comunidad Wichí, quienes utilizan fibras de *B. hieronymi* y de *D. urbanianum*, según se trate de bolsos menos o más refinados, respectivamente, debido a la naturaleza de las fibras foliares.

II.1.3 Estudio de proteasas de origen vegetal

Las fitopeptidasas son ampliamente estudiadas por sus diversas funciones, no sólo con el objetivo de elucidar mecanismos biológicos sino también por las diversas aplicaciones que surgen en diferentes áreas productivas. En los últimos tiempos, ha aumentado la demanda de catalizadores enzimáticos debido a las numerosas ventajas que presentan, tales como la eficiencia, ya que generalmente se utilizan en bajas concentraciones, la selectividad, y por las

condiciones suaves en las que actúan (pH cercano a la neutralidad y bajas temperaturas), entre otras características, por lo que resulta una alternativa amigable con el ambiente en comparación a los catalizadores químicos. Las industrias de procesamiento de alimentos, bebidas, textiles, cuero, bio-combustible, detergentes, y papel, son las que consumen la mayor cantidad de enzimas, siendo las hidrolasas las más utilizadas. Particularmente las enzimas proteolíticas, además de ser empleadas en las industrias mencionadas, presentan aplicaciones en medicina y biotecnología (Arroyo *et al.*, 2014; Banerjee & Ray, 2017).

El estudio de enzimas como biocatalizadores industriales resulta fundamental para el desarrollo de nuevos sistemas biotecnológicos que sean compatibles con el avance de las emergentes tecnologías que buscan ser sustentables y sostenibles. En nuestro laboratorio se han realizado numerosas investigaciones en torno a proteasas producidas por especies vegetales que se distribuyen a lo largo del territorio argentino. En el presente trabajo de tesis se abordan tres especies de la familia Bromeliaceae, las cuales se mencionan en las siguientes secciones.

II.1.3.1 *Bromelia hieronymi* Mez

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han demostrado que a partir de los frutos inmaduros de *B. hieronymi* se pueden obtener extractos proteolíticamente activos. Se han logrado caracterizar, purificar y secuenciar los extremos amino terminales de tres proteasas, las cuales fueron denominadas como Hieronymaína I, II y III. Estas enzimas presentan masas moleculares de alrededor de 24 kDa, tratándose de un valor típico para las proteasas de tipo cisteínico, grupo al cual pertenecen las peptidasas de *B. hieronymi* (Bruno *et al.*, 2003, 2006, 2008).

Además de su caracterización y purificación, los extractos enzimáticos obtenidos a partir de los frutos de esta especie han sido investigados con fines aplicados. En este sentido, se estudió la capacidad de un extracto proteolítico parcialmente purificado con etanol para coagular la leche de vaca con el objetivo de obtener quesos, proponiendo la utilización de un cuajo vegetal como alternativa a la quimosina que es la enzima comercial utilizada en la industria quesera (Bruno *et al.*, 2011). Por otra parte, las enzimas de *B. hieronymi* también han sido utilizadas de manera preliminar para liberar péptidos bioactivos a partir de proteínas de lactosuero, con el objetivo de incorporarlos en la formulación de alimentos funcionales o nutraceuticos (Bertucci, 2012; Bertucci *et al.*, 2023).

II.1.3.2 *Bromelia serra* Griseb.

En el caso de *B. serra*, se han realizado estudios parciales, los cuales incluyen parte de la caracterización y fraccionamiento de las peptidasas presentes en los frutos. La investigación

realizada por Caffini *et al.* (1988) menciona que mediante trituración de los frutos semimaduros de *B. serra*, en presencia de acetona fría, se obtiene un polvo acetónico con actividad proteolítica. Luego de hacer una extracción en buffer, se obtiene una solución enzimática que muestra estabilidad térmica a temperaturas moderadas y un máximo de proteólisis a pH 6,0-7,8. Por cromatografía de intercambio iónico se lograron separar dos fracciones proteolíticas, sin embargo, no se continuó con la investigación. Por lo tanto, estos antecedentes constituyen un punto de partida para el estudio de esta especie, el cual se retoma en este trabajo de tesis.

Por otra parte, recientemente han sido estudiadas las proteasas presentes en las hojas de *B. serra*. Gómez Herrera *et al.* (2022) demostraron que dichas peptidasas presentan mayor actividad a pH ácido que a pH neutro, y su temperatura óptima es alrededor de los 60 °C. Sus puntos isoeléctricos se encuentran entre 4,55-8,15 y son inhibidas por la pepstatina A y por el E-64, inhibidores de peptidasas aspárticas y cisteínicas, respectivamente. Además, lograron purificar dos fracciones activas de 21 y 54 kDa.

II.1.3.3 *Deinacanthon urbanianum* (Mez) Mez

En el caso de *D. urbanianum*, no existe ningún reporte sobre el estudio del sistema proteolítico, ya sea de los frutos o de otros órganos o tejidos de esta planta. Los únicos trabajos preexistentes tienen que ver con análisis filogenéticos de la familia Bromeliaceae (Gitaí *et al.*, 2005; Schulte, 2005; Paule *et al.*, 2020) y con estudios etnobotánicos y antropológicos que abordan la utilización de las fibras foliares para la fabricación de diferentes textiles por parte de las comunidades Wichí, como se mencionó en la **sección I.1.2** En este sentido, dentro de los chagares utilizados para tales fines, *D. urbanianum* se destaca como la especie poseedora de las fibras más tenaces y resistentes al desgaste, a la humedad y al agua. Su durabilidad la distingue por sobre las otras, y es considerada insustituible para la confección de artículos que poseen contacto con el agua, como son las redes de pescar, cuerdas para el acarreo de pescado, etcétera (Arenas, 2004).

El estudio de esta especie vegetal resulta de interés, ya que es la única de las especies nativas de Argentina de la subfamilia *Bromelioideae*, que aún no ha sido investigada en cuanto a su sistema proteolítico.

II.2 Materiales y métodos

II.2.1 Material vegetal

Para el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral se empleó material vegetal correspondiente a tres especies nativas pertenecientes a la familia Bromeliaceae, dos de las cuales corresponden al género *Bromelia*. La tercera corresponde a una especie endémica del Cono Sur, perteneciente al género monotípico *Deinacanthon*, cuya única especie fue clasificada por L. B. Smith dentro del género *Bromelia*, aunque el nombre aceptado es el otorgado por C. C. Mez.

Las infrutescencias de *B. hieronymi* fueron colectadas en el Jardín Botánico de la ciudad de Santiago del Estero, Argentina, por el Prof. Ing. Manuel Palacio de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (marzo de 2017 y abril de 2018). Los frutos de *B. serra* fueron colectados por la Lic. Graciela Klekailo en el Campo Experimental Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina (mayo de 2017) y por la Ing. Melanie Gómez Herrera, en el Paraje Pelón, localidad de Santa Ana de los Guacarás, Departamento San Cosme, Corrientes, Argentina (mayo de 2019). 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*. Por otra parte, se estudiaron las hojas de *D. urbanianum*, las cuales fueron extraídas de ejemplares cultivados en la ciudad de La Plata, aportados por la Ing. Marcela Sanchez (INTA, Hurlingham, Buenos Aires), provenientes de la provincia de San Luis, Argentina. Respecto a la última especie mencionada, no se pudieron estudiar sus frutos debido a que, al ser una especie poco investigada y que se encuentra en hábitats de difícil acceso, no fue sencillo localizarla. Su fenología es incierta (comunicación personal con la Dra. Nora B. Muruaga, curadora del herbario fanerogámico del Herbario LIL, Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina) y, a pesar de que en bibliografía (Zuloaga *et al.*, 2008 ; Cabido *et al.*, 2010; Figueroa & Giménez, 2015; Quiroga, 2014) y bases de datos biológicas (www.tropicos.org; www.floraargentina.edu.ar) se documenta una amplia distribución a lo largo del territorio argentino, las poblaciones suelen tener acceso restringido por encontrarse en el interior de los montes y en espacios protegidos. Adicionalmente, se intentó inducir la floración utilizando un producto comercial (Fertifox, Laboratorios CROVA, Buenos Aires, Argentina), que contiene una hormona auxínica (ácido naftalenacético) en su composición. El producto fue aplicado según las indicaciones del rótulo (5 cm³ en 2 l de agua, cada 14 días, durante 2 años).

Una vez en el laboratorio, el material vegetal fue lavado con agua corriente, enjuagado con agua destilada, secado al aire, envasado herméticamente y almacenado a -20°C hasta su uso;

en el caso de las hojas de *D. urbanianum*, se retiraron los márgenes espinosos luego de ser lavadas y se procedió de la misma manera que con los frutos.

II.2.2 Histoquímica: localización de las proteasas *in situ*

Se utilizó el método propuesto por Daoust (1965, 1968). Se realizaron secciones transversales de frutos congelados de *B. hieronymi*, las cuales se pusieron en contacto con una capa delgada de sustrato depositada sobre un portaobjeto bajo condiciones óptimas para que suceda la reacción enzimática. La película de sustrato consistió en un gel de agarosa embebido en caseína similar al utilizado para zimografía que se describirá en la **sección I.2.8**. Una vez ocurrida la reacción, se coloreó específicamente el sustrato, y se observaron las diferencias de intensidad de color en la impresión producida por la sección de fruto. La ausencia de color fue considerada como evidencia de elevada acción proteolítica ya que en esas regiones el sustrato estaría completamente degradado, evidenciando de esta manera la localización de las peptidasas en la sección de fruto.

Por otra parte, se empleó el método del film-sustrato de Fratello (1968), el cual se basa en la incubación de secciones vegetales sobre un film fotográfico color procesado no expuesto. Las películas fotográficas a color constan de tres capas de gelatina superpuestas, coloreadas, que impregnan una matriz de nitrocelulosa. La capa más externa es amarilla, la central es magenta y la más interna es azul. Cuando la sección de tejido es colocada sobre el film, las capas de gelatina coloreadas son progresiva y secuencialmente digeridas por las proteasas presentes en la sección de tejido. Después de terminada la reacción, la preparación es montada sobre un portaobjetos y observada con microscopio óptico.

El tercer método empleado consistió en la preparación de geles de poliacrilamida al 12 % con 4 mg de gelatina (como para 2 geles), se colocaron portaobjetos en la bandeja formadora de geles y se depositó la preparación entre la base de la gelera y los portaobjetos. Una vez polimerizados, secciones de fruto congelado fueron puestas en contacto con los geles y se incubaron en cámara húmeda durante 5-30 min a 50 °C. Los geles se fijaron y colorearon (ver sección **II.2.7**). La actividad enzimática fue evidenciada por observación de áreas transparentes debido a la digestión de la gelatina por parte de las peptidasas.

II.2.3 Obtención de los extractos proteolíticos

II.2.3.1 *Bromelia hieronymi* Mez

Los frutos o ejes de la infrutescencia fueron cortados en pequeños trozos, procesados y homogeneizados con una procesadora Phillips durante 1 min alternando 10 s de reposo cada 10 s de procesado. El extracto se obtuvo en medio acuoso utilizando buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,0 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM como agentes protectores. El homogenato resultante fue centrifugado a 16.000 x g para separar restos vegetales insolubles y recuperar las proteínas en la fracción soluble. El sobrenadante, denominado extracto crudo (EC), fue fraccionado y refrigerado a -20 °C hasta su uso. Todos los pasos fueron realizados en un baño de hielo para evitar la autoproteólisis. Excepto el extracto Bh B, el cual se preparó utilizando una proporción de gramos de material vegetal por mililitro de buffer de 2:5 (0,4 g/ml), el resto de los extractos (Bh A, Bh C, Bh D y Bh E) se obtuvieron en una proporción de 1:5 (0,2 g/ml).

II.2.3.2 *Bromelia serra* Griseb.

En primera instancia se prepararon extractos crudos a partir de frutos de *B. serra* provenientes de la localidad de Rosario. Las infrutescencias se clasificaron según el estado de maduración de los frutos, tomando como referencia el color del epicarpio. Las extracciones se realizaron en las mismas condiciones que las de *B. hieronymi*, con una composición de 0,2 g de fruto congelado por ml de buffer de extracción. Los extractos se denominaron: 1.Bs-i (frutos inmaduros), 1.Bs-sm (frutos semimaduros) y 1.Bs-m (frutos maduros).

En una segunda instancia de preparación de extractos se empleó el mismo lote de frutos y se variaron las condiciones operacionales. La composición fue de 1 mg de fruto por ml de buffer de extracción, y se utilizó buffer citrato/fosfato de sodio 0,1-0,2 M de pH 5,0. Los extractos obtenidos se denominaron 2.Bs-i, 2.Bs-sm y 3.Bs-m, siguiendo el mismo criterio que para 1.Bs.

En una tercera instancia de extracción, se emplearon frutos de maduración intermedia del último lote mencionado, esta vez separando las partes de los frutos. Esto se realizó considerando que en el pericarpio podría encontrarse mayor concentración de pigmentos, los cuales interfieren en la purificación de las peptidasas y, por otro lado, que las semillas podrían contener inhibidores de proteasas, afectando la actividad proteolítica. En base a esto, se prepararon tres extractos, denominados 3.Bs-e, 3.Bs-sp y 3.Bs-sps, cuyas composiciones fueron las siguientes: frutos enteros, frutos sin epicarpio (piel), y frutos sin piel y sin semillas, respectivamente.

La cuarta y quinta instancias de extracción se realizaron en las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior, empleando infrutescencias provenientes de las localidades de Corrientes (4.Bs) y Rosario (5.Bs), respectivamente.

II.2.3.3 *Deinacanthon urbanianum* (Mez) Mez

Se preparó un extracto crudo a partir de órganos foliares de *D. urbanianum*, al cual se lo denominó Du. El material vegetal se trituró en presencia de buffer citrato/fosfato de sodio 0,1-0,2 M de pH 5 con EDTA y Cys 5 mM, en una proporción correspondiente a 1 g de hoja por cada ml de buffer. El procedimiento de extracción fue realizado de la misma manera que para los extractos crudos anteriormente detallados.

II.2.4 Purificación parcial con solventes orgánicos

Se realizó una precipitación fraccionada con solventes orgánicos con el objetivo de eliminar compuestos fenólicos, glúcidos y fragmentos proteicos inactivos de bajo peso molecular. El procedimiento consistió en adicionar gota a gota diferentes volúmenes de acetona o etanol (2, 4, 6 y 8 volúmenes) a 1 volumen de extracto crudo para determinar el mínimo volumen de solvente necesario para obtener un extracto parcialmente purificado con valores de actividad enzimática más elevados con respecto al EC de partida. Las muestras fueron manipuladas sobre baño de hielo, empleando los solventes previamente enfriados a -20 °C para evitar la desnaturalización proteica y facilitar la precipitación. Las muestras tratadas fueron colocadas a -20 °C durante al menos 30 min para facilitar la precipitación de la fracción proteica y luego fueron centrifugadas a 16000 x *g* durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron, los precipitados fueron secados al vacío para eliminar restos de solventes y finalmente, se resuspendieron en el mismo volumen de partida de buffer de extracción (Scopes, 1984). A cada suspensión obtenida se le determinó el contenido de proteínas y la actividad proteolítica como se detalla a continuación.

II.2.5 Concentración proteica

Se utilizó el método de Bradford (1976), el cual se fundamenta en que la unión del colorante Coomassie Blue G-250 a la proteína produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). Este método resulta conveniente para la valoración de proteínas en extractos vegetales, los cuales frecuentemente contienen compuestos fenólicos que interfieren con el clásico método de Lowry

(Peterson, 1979). La cuantificación del ensayo se realizó empleando curvas de calibración de seroalbúmina bovina en el rango de 100-1000 $\mu\text{g/ml}$. Se realizó un blanco de reactivos, donde la muestra fue reemplazada por buffer; todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado o cuadruplicado. En la **Tabla II.1** se detallan los volúmenes de reactivos empleados. Las mezclas de reacción se prepararon en una placa multipocillo; la A_{595} fue determinada en un lector de placas luego de un paso de agitación en modo orbital (Infinite Pro M200-TECAN™, Trading AG, Switzerland).

Tabla II.1. Determinación de la concentración proteica por Bradford.

Mezcla de reacción	Volumen de reactivo
Muestra	4 μl
Reactivo de Bradford	196 μ
Agitación y lectura de A_{595} a los 10 min en lector de placas	

II.2.6 Actividad enzimática

La actividad enzimática fue determinada usando caseína como sustrato (López *et al.*, 2000; Reyes Jara *et al.*, 2018), la cual se preparó en todos los casos al 1 % p/v disolviendo la caseína en buffer fosfatos 0,1 M de pH 8,5 o en buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4, según el caso. Se mezcló la caseína con el buffer, se calentó a ebullición durante 20 min, con agitación esporádica, se filtró en caliente, se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente y justo antes de ser empleada se agregó cisteína en la concentración adecuada para evitar la oxidación de los grupos sulfhidrilos del sitio catalítico de las peptidasas. La mezcla de reacción se preparó con 0,1 ml de enzima más 1,1 ml de sustrato y se dejó reaccionar por un período de tiempo en el cual la aparición de producto fue lineal con el progreso del tiempo; la reacción fue detenida por adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % p/v. Los tubos fueron llevados a 4 °C durante 30 min para favorecer la precipitación de proteínas y luego fueron centrifugados a 4000 $\times g$ a 4 °C durante 30 min. Se midió la absorbancia a 280 nm (A_{280}) de los sobrenadantes en un espectrofotómetro UV-visible con arreglo de diodos (Agilent 8453E; Santa Clara, CA, USA) o en un lector de placas.

La actividad enzimática fue referida a unidades caseinolíticas por ml de mezcla de reacción (Ucas/ml), unidad arbitraria definida como la cantidad de enzima requerida para incrementar una unidad de absorbancia a 280 nm por min, en las condiciones del ensayo.

El cálculo de la actividad caseinolítica se realizó según la siguiente ecuación:

$$Uca = \frac{A_{280} \times 10 \times fd}{t}$$

Donde:

fd = factor de dilución de la muestra

t = tiempo de reacción

II.2.6.1 Determinación de las condiciones óptimas para medir la actividad caseinolítica de los extractos de *B. serra*

II.2.6.1.1 Tiempo de reacción

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de lectura de la reacción, se determinó la actividad caseinolítica siguiendo el protocolo mencionado anteriormente, deteniendo la reacción a diferentes tiempos. Se considera tiempo óptimo de reacción al rango de tiempo en el cual la aparición de producto es directamente proporcional al tiempo transcurrido, es decir, ambos parámetros mantienen una relación lineal.

II.2.6.1.2 Temperatura

Se midió la actividad caseinolítica según el protocolo descrito anteriormente, utilizando tres temperaturas diferentes (37, 45 y 55 °C), tomando como referencia las condiciones puestas a punto para extractos proteolíticos de *B. hieronymi* (37 °C) (Bruno *et al.*, 2006).

II.2.6.1.3 Estabilidad térmica

Con el objetivo de conocer la estabilidad térmica de las proteasas presentes en *B. serra*, se determinó la actividad enzimática luego de pre-incubar el extracto proteolítico entre 10-120 min a diferentes temperaturas entre 23-75 °C.

De la misma manera, se pre-incubaron fracciones del mismo extracto a 100 °C durante períodos entre 2-20 min y se determinó la actividad caseinolítica remanente, con el objetivo de evaluar el shock térmico a 100 °C como método para la inactivación enzimática.

Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de la actividad caseinolítica del extracto sin pre-incubar (0 min), que fue considerado como el 100 % de actividad.

II.2.6.1.4 Perfil de pH óptimo

Se determinó la actividad proteolítica del extracto crudo utilizando como sustrato una solución de caseína preparada con buffer de Good (1972) 25 mM (MES, MOPS, TAPS, AMPSO y CAPS) a diferentes valores de pH entre 6 y 12. La reacción se llevó a cabo a 45 °C.

II.2.6.1.5 Identificación del tipo de sitio catalítico: actividad caseinolítica en presencia de inhibidores de grupo.

Con el objetivo de conocer el tipo de catálisis enzimática predominante en el sistema proteolítico de *B. serra*, se ensayó la actividad caseinolítica en presencia de inhibidores de grupo catalítico. Los tratamientos consistieron en pre-incubar fracciones del extracto enzimático con distintas concentraciones de ácido iodoacético (1 y 10 mM), PMSF (1 mM, en presencia y ausencia de cisteína 12 mM; y 10 mM), EDTA (1 y 10 mM) y pepstatina A (0,1 y 1 mM). La incubación con los inhibidores se llevó a cabo a 37 °C, durante 30 min. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la actividad obtenida para los correspondientes controles (100 %), los cuales consistieron en reemplazar el volumen de inhibidor por el solvente empleado en la preparación de los inhibidores (EC+agua y EC+etanol, según el caso).

II.2.6.1.6 Concentración de cisteína

Debido a que las bromeliáceas suelen tener peptidasas con grupos sulfhidrilos, se determinó la concentración adecuada de cisteína para favorecer la actividad enzimática. Para ello se realizó el ensayo de actividad caseinolítica empleando como sustrato, caseína con diferentes concentraciones de cisteína (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 mM).

II.2.6.2 Actividad enzimática sobre sustratos sintéticos

Se midió la actividad enzimática de extractos provenientes de *B. serra* y *D. urbanianum* sobre sustratos sintéticos correspondientes a derivados de N- α -carbобензохи-*p*-nitrofenil ésteres de distintos L-aminoácidos según el método de Silverstein (1974) con modificaciones. Los sustratos mencionados tienen los grupos α -NH₂ y α -COOH bloqueados, con este último unido a un cromóforo que permite la determinación de la actividad endoesterásica respecto del aminoácido que aporta el grupo carboxilo. Se emplearon derivados de Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr y Val. El ensayo se llevó a cabo a 37 °C siguiendo la progresión de la reacción mediante lecturas de absorbancia a 405 nm cada 6 s durante 6 min. La actividad del extracto sobre cada uno de los sustratos fue expresada como una aproximación de la velocidad inicial (pendiente de la curva de absorbancia vs. tiempo) y comparada con su respectivo control.

El método original fue escalado y puesto a punto para poder medir la cinética de la reacción en un lector de placas. Las mezclas de reacción se detallan en la **Tabla II.2**.

Tabla II.2. Ensayo de actividad sobre N- α -carbobenzoxy-p-nitrofenil ésteres de L-aminoácidos

Reactivo	Muestra	Blanco
Sustrato 1 mM (en acetonitrilo)	5 μ l	5 μ l
Buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, Cys 5 mM	185 μ l	195 μ l
Solución enzimática	10 μ l	-

Lectura de A₄₀₅ cada 6 s durante 6 min

II.2.7 Determinación de las masas moleculares por SDS-PAGE

Las masas moleculares y perfiles proteicos de los extractos fueron determinados mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes empleando geles de poli(acrilamida) al 12,5 % (**Tabla II.3**). Se utilizó un equipo Miniprotean III (Bio-Rad Laboratories, Watford, UK) y se procedió de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970) con modificaciones.

Tabla II.3. Composición de los geles para SDS-PAGE

	Resolución	Apilamiento
Acril-Bis 30:0,8	8,3 ml	2,32 ml
Buffer de Resolución	2,5 ml	-
Buffer de Apilamiento	-	1,74 ml
SDS al 10 %	200 μ l	140 μ l
AD c.s.p.	8,78 ml	9,58 ml
PSA al 10 %	210 μ l	210 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l
Volumen final	20 ml	14 ml

Buffer de resolución: Tris-HCl 3M, pH 8,8. Buffer de apilamiento: Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. PSA: persulfato de amonio. TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina.

La preparación de las muestras se realizó mediante la adición de un volumen de buffer de muestra (**Tabla II.4**) para electroforesis a un volumen de preparación enzimática. Las de bajo contenido proteico se concentraron por precipitación con cuatro volúmenes de acetona (-20 °C) y los precipitados se suspendieron en buffer de muestra alcanzando una concentración final de proteína de 1 mg/ml. Las muestras fueron llevadas a ebullición durante 5 min y centrifugadas a 16000 x g.

Para cada muestra se calculó el volumen necesario para sembrar de 10 a 20 µg de proteína por calle (volumen máximo 20 µl) y fueron aplicadas empleando una micropipeta automática.

El buffer de reservorio (**Tabla II.5**) se colocó en el compartimento catódico hasta cubrir la parte superior del gel y en el anódico hasta una altura suficiente como para permitir que todo el electrodo haga contacto con él.

La corrida electroforética se llevó a cabo en dos pasos sucesivos, una primera etapa de apilamiento ("*stacking*"), donde el voltaje fue de 30 V, y una segunda etapa de separación ("*running*") a un voltaje de 100 V hasta la finalización de la corrida, la cual se visualizó por la llegada del azul de bromofenol al borde inferior del gel (frente de corrida).

Los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue G-250 y los valores de las masas moleculares fueron determinados por comparación con patrones proteicos de bajo rango [5 µl; LMW, Bio-Rad: fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbúmina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa)].

Tabla II.4. Buffer de muestra (2x)

Tris	1,57g
SDS	2g
Glicerol al 10 %	8 ml
Azul de bromofenol	2 mg
β-mercaptoetanol	5 ml
Llevar a pH 6,8 con HCl 1M	
AD, c.s.p	50 ml

Tabla II.5. Buffer de reservorio (10 X)

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

II.2.8 Determinación de los puntos isoeléctricos por isoelectroenfoque (IEF)-zimograma

Se determinó el patrón proteico de las muestras en base a los valores de pI . Para ello se utilizó la técnica de isoelectroenfoque para la cual se empleó una Mini IEF Cell, Mod. 111 (Bio-Rad).

Las muestras se concentraron y desionizaron por precipitación con cuatro volúmenes de acetona a 0 °C durante al menos 30 min. Luego de centrifugar a 16000 x g , el sobrenadante obtenido fue descartado y el precipitado fue redisolto con una cantidad de agua bidestilada suficiente para que la concentración de proteína fuera de 1 mg/ml. En el caso de las muestras con baja concentración proteica, se realizaron sucesivos pasos de precipitación en un mismo tubo para lograr la concentración final deseada.

Los geles fueron preparados en una bandeja formadora de geles. Se colocó una película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre un vidrio empleando una gota de agua para hacer el contacto y el conjunto se colocó sobre la bandeja ubicando el vidrio hacia arriba y la película hacia abajo. La mezcla de reactivos para obtener los geles se preparó de acuerdo al listado detallado en la **Tabla II.6**. La solución se desgasificó durante 5 min empleando una bomba de vacío y luego se le adicionaron a la misma 3 μ l de TEMED, 60 μ l de PSA al 10 % y 200 μ l de solución saturada de riboflavina para iniciar la polimerización. La mezcla fue depositada con pipeta entre la película plástica adherida al vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo durante 2 h con exposición lumínica a temperatura ambiente para lograr la polimerización total.

Tabla 6. Composición del gel de IEF

Acrilamida-Bisacrilamida (25 %T, 3 %C)	1 ml
Glicerol (5,1 ml al 87 % en 24, 9 ml de ABD)	1 ml
Anfolitos (Pharmalyte, 3-10)	0,25 ml
ABD	2,75 ml

ABD: Agua bidestilada

Una vez polimerizado el gel, se dejó escurrir el agua remanente y se sembraron las muestras (5 a 10 μ l), permitiendo la difusión de las mismas dentro del gel durante 5 min. El IEF fue llevado a cabo 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 unido a su soporte y separado de la placa de vidrio, fue sumergido durante 30 min en una solución fijadora (**Tabla II.7**), coloreado durante 2 h (**Tabla II.8**) y luego decolorado por lavados sucesivos con solución decolorante I, seguidos de un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro (**Tabla II.9**).

Tabla II.7. Solución fijadora.

Ácido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 ml
Ácido tricloroacético	12,5 g
Agua c.s.p.	100 ml

Tabla II.8. Solución colorante

Ácido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomasie Brilliant Blue R-250	40 mg
CuSO ₄	500 mg
AD c.s.p.	100 ml

Tabla 9. Solución decolorante I y II

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

Los puntos isoeléctricos (pI) de las diferentes proteínas se determinaron por comparación con patrones proteicos de un rango de pI entre 3,5 y 9,3 [amiloglucosidasa (pI 3,50), inhibidor de tripsina (pI 4,55), β -LG A (pI 5,20), anhidrasa carbónica II (pI 5,85), anhidrasa carbónica I (pI 6,55), mioglobina (pI 6,85 and 7,35), lectinas de *Lens culinaris* (pI 8,15, 8,45 and 8,65), y tripsinógeno (pI 9,30); Sigma]. Para determinar los valores de pI se confeccionó una curva de calibración, graficando los pIs de las proteínas patrones en función de la distancia recorrida por las mismas en el gel.

Para detectar las bandas del isoelectroenfoque que poseían actividad proteolítica se utilizó la técnica de zimografía (Westergaard *et al.*, 1980). Los geles sin colorear fueron incubados sobre una placa de agarosa embebida en una suspensión de caseína (preparada según el ítem 12.5) durante 15 min a 55 °C. Luego de fijar y colorear, las zonas de la película de caseína degradadas (transparente) indican la presencia de proteasas en el gel.

II.2.9 Análisis estadístico de resultados

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado o cuadruplicado y los resultados fueron expresados como el promedio \pm el desvío estándar (DS). Los gráficos fueron realizados utilizando el programa Excel (versión 2105 para Microsoft 365 MSO 16.0.14026.20202), en los cuales las barras de error verticales corresponden a \pm DS. En casos donde fue necesario determinar diferencias significativas entre grupos de datos se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, evaluando la significancia de las diferencias determinadas ($p < 0,05$) mediante la aplicación de los test de Dunnett o Tukey dependiendo de si la comparación se realizaría entre un grupo de datos respecto de un grupo control, o entre distintos grupos de datos correspondientes a diferentes tratamientos de la muestra entre sí. El software empleado fue el GraphPad Prism, versión 8.0.2.

II.3 Resultados y discusión

II.3.1 Identificación de las peptidasas por histoquímica enzimática

Con el objetivo de conocer la ubicación de las peptidasas en los tejidos vegetales de los frutos de *B. hieronymi* se aplicaron métodos de histoquímica enzimática para su localización *in situ*. Secciones transversales de frutos congelados fueron colocadas sobre sustratos inmovilizados y luego se incubaron a 50 °C. En el caso de los geles de poliacrilamida y de agarosa, la presencia de peptidasas se evidenció como áreas decoloradas totalmente (transparentes) o por diferencias de intensidad de color azul. Con ambos métodos se observaron regiones menos intensas de color celeste en el mesocarpio y en el tejido interior de los lóculos, en cambio, el epicarpio y los septos mostraron una coloración considerablemente más intensa (**Figura II.8**). Cuando se realizó el método del film-sustrato de Fratello, las tres capas de gelatina fueron digeridas y no se logró ver diferencias en intensidad de la proteólisis entre las distintas partes del fruto debido a la elevada actividad proteolítica de las enzimas presentes.

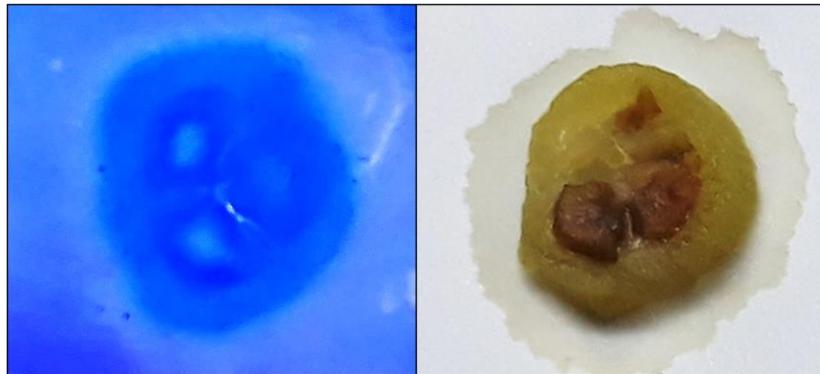


Figura II.8. Actividad caseinolítica *in situ* de las proteasas presentes en las bayas de *B. hieronymi*. Izquierda: gel de poliacrilamida embebido en caseína coloreado con Coomasie Brilliant Blue G250. Derecha: Sección de fruto de *B. hieronymi*.

II.3.2 Caracterización de los extractos obtenidos

Se obtuvieron extractos a partir de tres especies de bromelias autóctonas de Argentina, los cuales fueron analizados como posibles fuentes de proteasas. En la **Tabla II.10** se detalla la composición de los extractos crudos y los valores de concentración proteica y actividad enzimática de los mismos.

En base a los resultados se puede destacar que, de todos los extractos obtenidos a partir de las tres especies de bromeliáceas, los que presentaron mayor contenido de proteínas y actividad caseinolítica fueron los extractos de frutos de *B. hieronymi*.

Debido a que en *A. comosus*, otra especie de la familia Bromeliaceae, a partir del eje de la infrutescencia se recupera mayor actividad proteolítica que a partir de los frutos (Varilla *et al.*, 2021), se estudiaron los extractos de los ejes primarios y secundarios de la infrutescencia de *B. hieronymi*. Contrariamente a lo que ocurre con *A. comosus*, los extractos de ejes de *B. hieronymi* fueron considerablemente menos activos que los extractos de frutos, por lo que se descartó la posibilidad de utilizar estos tallos como fuente de proteasas.

El extracto Bh A mostró la mayor actividad específica, con un valor de $5,7 \pm 0,3$ Ucas/mg, lo que resulta coherente con lo reportado en estudios previos (Bruno *et al.*, 2008). Si bien el extracto Bh B fue preparado con una proporción de fruto correspondiente al doble de la utilizada en el Bh A, no mostró un incremento en la actividad específica ($4,9 \pm 0,2$ Ucas/mg) con respecto a este último, lo que podría deberse a que la capacidad del buffer para mantener las proteínas en suspensión pudo haber llegado a su límite en el Bh B. Sin embargo, la actividad caseinolítica de este extracto fue la mayor de todas las obtenidas, hecho por el cual sería el más adecuado para ser empleado en procesos industriales que requieran una elevada actividad proteolítica, como por ejemplo en la obtención de hidrolizados funcionales a partir sustratos proteicos (Vollet Marson *et al.*, 2020; Ashaolu, 2020).

Para el caso del primer extracto obtenido a partir de frutos semimaduros de *B. serra* (1.Bs-sm), la cantidad de proteínas recuperadas por gramo de fruto fue de aproximadamente 1,61 mg/ml (Tabla 10: 0, 2 ml de extracto por g de fruto; 321 μ g de proteína por ml), valor similar al obtenido por Caffini *et al.* (1988; 1,59 mg/ml) para un extracto obtenido a partir de frutos semimaduros de *B. serra* triturados en acetona (1,93 g de polvo acetónico por 100 g de frutos; 8,24 mg de proteína por cada 100 g de polvo acetónico).

Por otra parte, se determinó la actividad caseinolítica de los extractos de *B. serra* correspondientes al primer lote (1.Bs) utilizando las condiciones de reacción anteriormente optimizadas para *B. hieronymi* (Bruno *et al.*, 2006). Los valores de actividad fueron más bajos en comparación con los obtenidos para los extractos de frutos de *B. hieronymi*, por lo que los siguientes lotes de extracción fueron preparados utilizando una proporción de fruto por mililitro de buffer cinco veces mayor, con el objetivo de recuperar una cantidad de proteínas más elevada y mayor actividad proteolítica.

Tabla II.10. Concentración proteica, actividad caseinolítica y actividad específica (cociente: actividad caseinolítica/concentración proteica) de los extractos crudos de *B. hieronymi* (a), *B. serra* (b) y *D. urbanianum* (c). Se destacan en negrita los máximos valores de actividad y concentración de proteínas de cada serie de extractos.

Especie vegetal	Órgano vegetal utilizado	Composición (g fruto/ml buffer)	Nombre del extracto	Proteínas ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad caseinolítica (Ucas/ml)	Actividad específica (Ucas/mg)
a. <i>B. hieronymi</i>	Frutos inmaduros	0,2	Bh A	1063 \pm 44	6,1 \pm 0,2	5,7 \pm 0,3
	Frutos inmaduros	0,4	Bh B	2135 \pm 52	10,5 \pm 0,3	4,9 \pm 0,2
	Eje primario	0,2	Bh C	246 \pm 21	0,3 \pm 0,2	1,2 \pm 0,8
	Eje secundario	0,2	Bh D	252 \pm 32	0,1 \pm 0,0	0,4 \pm 0,1
	Frutos maduros	0,2	Bh E	1141 \pm 44	3,9 \pm 0,3	3,4 \pm 0,3
b. <i>B. serra</i>	Frutos inmaduros	0,2	1.Bs-i	304 \pm 16	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 1,2
	Frutos semimaduros	0,2	1.Bs-sm	321 \pm 18	0,4 \pm 0,2	1,2 \pm 0,6
	Frutos maduros	0,2	1.Bs-m	195 \pm 11	0,2 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1
	Frutos inmaduros	1,0	2.Bs-i	552 \pm 38	0,5 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1
	Frutos semimaduros	1,0	2.Bs-sm	496 \pm 20	0,9 \pm 0,0	1,9 \pm 0,0
	Frutos maduros	1,0	2.Bs-m	333 \pm 16	0,2 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1
c. <i>D. urbanianum</i>	Hojas	1,0	Du	329 \pm 35	0,1 \pm 0,0	0,3 \pm 0,3

Con respecto a los valores de actividad de los extractos obtenidos a partir de diferentes partes de los frutos de *B. serra* (3.Bs), mostraron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$, test de Tukey). Como puede observarse en la **Figura II.9**, cuando se prepara el extracto sin las semillas y el epicarpio (piel), la actividad mejora con respecto a los otros extractos, esto puede deberse a la presencia de inhibidores de proteasas que suelen estar contenidos en las semillas (Indarte *et al.*, 2017), las cuales se rompen mecánicamente en la preparación del extracto. Aunque es un hallazgo interesante, si se considera la preparación de extractos proteolíticos a gran escala, este procedimiento no resulta conveniente ya que la eliminación de las semillas conlleva un paso adicional que resulta ser complejo y excesivamente lento en la práctica, incrementando el tiempo de procesamiento, la exposición a la temperatura ambiente y la manipulación de los frutos, que puede generar como consecuencia una disminución en la actividad.

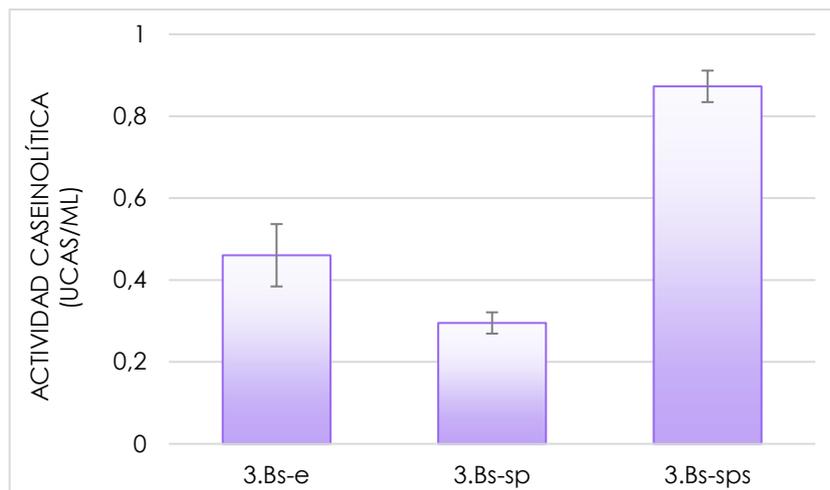


Figura II.9. Comparación de la actividad caseinolítica de los extractos obtenidos a partir de frutos de *B. serra*. **3.Bs-e**: extracto de frutos enteros; **3.Bs-sp**: extracto de frutos sin piel; **3.Bs-sps**: extracto de frutos sin piel ni semillas.

La tercera especie propuesta para la obtención de extractos proteolíticos, *D. urbanianum*, presenta una distribución restringida, habita en ambientes de difícil acceso y su fenología es incierta. Por todos estos factores, la recolección de frutos en el lugar de origen de esta especie no fue posible. Se cultivaron en la ciudad de La Plata ejemplares provenientes del INTA Castelar originarios de la provincia de San Luis y se intentó inducir la floración y fructificación utilizando hormonas vegetales, aunque no se logró alcanzar el objetivo planteado. No obstante, se obtuvo un extracto (Du) a partir de las hojas, el cual presentó una actividad caseinolítica de $0,11 \pm 0,01$ Ucas/ml. Si bien se trata de un extracto con poca actividad proteolítica si se compara con los otros extractos obtenidos en este trabajo de tesis, se encuentra dentro del orden obtenido para un extracto de hojas de *B. serra*, el cual fue preparado bajo las mismas condiciones (Gomez Herrera *et al.*, 2022). Como se observa en la **Figura II.10**, cuando se ensayó dicha actividad durante diferentes períodos de tiempo, se evidenció que existe una relación lineal entre la A_{280} y el tiempo en el rango de 0-20 min, por lo cual se considera que un tiempo comprendido dentro de ese rango sería óptimo para medir la actividad proteolítica de este extracto sobre caseína al 1 %.

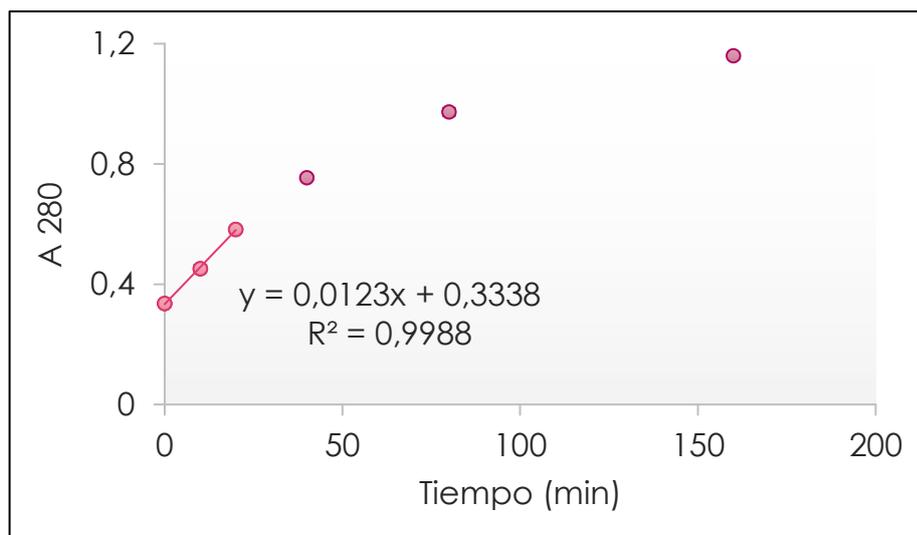


Figura II.10. Actividad caseinolítica del extracto crudo de *D. urbanianum* (Du) en función al tiempo de reacción.

II.3.2.1 Purificación parcial con solventes orgánicos

Como se mencionó anteriormente, la precipitación fraccionada con solventes orgánicos puede ser empleada como purificación preliminar en un primer paso de un esquema de purificación. Este procedimiento se realiza con el objetivo de eliminar compuestos solubles en dichos solventes como son los compuestos fenólicos, azúcares y otros metabolitos que pueden interferir en los pasos siguientes de la purificación. Los extractos de *B. serra* y *D. urbanianum* se precipitaron con volúmenes crecientes de acetona y/o etanol, los precipitados fueron resuspendidos en buffer de extracción (precipitado acetónico redisoluto: PAR y precipitado etanólico redisoluto: PER, respectivamente) y a todos se les determinó la actividad caseinolítica, la cual fue expresada en cada caso como porcentaje de la actividad obtenida para el EC sin tratar (**Figura II.11**). Los resultados permitieron determinar que en el caso de *B. serra*, cuando se precipita el EC con 4 volúmenes de solvente se recupera más del 90 % de actividad con respecto al EC (**Figura II.11 A**), tanto para el PAR como para el PER ($94 \pm 5 \%$ y $92 \pm 2 \%$ de actividad, respectivamente). De igual manera sucede cuando el Du se precipita con la misma cantidad de acetona, recuperándose en el PAR un $91 \pm 4 \%$ de actividad caseinolítica (**Figura II.11 B**). Por lo tanto, se puede considerar que cuatro volúmenes de solvente son suficientes para purificar parcialmente a los extractos crudos mencionados. De igual manera sucede con el EC de *B. hieronymi* para el cual Bruno *et al.* (2002) determinaron que el mejor rendimiento se obtiene cuando el EC es precipitado con cuatro volúmenes de acetona o de etanol (94% y 88% de actividad caseinolítica, respectivamente). Chaurasiya & Hebbar (2013) analizaron diferentes

condiciones para purificar parcialmente la bromelina extraída del corazón del ananá y demostraron que se alcanza un mayor grado de purificación cuando el extracto es precipitado con dos volúmenes de acetona, sin embargo, la actividad enzimática recuperada es menor (45,11 %) que cuando se precipita con cuatro volúmenes de acetona, condición con la cual se recupera la mayor actividad proteolítica (85,97 %). En cuanto a los extractos de *B. serra* y de *B. hieronymi*, estudiada previamente, es importante resaltar que se recupera un alto porcentaje de actividad cuando el EC es precipitado con etanol, lo cual constituye un dato relevante si se proyecta su utilización en la manufactura de productos para la industria alimentaria, debido a que las posibles trazas de dicho solvente retenidas en el extracto no se consideran nocivas para la salud como sí lo son las de acetona.

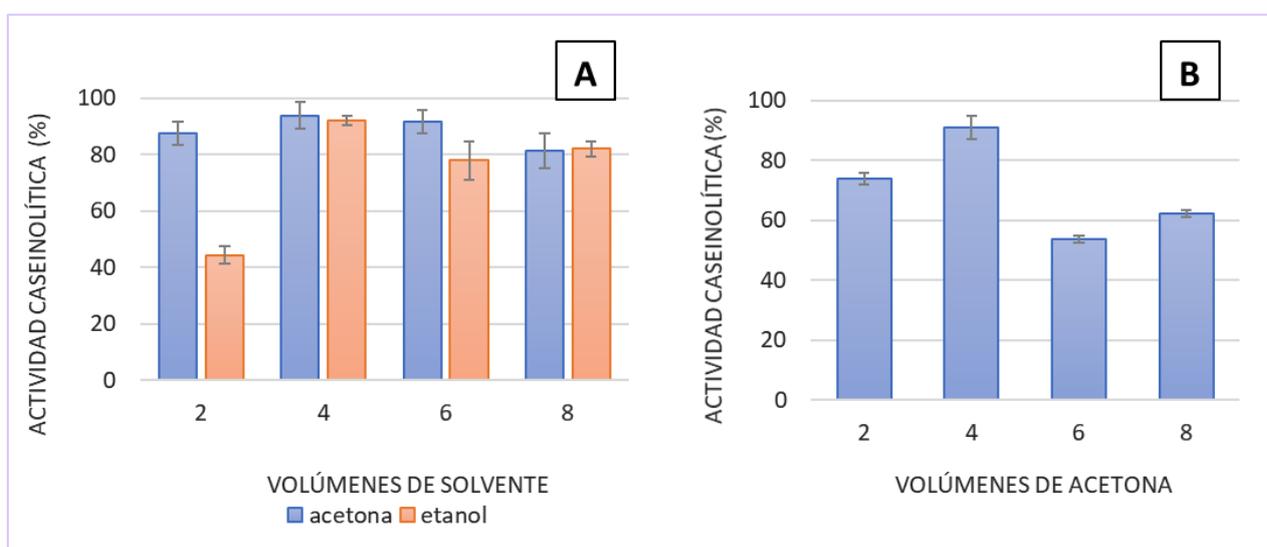


Figura II.11. Porcentaje de actividad caseinolítica de los extractos de *B. serra* (A) y *D. urbanianum* (B) parcialmente purificados con solventes orgánicos, con respecto al extracto crudo sin tratar.

II.3.2.2 Caracterización enzimática de *B. serra*

II.3.2.2.1 Tiempo y temperatura óptima de reacción

En primer lugar, se determinó el rango de tiempo adecuado para medir actividad caseinolítica. Para ello, se graficó el incremento de absorbancia a 280 nm en el tiempo y se buscó la zona lineal, es decir, la región en la cual la liberación de productos es directamente proporcional con el tiempo. En principio, el ensayo se realizó sobre los tres extractos 1.Bs(i, sm y m) a 37 °C, ya que se partió del protocolo empleado para las enzimas de *B. hieronymi*, que muestra su mayor actividad a esta temperatura, considerando la desnaturalización proteica que puede ocurrir durante el ensayo (Bruno, 2007).

Los resultados obtenidos indicaron que los tres extractos muestran una relación lineal en el periodo ensayado ($R^2=0.99$; 0-20 min, **Figura II.12**). Cuando se calculó la actividad caseinolítica, los valores fueron $0,12 \pm 0,01$, $0,15 \pm 0,015$ y $0,12 \pm 0,01$ Ucas/ml para los extractos 1.Bs-i, 1.Bs-sm y 1.Bs-m, respectivamente, siendo valores muy bajos si se los compara con aquellos obtenidos en trabajos previos para otros extractos de frutos de bromelias, los cuales arrojaron valores mayores a 1 Ucas/ml (Bruno *et al.*, 2003; Payrol *et al.*, 2005).

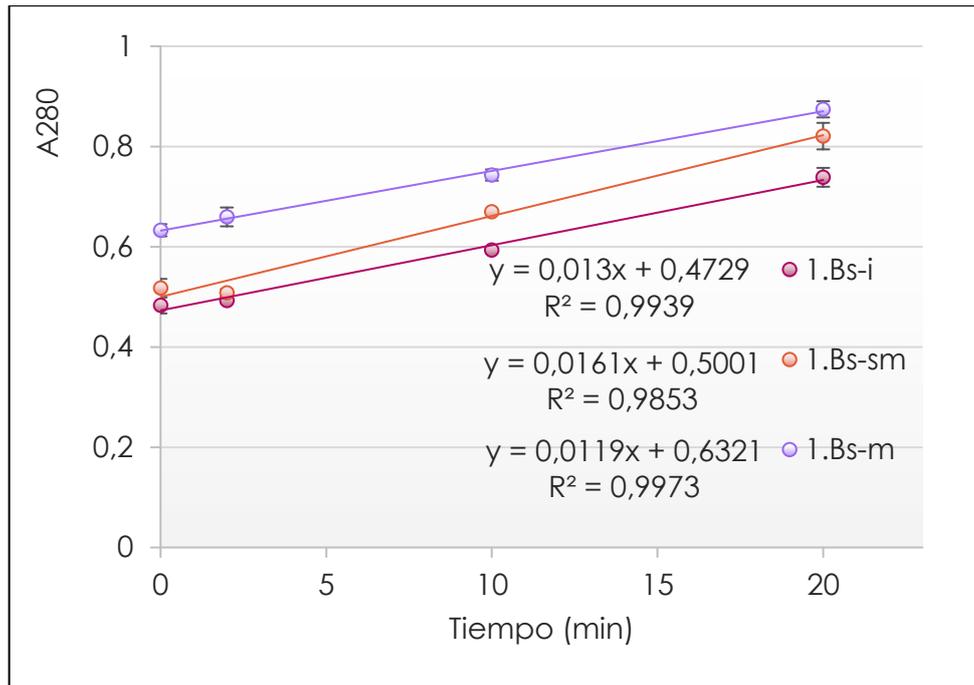


Figura II.12. Actividad caseinolítica (A_{280}) de los 1.Bs (i,mi,m) en función del tiempo de reacción.

Como se mencionó anteriormente, con el objetivo de obtener extractos más activos, se realizó un nuevo lote de extracción, 2.Bs, empleando una relación de frutos por mililitro de buffer de extracción cinco veces mayor que la empleada para el 1.Bs y adicionalmente, se ensayaron dos temperaturas más elevadas, 45 y 55 °C. Finalmente, se seleccionó la temperatura de 45 °C, contrastando con los valores obtenidos en la curva de estabilidad a la temperatura.

El extracto de frutos de maduración intermedia 2.Bs-sm presentó los valores más altos de actividad caseinolítica y actividad específica ($0,952 \pm 0,003$ Ucas/ml y $1,90 \pm 0,01$ Ucas/mg, respectivamente), mientras que el extracto de frutos inmaduros (2.Bs-i) mostró los valores más bajos ($0,480 \pm 0,004$ Ucas/ml and $0,87 \pm 0,06$ Ucas/mg). Estos resultados permitieron seleccionar al 2.Bs-sm para realizar los ensayos posteriores y determinar las condiciones óptimas de trabajo.

Se realizó el ensayo de actividad caseinolítica a 45 °C durante 20 min empleando el 2.Bs-sm y se graficó la absorbancia a 280 nm con respecto al tiempo de reacción, para verificar nuevamente la región lineal luego de los cambios realizados. En la **Figura II.13** se puede observar que se confirma la relación lineal sólo a partir de los tiempos de hidrólisis mayores a 2,5 min, ya que entre 0 y 2,5 min se observa una pendiente cercana a cero.

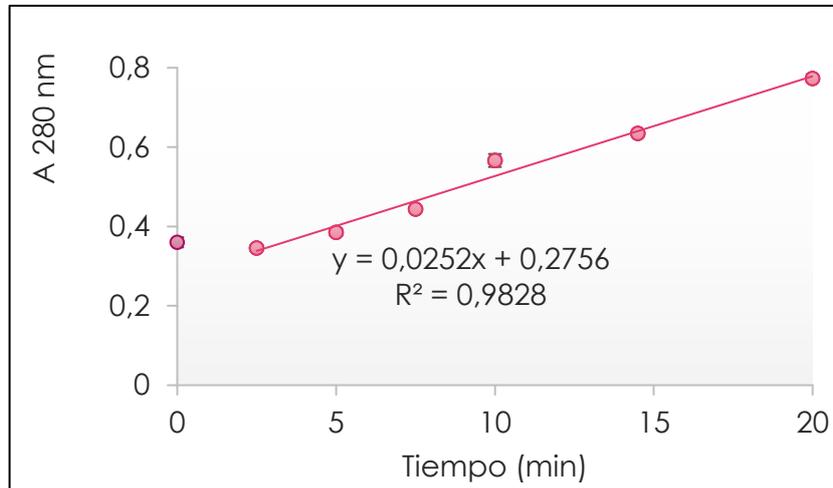


Figura II.13. Actividad caseinolítica del 2.Bs-m en función del tiempo de reacción.

Por otra parte, cuando la actividad caseinolítica del 5.Bs fue ensayada en un incubador a 45 °C con agitación orbital constante a 150 rpm durante períodos de tiempo comprendidos entre 0-180 min, se pudo observar que la porción lineal de la curva se extiende desde 0 hasta 60 min, promoviendo la desaparición de la región de pendiente cero (**Figura II.14**). Es posible que la agitación de la mezcla haya mejorado la reacción, visiblemente en los periodos de tiempo más cortos, probablemente debido a la mayor interacción entre las enzimas y el sustrato al comienzo de la hidrólisis.

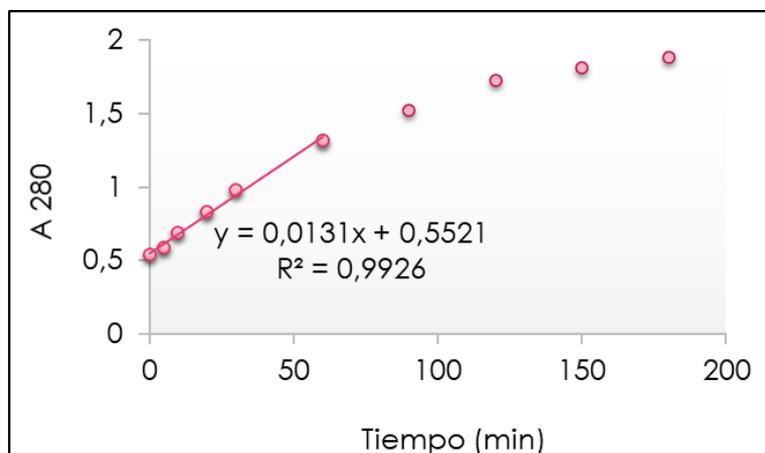


Figura II.14. Actividad caseinolítica del 5.Bs en función del tiempo de reacción.

II.3.2.2.2 Estabilidad térmica

El ensayo de estabilidad térmica (**Figura II.15 A**) mostró que no hubo pérdida de actividad enzimática cuando el EC fue pre-incubado a 23 °C por 120 min y retuvo alrededor del 95 % cuando fue calentado a 37 °C por 90 min. Además, el EC mantuvo un 80 % de actividad cuando fue pre-incubado a 45 °C por 60 min y alrededor del 50 % cuando fue calentado a 65 °C por 10 min. Finalmente, las enzimas fueron completamente inactivadas cuando el EC fue calentado a 65 °C por 60 min y a 75 °C por 10 min, posiblemente debido al efecto de la desnaturalización proteica. Por lo tanto, las proteasas de *B. serra* retienen una actividad considerable cuando el EC es expuesto a temperaturas hasta los 55 °C, que cae rápidamente cuando se exponen a 65 y 75 °C, como sucede con las peptidasas de *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms, *B. hieronymi* y *B. pinguin* L. (Natalucci *et al.*, 1995; Bruno *et al.*, 2003; Vallés *et al.*, 2007). Por otra parte, se determinó que las enzimas de *B. serra* son completamente inactivadas luego de 5 min a 100 °C (**Figura II.15 B**), pudiendo utilizarse un tratamiento de shock térmico en estas condiciones para la detención de reacciones de hidrólisis que involucren estas peptidasas.

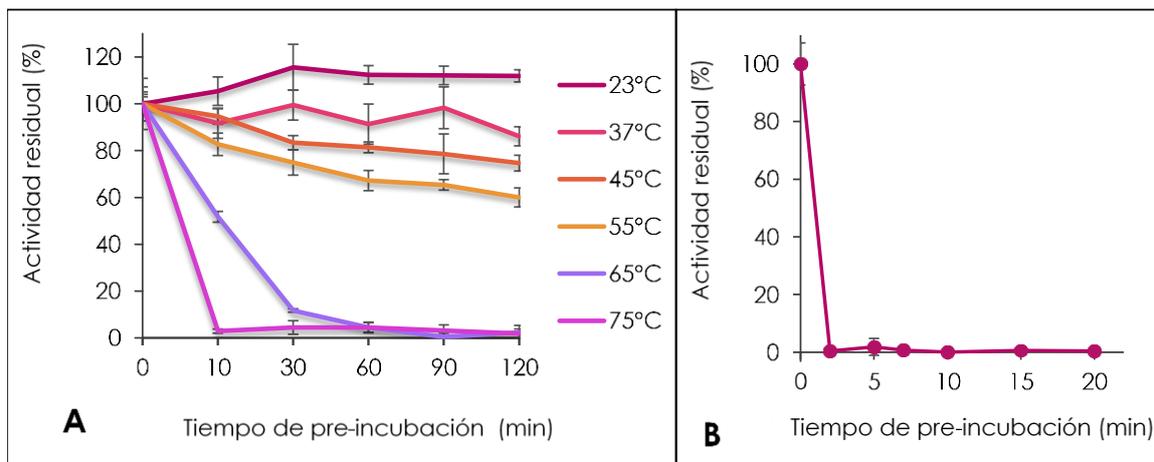


Figura II.15. Actividad caseinolítica del EC pre-incubado a diferentes temperaturas entre 23-75 °C (A) y pre-incubado a 100 °C (B).

II.3.2.2.3 Perfil de pH óptimo

Como se muestra en la **Figura I.16**, el EC exhibió una actividad caseinolítica mayor al 80 % en el rango de pH entre 6,3-9,0, presentando un valor máximo (100 % de actividad) a pH 6,3. En trabajos previos (Bruno *et al.*, 2002) se demostró que las proteasas de *B. hieronymi* presentan por encima del 80 % de actividad en un rango de pH levemente más alcalino (7,3-10,7) y su actividad máxima a pH 8,6. En el caso de las peptidasas de *B. pinguin*, éstas retienen el 80 % de su actividad en un rango de pH más estrecho (7,2-8,8) (Payrol *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos para las peptidasas de *B. serra* permitieron revisar y ajustar el pH para determinar la actividad enzimática y seleccionar un nuevo buffer de extracción con un pH más alejado del valor de pH óptimo, lo que permite una reducción de la autoproteólisis.

Considerando el valor de pH óptimo al cual actúan estas peptidasas, se puede pensar en el empleo de las mismas en procesos industriales tales como el cuajado de la leche para la producción de quesos y la preparación de hidrolizados de proteínas de lactosuero, debido a que el pH de la leche se encuentra en un rango de 6,4-6,8 y no sería necesario ajustarlo al valor de pH óptimo de estas enzimas, hecho que podría incrementar los costos de producción. En este sentido, Bruno *et al.* (2010) emplearon peptidasas de *B. hieronymi* como agente coagulante y prepararon quesos a escala de laboratorio, además de obtener hidrolizados de proteínas de lactosuero. Uno de los objetivos del presente trabajo de tesis es la obtención de hidrolizados de proteínas alimentarias, entre ellas de leche bovina, el cual se desarrolla en el **Capítulo III**.

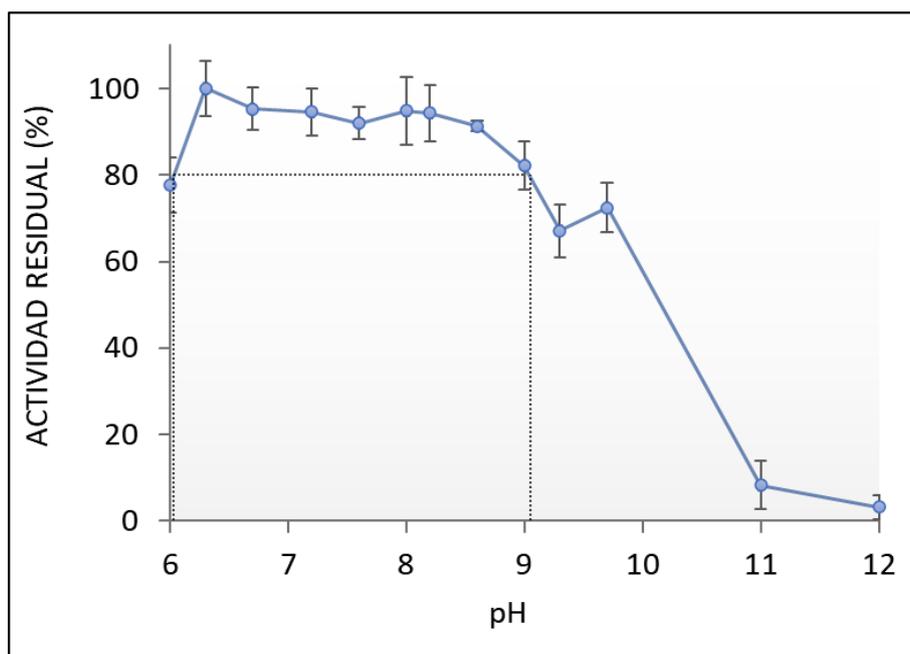


Figura II.16. Actividad caseinolítica (%) de las enzimas de *B. serra* en función del pH.

II.3.2.2.4 Identificación del tipo de sitio catalítico: actividad caseinolítica en presencia de inhibidores de grupo.

Para definir el tipo catalítico de las peptidasas de *B. serra*, el EC fue tratado con diferentes tipos de inhibidores de proteasas. El único pre-tratamiento que mostró una diferencia significativa en los valores de actividad ($p < 0,05$) comparado con el control (sin inhibidor) fue el que se realizó con inhibidor de proteasas cisteínicas (AIA), recuperándose sólo un 16 % de actividad residual

(Figura II.17 A). Cuando se trató al EC con los otros inhibidores (Figura II.17 A y B), no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) en su actividad comparado con el control. Por lo tanto, se considera que el tipo catalítico de las proteasas de *B. serra* es cisteínico. Resultados similares fueron reportados para proteasas de especies de la misma familia, tales como *P. macrodontes* (Natalucci *et al.*, 1995), *B. balansae* Mez (Pardo *et al.*, 2000) y *B. pinguin* (Payrol *et al.*, 2005; Moreno-Hernandez *et al.*, 2017), entre otras, las cuales también poseen peptidasas cisteínicas. Además, otra especie de la misma familia que ha sido ampliamente estudiada, *A. comosus*, contiene al menos cuatro peptidasas cisteínicas (Hale *et al.*, 2005).

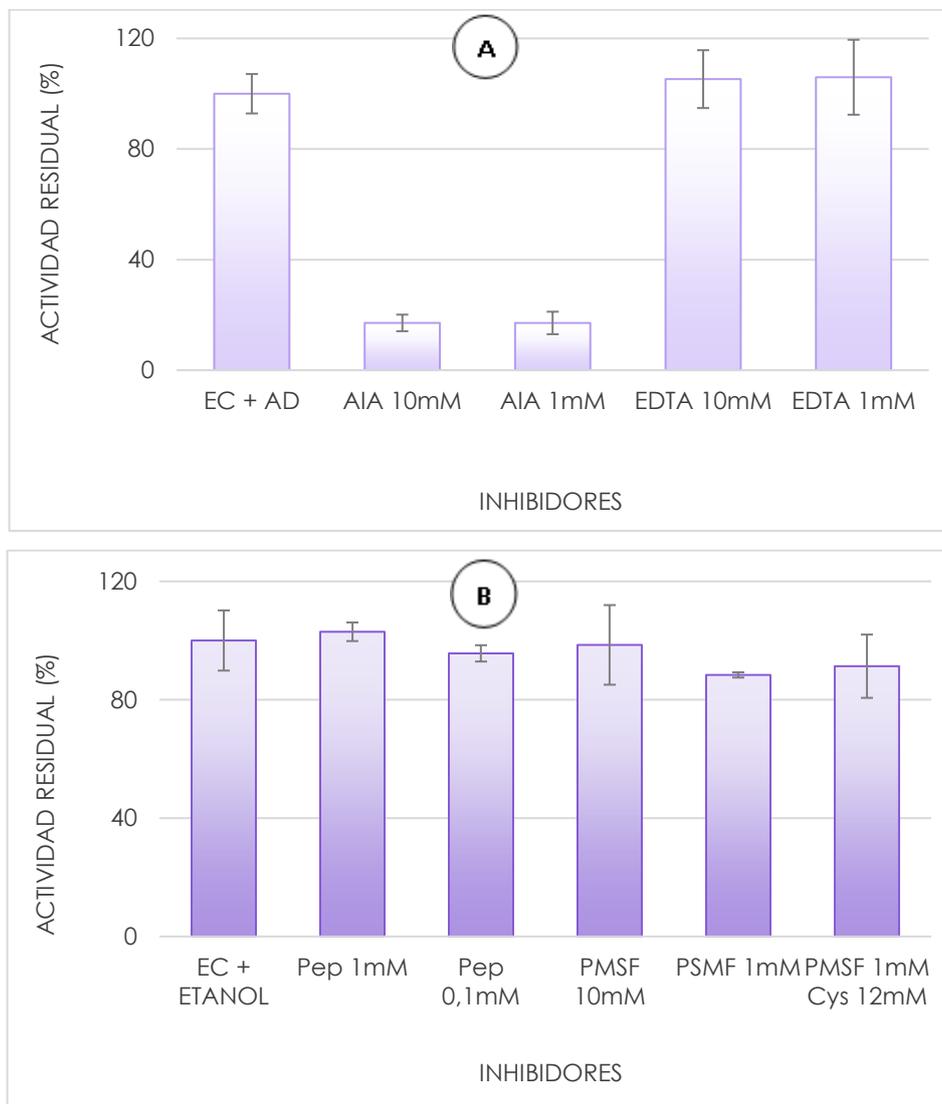


Figura II.17. Actividad del EC de *B. serra* en presencia de inhibidores de proteasas. **A:** Inhibidores solubilizados en AD. **B:** Inhibidores solubilizados en etanol.

II.3.2.2.5 Concentración de cisteína

Como puede observarse en la **Figura II.18**, la adición de cisteína aumenta la actividad de las proteasas de *B. serra*. Los resultados obtenidos muestran que la concentración mínima ensayada (5 mM) es suficiente para incrementar la catálisis en un 46 %. Las concentraciones mayores de cisteína (10-50 mM) no producen un aumento de actividad significativo ($p > 0,05$). Por lo tanto, se considera que la mínima adición de cisteína (5 mM) es adecuada para realizar el ensayo de actividad caseinolítica. Estos resultados contrastan con los obtenidos para un extracto de *B. pinguin* (Payrol *et al.*, 2005), el cual incrementa su actividad con una concentración de cisteína cuatro veces mayor. Por otra parte, un aumento en la actividad similar (34 %) fue obtenido para las proteasas de *B. hieronymi* (Bruno *et al.*, 2002), aunque para ello requiere una concentración más alta de cisteína (15 mM).

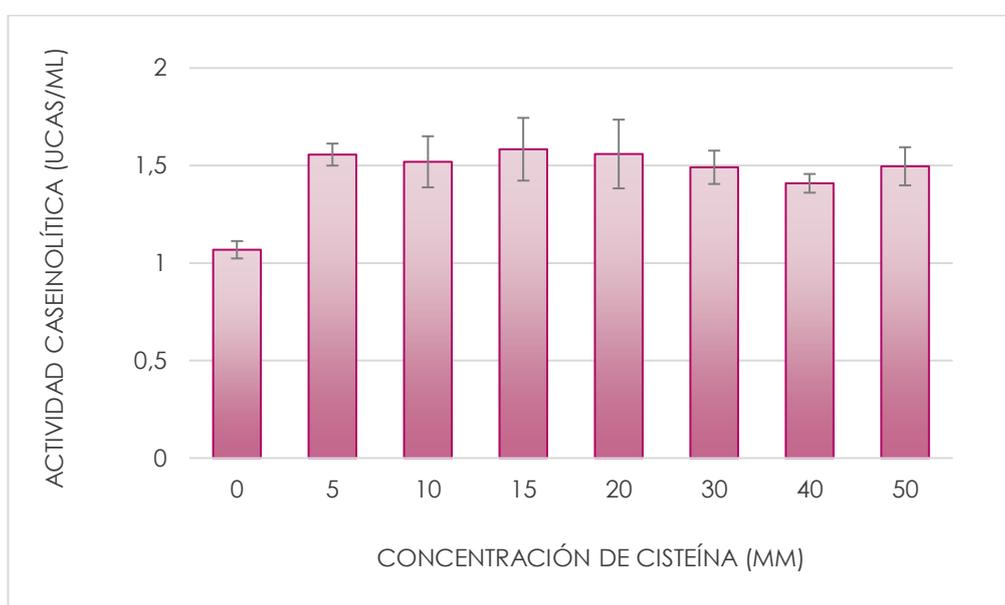


Figura I.18. Actividad del EC de *B. serra* en presencia de diferentes concentraciones de cisteína.

II.3.2.3 Actividad enzimática sobre sustratos sintéticos

Con respecto a la actividad esterásica sobre ésteres de L-aminoácidos del N- α -carbобензоxi-p-nitrofenilo, en la **Figura II.19** se puede observar que para las enzimas de *B. serra* la actividad más alta (100 %) fue encontrada sobre el derivado de Ala, mostrando una pendiente de $0,00531 \pm 0,00004$ UA₄₀₅/s, seguido por los derivados de Gln (71 %), Tyr (66 %), Phe (54 %) y Gly (53 %). En concordancia con estos resultados, estudios previos llevados a cabo con proteasas de *B. hieronymi* (Bruno, 2007) también mostraron preferencia sobre el derivado de Ala (100 %), seguido por Gln y Gly (59 y 52 %, respectivamente).

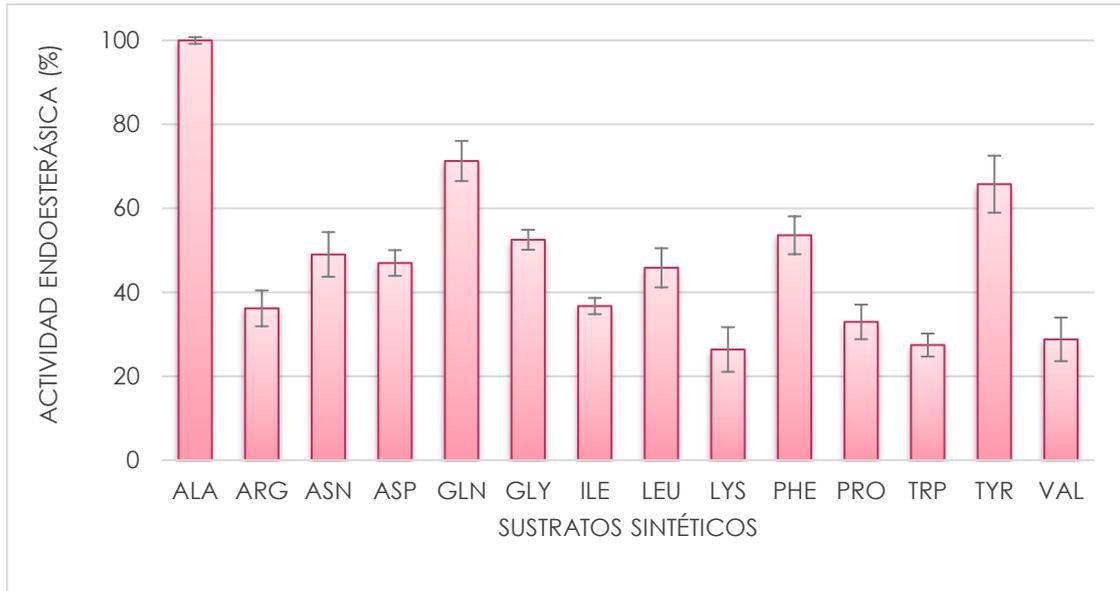


Figura II.19. Actividad de las proteasas de *B. serra* frente a sustratos N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de L-aminoácidos.

Por otra parte, se estudió la actividad de las enzimas presentes en las hojas de *D. urbanianum* sobre los mismos sustratos sintéticos. A diferencia de las otras especies mencionadas, que muestran mayor preferencia por Ala, las enzimas presentes en Du presentaron la mayor actividad (100 %) frente al derivado de Gln (**Figura II.20**) y le siguen en orden de preferencia los derivados de Gly y Asp (71 y 50 %, respectivamente).

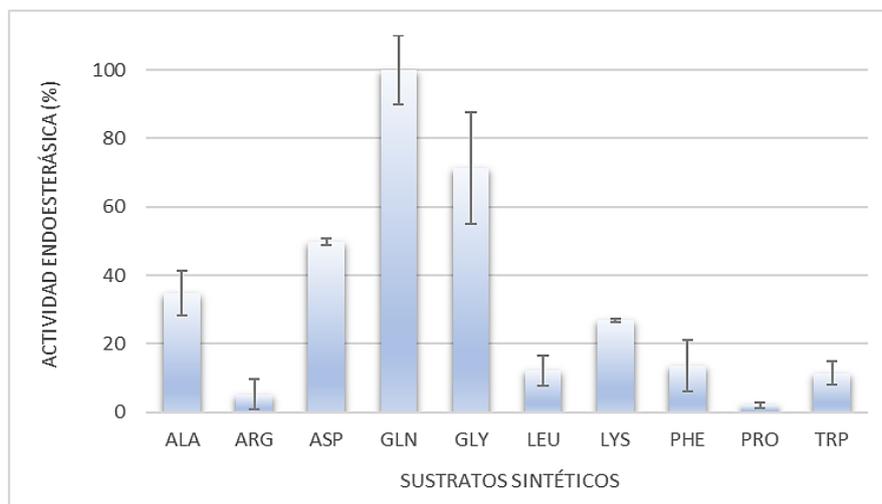


Figura II.20. Actividad de las proteasas de *D. urbanianum* frente a sustratos N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de L-aminoácidos.

II.3.3 Determinación de las masas moleculares por SDS-PAGE

Se realizaron electroforesis en condiciones desnaturalizantes para determinar los pesos moleculares de las proteínas presentes en los extractos de *B. hieronymi*, *B. serra* y *D. urbanianum*.

Tanto los extractos de *B. hieronymi* como los de *B. serra*, presentan una banda mayoritaria correspondiente a valores de masas moleculares de alrededor de 27-28 kDa (**Figuras II.21 y II.22**). En algunos casos se puede observar una banda difusa menor a 14 kDa, que podría corresponder a fragmentos proteicos producto de la autoproteólisis. En ciertas ocasiones, los extractos de *B. serra*, muestran la presencia de una segunda banda de aproximadamente 33 kDa (**Figura II.22**).

Las bandas mayoritarias que se observan en los geles corresponden a valores de masas moleculares que coinciden con lo reportado en bibliografía para las peptidasas cisteínicas tipo papaína, las cuales presentan pesos en el rango de 25-35 kDa (Novinec & Lenarčič, 2013).

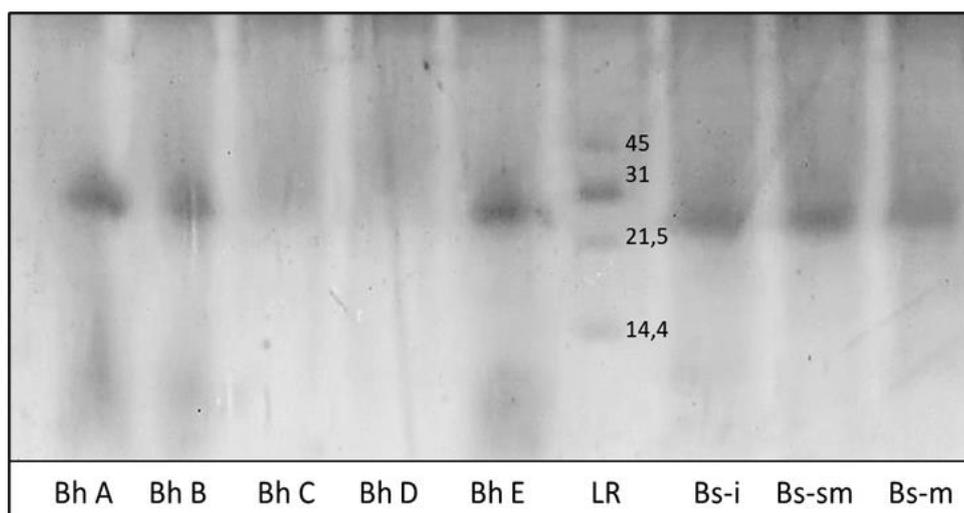


Figura II.21. Geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Extractos de frutos y ejes de *B. hieronymi* (Bh A, Bh B, Bh C, Bh D), extractos de frutos de *B. serra* (1.Bs-i, 1.Bs-sm y 1.Bs-m) y patrones de peso molecular de bajo rango (LR).

Con el objetivo de evitar la autoproteólisis y mejorar la definición de los geles de electroforesis, los extractos crudos Du y 5.Bs fueron pre-tratados con un inhibidor de proteasas cisteínicas (AIA). Como se puede observar en la **Figura II.22**, el agregado del inhibidor mejora la definición de las bandas > 31 kDa y disminuye la intensidad del chorreado, corroborando que efectivamente está relacionado con la autoproteólisis que ocurre durante la manipulación de la muestra. Con respecto al extracto Du, el pre-tratamiento con inhibidor de proteasas permitió visualizar una banda poco definida de alrededor de 40 kDa.

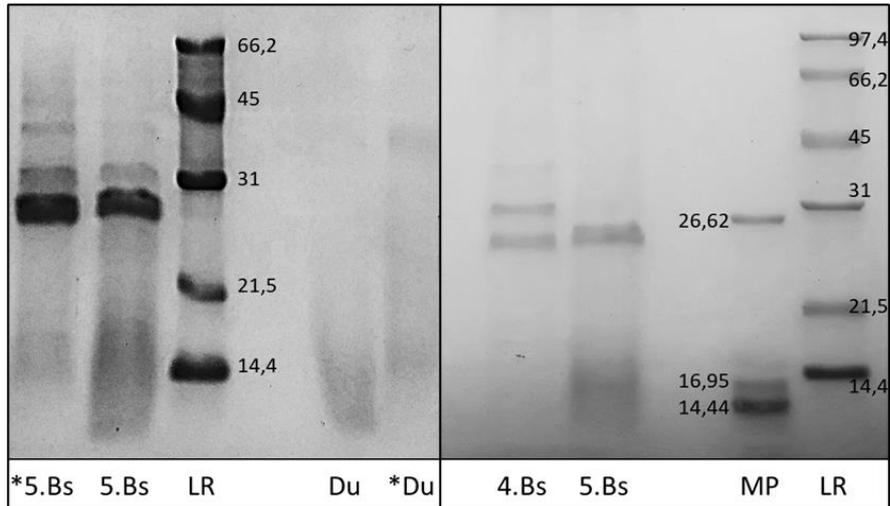


Figura II.22. Geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Extractos de frutos de *B. serra* (4.Bs y 5.Bs), extracto de hojas de *D. uribianum* (Du), patrones de peso molecular multipéptidico (MP), patrones de peso molecular de bajo rango (LR). Los asteriscos (*) indican pre-tratamiento de las muestras con AIA (inhibidor de proteasas cisteínicas).

II.3.4 Determinación de los puntos isoeléctricos por IEF-zimograma

Mediante IEF se confirmó el perfil de bandas proteicas de los extractos de *B. hieronymi* obtenido anteriormente en nuestro laboratorio (**Figura II.23**), y para el resto de los extractos el perfil de puntos isoeléctricos fue determinado.

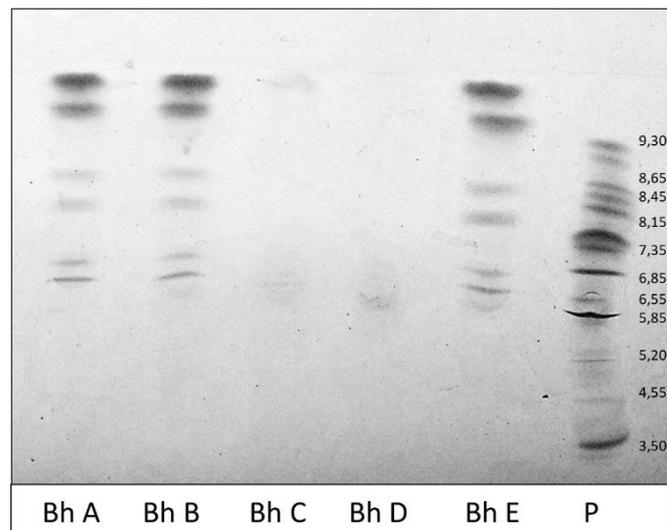


Figura II.23. Imagen del gel de IEF de los extractos de *B. hieronymi* obtenidos a partir de frutos inmaduros con 0,2 mg de fruto por ml de buffer (Bh A), con 0,4 mg/ml (Bh B), a partir de ejes primarios y secundarios de la infrutescencia (Bh C y Bh D, respectivamente) y a partir de frutos maduros (Bh E). P: Patrones de punto isoeléctrico.

Los extractos Bh A, Bh B y Bh E, mostraron el mismo patrón proteico de seis bandas mayoritarias determinado por Bruno *et al.* (2002). Se estimaron los valores de pI, observándose dos bandas de pI mayor a 9,3 y las restantes con valores aproximados de 8,2, 7,7, 6,6 y 6,3. En la **Tabla II.11** se comparan los resultados obtenidos previamente y los determinados en el presente trabajo. Si bien hay pequeñas diferencias en los valores de pI obtenidos, se pueden diferenciar las tres categorías mencionadas por dicha autora, el grupo I de proteasas alcalinas (pI > 9,3), el grupo II de pI intermedio (8,2 y 7,7) y el grupo III de proteasas ácidas (6,6 y 6,3). Con respecto al extracto BhE, aunque fue preparado a partir de frutos con mayor grado de madurez, presentó el mismo patrón de bandas que el extracto de frutos inmaduros, a diferencia de lo obtenido para los extractos de *B. serra*, los cuales mostraron diferencias entre sí. El patrón de bandas de extractos obtenidos a partir de los ejes de la infrutescencia de *B. hieronymi* no pudo ser identificado, probablemente debido a la baja concentración proteica.

Tabla II.11. Comparación de los pIs de las proteínas de *B. hieronymi* obtenidos en este trabajo y en la publicación previa de Bruno, 2007.

Bruno, 2007	Este trabajo
2 bandas > 9,3	2 bandas > 9,3
8,3	8,2
7,6	7,7
6,4	6,6
5,9	6,3

En los diferentes extractos de *B. serra*, se pudieron apreciar al menos siete bandas proteicas mayoritarias. En la **Figura II.24 C** se observan dos bandas alcalinas a la altura de las lectinas (pI 8,45-8,65), que en ocasiones se visualizan a valores de pI inferiores a 8,15 y en una única banda (**Figura II.24 A y II.24 B**), siendo la fracción de pI alcalino la más activa al zimograma. En todos los IEF se visualizó una banda inactiva de pI 6,0-6,5 situada en el centro del punto de siembra y, de manera variable, se observaron 4 bandas ácidas, dos de pI 5 y 5,2 (**Figura II.24 B**), una de pI cercano a 4,5 y otra de pI < 3,5, las cuales también mostraron digestión del gel del zimograma, aunque de menor intensidad que las bandas alcalinas.

Se observaron algunas variaciones en el patrón de bandas de los extractos de diferente grado de madurez (**Figura II.24 A**) en relación al ancho de las mismas (cantidad de proteína) y en

cuanto a la presencia o no en todos los geles de ciertas bandas. Por ejemplo, la banda más ácida no está presente o es muy tenue en el extracto de frutos de mayor madurez. La presencia o ausencia de ciertas bandas, ya sea por la diferencia en el grado de madurez de los frutos, en los diferentes lotes de extracción o incluso en los mismos extractos utilizados en diferentes momentos, podría deberse a la presencia de isoformas. Existen numerosas investigaciones que mencionan la presencia de peptidasas con isoformas, como por ejemplo las proteasas cisteínicas extraídas a partir de látex de *C. papaya*, *Calotropis gigantea* (L.) W.T.Aiton, y *Ficus carica* L. (Azarkan *et al.*, 2011). Por su parte, la ficina, obtenida a partir del látex de *F. carica* presenta al menos cinco isoformas con diferentes pIs, las cuales pueden ser separadas mediante cromatografía de intercambio iónico, y al SDS-PAGE presentan masas moleculares entre 22-30 kDa debido a diferencias en la movilidad de las isoformas (Milošević *et al.*, 2019). Debido que varias peptidasas tipo papaína presentan este comportamiento, se podría sugerir que proteasas de *B. serra* podrían presentar un patrón de isoformas, sin embargo, resulta indispensable ampliar los estudios para comprender este caso en particular.

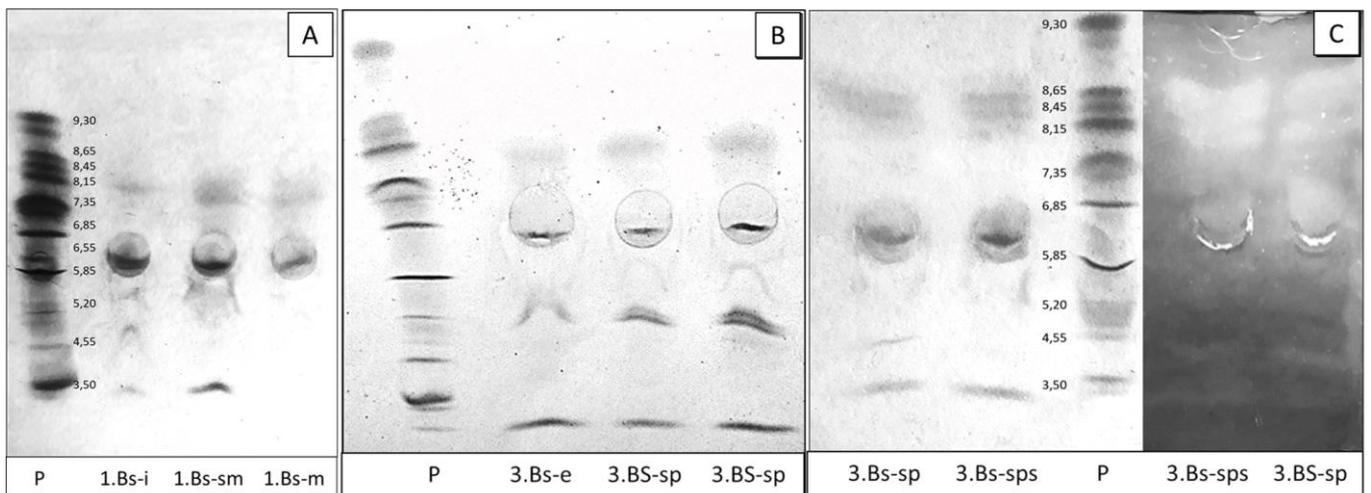


Figura II.24. Imágenes de los geles de IEF y zimograma de extractos de *B. serra*. **A:** IEF de los extractos 1.Bs, obtenidos a partir de frutos inmaduros (1.Bs-i), semimaduros (1.Bs-sm) y maduros (1.Bs-m). **B:** IEF de los extractos 3.Bs de *B. serra*, obtenidos a partir de frutos completos (3.Bs-e), frutos sin piel (3.Bs-sp) y frutos sin piel ni semilla (3.Bs-sps). **C:** IEF y zimograma de los extractos 3.Bs-sp y 3. Bs-sps. En todas las figuras la línea “P” corresponde a los patrones de pI.

El desarrollo de la técnica de IEF presentó dificultades en los casos de los PAR y PER de *B. serra* ya que los extractos obtenidos a partir de los frutos de esta especie, a diferencia de *B. hieronymi*, presentan una matriz densa, probablemente debido a la presencia de pectinas (Cui *et al.*, 2021). Este hecho fue inconveniente para la suspensión de los precipitados y eventualmente para el desarrollo de la corrida en los geles de IEF.

En cuanto al extracto obtenido a partir de las hojas de *D. urbanianum* (Du), se pudo identificar una banda de pI 8,3 que mostró actividad en el zimograma, y una banda de pI cercano a 5,5 que aparece entrecortada (**Figura II.25**), posiblemente debido a la presencia de agregados proteicos en la superficie del gel en el punto de siembra, hecho que habitualmente es observado en esta técnica. De manera similar Gomez-Herrera *et al.* (2022) identificaron en un EC de hojas de *B. serra* al menos tres fracciones proteicas, una de pI entre 4,5-5,20, una banda de pI cercano a 5,85 y una tercera fracción de pI entre 7,35-8,15.

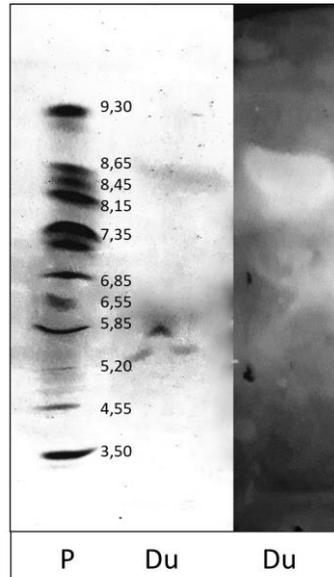


Figura II.25. Imágen del gel de IEF y zimograma del extracto de hojas de *D. urbanianum* (Du). La línea "P" corresponde a los patrones de pI.

II.4 Conclusiones

En el desarrollo de este capítulo se obtuvieron diferentes extractos con actividad proteolítica a partir de frutos, ejes y hojas de tres especies de bromelias nativas de Argentina.

En base a los resultados, se descartó la posibilidad de aprovechar los ejes de las infrutescencias como fuente de peptidasas ya que los valores de actividad obtenidos fueron demasiado bajos con respecto a los valores que frecuentemente presentan los extractos de frutos, y por lo tanto se considera limitada su utilización. Un hecho similar fue reportado por Ketnawa *et al.* (2012) quienes estudiaron diferentes desechos resultantes de la utilización del ananá (*A. comosus*), recuperando el valor más bajo de actividad también en las muestras provenientes del tallo.

Los extractos de *B. serra* y de *D. urbanianum* seleccionados fueron preparados en una concentración cinco veces mayor que la utilizada para los extractos de *B. hieronymi*, previamente estudiados, debido a la presencia de menores valores de actividad enzimática. Mientras que los extractos de fruto de *B. hieronymi* presentaron entre 6-10 Ucas/ml, los extractos de fruto de *B. serra* y el de hojas de *D. urbanianum* mostraron alrededor de 1 y 0,1 Ucas/ml, respectivamente. Si bien este último fue parcialmente caracterizado, fue descartado para este trabajo de tesis como agente proteolítico para la obtención de hidrolizados de proteínas alimentarias debido a la escasa actividad que presenta.

En concordancia con lo reportado previamente para los extractos de frutos de *B. hieronymi*, la precipitación con cuatro volúmenes de acetona y/o etanol resultó ser un buen método para purificar parcialmente los extractos crudos, recuperándose por encima del 90 % de actividad caseinolítica para todos los extractos de las tres especies en estudio.

Como continuación de la investigación iniciada por Caffini *et al.* (1988), se estudió el sistema proteolítico de los frutos de *B. serra*. Se mejoró el método de extracción previo (polvo acetónico), reemplazándolo por un extracto preparado en buffer acuoso, totalmente libre de trazas acetónicas potencialmente tóxicas, considerando un posible uso de esta preparación en la industria alimentaria. La cantidad de proteína recuperada por gramo de fruto fue del mismo orden que la reportada en el trabajo previo. El rendimiento en actividad no pudo ser comparado de manera directa ya que el valor de actividad caseinolítica del trabajo previo no fue reportado, aunque se estima a partir de los valores de absorbancia relativos a la actividad proteolítica de los perfiles cromatográficos que la actividad del extracto actual es significativamente superior. Por

otra parte, se pudo corroborar que el pH óptimo de actividad es entre 6 y 8 (> 90 %), que las enzimas presentan alta estabilidad térmica (> 80 % de actividad residual) hasta temperaturas alrededor de los 45 °C durante 90 min y, que la actividad caseinolítica aumenta al elevar la temperatura de reacción de 45 a 55 °C.

La caracterización del sistema proteolítico de *B. serra* permitió determinar que sus peptidasas presentan un mecanismo catalítico cisteínico, al igual que las proteasas de *B. hieronymi* anteriormente estudiadas en nuestro laboratorio. Mediante electroforesis desnaturizante se identificaron dos bandas proteicas mayoritarias, correspondientes de valores de masas moleculares de alrededor de 27 y 33 kDa, los cuales se encuentran en el rango esperado para peptidasas cisteínicas (Novinec & Lenarčič, 2013). Se determinaron, por primera vez, los puntos isoeléctricos de las proteínas de *B. serra*, identificándose dos proteínas de pI básico (8,3 y 8,5), una de pI intermedio (pI 6-6,5) y cuatro de carácter ácido (pI 5,0, 5,2, 4,5 y <3,5). Las proteínas de pI básico y ácido mostraron actividad proteolítica, mientras que la de pI intermedio resultó inactiva. También se demostró que el sistema proteolítico de *B. serra* presenta estabilidad térmica a 23, 37 y 45 °C durante 120 min (>80 %AE) y que su pH óptimo se encuentra en el rango de 6-9.

Por otra parte, se estudiaron las proteasas presentes en las hojas de *D. urbanianum*, identificándose proteínas de alrededor de 40 kDa, valor de masa molecular superior a los obtenidos para los extractos de frutos y ejes de las otras especies investigadas en este trabajo de tesis. A diferencia de lo que ocurre con *B. serra* y *B. hieronymi*, sólo se identificaron dos bandas proteicas en el isoelectroenfoco, una banda ácida de pI 5,5 y otra alcalina de pI 8,3, la cual demostró ser proteolíticamente activa. Si bien los extractos de *D. urbanianum* no resultaron tan activos como otros de la misma familia botánica, estos datos constituyen un importante aporte con respecto al estudio de nuevas fuentes de peptidasas vegetales, ya que su sistema proteolítico no había sido caracterizado previamente.

II.5 Bibliografía

Anton, A. M. & Zuloaga, F. O. (directores), Flora Argentina. <<http://www.floraargentina.edu.ar>>

Arenas, P. (2004). Las bromeliáceas en la vida de los nativos del Gran Chaco. In *Memorias del II Congreso Argentino de Orquidología y Conservación. I Jornadas Argentinas sobre Bromeliáceas* (Vol. 23, p. 25).

Arenas, P. (Ed.). (2012). *Etnobotánica en zonas áridas y semiáridas del Cono Sur de Sudamérica* (pp. 11-43). Buenos Aires: CEFYBO-CONICET.

Arroyo, M., Acebal, C., & De la Mata, I. (2014). Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*, 190(768), a156-a156.

Ashaolu, T. J. (2020). Applications of soy protein hydrolysates in the emerging functional foods: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(2), 421-428.

Azarkan, M., Matagne, A., Wattiez, R., Bolle, L., Vandenameele, J., & Baeyens-Volant, D. (2011). Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso)forms from *Ficus carica* latex. *Phytochemistry*, 72(14-15), 1718-1731.

Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143.

Barfuss, M. H., Samuel, R., Till, W., & Stuessy, T. F. (2005). Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany*, 92(2), 337-351.

Bertucci, J. I. (2012). *Búsqueda de péptidos bioactivos en hidrolizados de lactosuero bovino obtenidos empleando fitopeptidasas* (Tesis de grado, Universidad Nacional de La Plata).

Bertucci, J. I., Saelse, L., Liggieri, C. S., Garrote, G., & Bruno, M. A. (2023). Preparation of whey protein hydrolysates with ACE-inhibitory activity using cysteine peptidases from *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *International Journal of Dairy Technology*. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12943>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Bruno, M. A. (2007). *Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae)*. (Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata).

Bruno, M. A., Lazza, C. M., Errasti, M. E., López, L. M., Caffini, N. O., & 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.

Bruno, M. A., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & Lopez, L. M. (2002). Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21(1), 51-56.

Bruno, M. A., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & López, L. M. (2003). Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Journal of protein chemistry*, 22(2), 127-134.

Bruno, M. A., Trejo, S. A., Avilés, F. X., Caffini, N. O., & López, L. M. I. (2011). Cloning, sequencing, and identification using proteomic tools of a protease from *Bromelia hieronymi* mez. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165(2), 583-593.

Bruno, M. A., Trejo, S. A., Aviles, X. F., Caffini, N. O., & Lopez, L. M. (2006). Isolation and characterization of hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *The Protein Journal*, 25(3), 224-231.

Bruno, M. A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., & 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), 426-433.

Cabido, M., Giorgis, M., & Tourn, M. (2010). Guía para una excursión botánica en las Sierras de Córdoba. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 45(1-2), 209-219.

Caffini, N. O., Natalucci, C. L., Priolo, N. S., & Buttazoni, M. S. (1988). Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrónica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb. *Acta farmacéutica bonaerense*, 7, 9-14.

Chaurasiya, R. S., & Hebbar, H. U. (2013). Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. *Separation and Purification Technology*, 111, 90-97.

Cui, J., Zhao, C., Feng, L., Han, Y., Du, H., Xiao, H., & Zheng, J. (2021). Pectins from fruits: Relationships between extraction methods, structural characteristics, and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 39-54.

Daoust, R. (1965). Histochemical localization of enzyme activities by substrate film methods: ribonucleases, deoxyribonucleases, proteases, amylase, and hyaluronidase. *International Review of Cytology*, 18, 191-221.

Daoust, R. (1968). The localization of enzyme activities by substrate film methods—evaluation and perspectives. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 16(8), 540-545.

Figuroa, M. E., & Giménez, A. M. (2015). Consideraciones ecológicas sobre una población de *Lycium athium* (Solanaceae) y ampliación de su área de distribución. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 50(1), 79-91.hic

Fratello, B. (1968). Enhanced interpretation of tissue protease activity by use of photographic color film as a substrate. *Stain Technology*, 43(3), 125-128.

Gitaí, J., Horres, R., & Benko-Iseppon, A. M. (2005). Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 253, 65-80.

Gitaí, J., Paule, J., Zizka, G., Schulte, K., & Benko-Iseppon, A. M. (2014). Chromosome numbers and DNA content in Bromeliaceae: additional data and critical review. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 176(3), 349-368.

Givnish, T. J., Barfuss, M. H., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., ... & Sytsma, K. J. (2011). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American journal of botany*, 98(5), 872-895.

Gómez Herrera, M. D., Luaces, P. A., Liggieri, C., Bruno, M., & Avanza, M. V. (2022). Proteolytic characterization of a novel enzymatic extract from *Bromelia serra* leaves. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94.

Good, N. E., & Izawa, S. (1972). [3] Hydrogen ion buffers. In *Methods in enzymology* (Vol. 24, pp. 53-68). Academic Press.

Hale, L. P., Greer, P. K., Trinh, C. T., & James, C. L. (2005). Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *International immunopharmacology*, 5(4), 783-793.

Indarte, M., Lazza, C. M., Assis, D., Caffini, N. O., Juliano, M. A., Avilés, F. X., ... & Trejo, S. A. (2017). A Bowman–Birk protease inhibitor purified, cloned, sequenced and characterized from the seeds of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Planta*, 245, 343-353.

Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and bioproducts processing*, 90(3), 385-391.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

López, L. M., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D., & Caffini, N. O. (2000). Purification and characterization of macrodontan I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expression and purification*, 18(2), 133-140.

Milošević, J., Janković, B., Prodanović, R., & Polović, N. (2019). Comparative stability of ficin and papain in acidic conditions and the presence of ethanol. *Amino Acids*, 51, 829-838.

Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Navarrete, E. L. C., Mazorra-Manzano, M. Á., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V. A., & Salazar-Leyva, J. A. (2017). Partial characterization of the proteolytic properties of an enzymatic extract from “Aguama” *Bromelia pinguin* L. fruit grown in Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 181-196.

Natalucci, C. L., Brullo, A., López, L. M., Hilal, R. M., & Caffini, N. O. (1995). Macrodontan, a new protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Journal of food biochemistry*, 19(6), 443-454.

Noguera-Urbano, E. A. (2017). El endemismo: diferenciación del término, métodos y aplicaciones. *Acta zoológica mexicana*, 33(1), 89-107.

Novinec, M., & Lenarčič, B. (2013). Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *Biomolecular concepts*, 4(3), 287-308.

Palma-Silva, C., Leal, B. S., Chaves, C. J., & Fay, M. F. (2016). Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(3), 305-322.

Pardo, M. F., López, L. M., Canals, F., Avilés, F. X., Natalucci, C. L., & Caffini, N. O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3795-3800.

Paule, J., Heller, S., Maciel, J. R., Monteiro, R. F., Leme, E. M., & Zizka, G. (2020). Early diverging and core Bromelioideae (Bromeliaceae) reveal contrasting patterns of genome size evolution and polyploidy. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1295.

Payrol, J. A., Obregón, W. D., Natalucci, C. L., & Caffini, N. O. (2005). Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit. *Fitoterapia*, 76(6), 540-548.

Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical biochemistry*, 100(2), 201-220.

Quiroga, A., & Esnarriaga, D. N. (2014). Diversidad de forrajeras nativas consumidas por el ganado caprino en el área pedemontana del chaco árido, Catamarca. *Biología en Agronomía*, 4, 121-147.

Reyes Jara, A. M., Liggieri, C. S., & Bruno, M. A. (2018). Preparation of soy protein hydrolysates with antioxidant activity by using peptidases from latex of *Maclura pomifera* fruits. *Food chemistry*, 264, 326-333.

Schulte, K., Horres, R., & Zizka, G. (2005). Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family. *Senckenbergiana biologica*, 85, 1-13.

Scopes, R.K. (1984). Protein purification. *Principles and practice*, Springer-Verlag, N.Y., pág. 219.

Silverstein, R. M. (1974). The assay of the bromelains using N α -CBZ-L-lysine p-nitrophenyl ester and N-CBZ-glycine p-nitrophenyl ester as substrates. *Analytical biochemistry*, 62(2), 478-484.

Smith, L. B., & Till, W. (1998). *Bromeliaceae* (pp. 74-99). Springer Berlin Heidelberg.

Suárez, M. E. (2019). Medicines in the forest: Ethnobotany of wild medicinal plants in the pharmacopeia of the Wichí people of Salta province (Argentina). *Journal of ethnopharmacology*, 231, 525-544.

Suárez, M. E., & Montani, R. M. (2010). Vernacular knowledge of Bromeliaceae species among the Wichí people of the Gran Chaco, Argentina. *Journal of Ethnobiology*, 30(2), 265-288.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Sitio web consultado el 13 Feb 2023 <https://tropicos.org>

Vallés, D., Furtado, S., & Cantera, A. M. B. (2007). Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and microbial technology*, 40(3), 409-413.

Van Dam, C. (2000). Condiciones para un uso sostenible: el caso del Chaguar ("*Bromelia Hieronymi*") en una comunidad wichí del chaco argentino. *Revista de desarrollo rural y cooperativismo agrario*, (4), 159-197.

Varilla, C., Marccone, M., Paiva, L., & Baptista, J. (2021). Bromelain, a group of pineapple proteolytic complex enzymes (*Ananas comosus*) and their possible therapeutic and clinical effects. A summary. *Foods*, 10(10), 2249.

Vollet Marson, G., Belleville, M. P., Lacour, S., & Dupas Hubinger, M. (2020). Membrane fractionation of protein hydrolysates from by-products: recovery of valuable compounds from spent yeasts. *Membranes*, 11(1), 23.

Westergaard, J. L., Hackbarth, C., Treuhaft, M. W., & Roberts, R. C. (1980). Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures. *Journal of Immunological Methods*, 34(2), 167-175.

Zizka, A., Azevedo, J., Leme, E., Neves, B., da Costa, A. F., Caceres, D., & Zizka, G. (2020). Biogeography and conservation status of the pineapple family (Bromeliaceae). *Diversity and Distributions*, 26(2), 183-195.

Zuloaga, F., & Morrone, O. M. Belgrano (eds.). 2008. Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard*, 107(3).

Capítulo III

PURIFICACIÓN DE PEPTIDASAS

III.1 Introducción

En este capítulo se aborda parte del objetivo N° 1, en cuanto a la purificación de peptidasas obtenidas a partir de los frutos de *B. serra*.

III.1.1 Métodos de purificación

Las proteínas generalmente se encuentran en la naturaleza en mezclas complejas junto con otros compuestos y muchas veces en bajas concentraciones. Para el estudio de estas biomoléculas, ha sido necesario el desarrollo de técnicas que permitan su separación procurando, adicionalmente, no afectar su estructura y función (Liu *et al.*, 2020).

Hace algunos años, estas mezclas complejas de proteínas eran fraccionadas principalmente mediante métodos de adsorción y precipitación. Si bien estos métodos aún se utilizan como pasos preliminares, las técnicas electroforéticas y cromatográficas preparativas desarrolladas durante las décadas de 1950 y 1960 permitieron el diseño de protocolos de purificación racionales y sentaron las bases de la situación actual (Janson, 2011).

El proceso de purificación de las peptidasas se puede dividir en tres etapas básicas, una primera etapa de extracción de proteínas, seguido de una etapa intermedia donde se busca reducir la presencia de impurezas (fragmentos proteicos, ácidos nucleicos, pigmentos, entre otras) y un tercer paso que tiene como objetivo alcanzar un grado elevado de pureza de la proteína en estudio. Los métodos de purificación de proteasas abarcan la separación por tamaño molecular, por carga, hidrofobicidad, adsorción e interacciones específicas (López *et al.*, 2009).

III.1.2 Separación cromatográfica

III.1.2.1 Exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de filtración en gel es un método de separación de moléculas de acuerdo con su tamaño. Para esto se utiliza una matriz conformada por pequeñas esferas empaquetadas en una columna y rodeadas por solvente. El tamaño de los poros entre las partículas de la matriz definirá el rango de tamaño de separación. De esta manera, las moléculas más pequeñas quedarán retenidas en los poros y serán eluidas al final de la corrida cromatográfica, mientras que las de mayor tamaño serán excluidas de la matriz, atravesando la columna más rápidamente. Este tipo de cromatografía se utiliza generalmente para separar proteínas que presentan tamaños moleculares considerablemente diferentes, como también para

eliminar contaminantes en las últimas etapas de purificación (López *et al.*, 2009). La eficiencia de separación del proceso depende de diversos parámetros tales como composición y pH de la fase móvil, velocidad de flujo, cantidad de proteína y volumen de la muestra, dimensiones de la columna y tamaño de las partículas del relleno (Hong *et al.*, 2012).

III.1.2.2 Intercambio iónico

Las cromatografías de intercambio iónico se basan en las propiedades eléctricas de las proteínas. El punto isoeléctrico de una proteína corresponde al valor de pH en el cual la proteína posee carga neta igual a cero. Conociendo este parámetro es posible predecir si una proteína tendrá carga positiva o negativa según el pH del medio en el cual se encuentre. Esta característica permite la separación de las proteínas mediante intercambiadores catiónicos y aniónicos. Los intercambiadores catiónicos están formados por una matriz que tiene unidos grupos cargados negativamente, por lo que es capaz de intercambiar proteínas con carga positiva. Por el contrario, los intercambiadores aniónicos poseen grupos con carga positiva unidos a la matriz, lo que permite el intercambio de proteínas con carga negativa (López *et al.*, 2009; Janson *et al.*, 2011).

III.1.2.3 Afinidad

Las proteínas poseen sitios de unión a otras moléculas denominadas genéricamente ligandos que les permiten llevar a cabo sus funciones biológicas. La manera en la cual interactúa la proteína con el ligando está determinada por el tamaño y la forma de la molécula que se va a unir, así como también del número y distribución de superficies complementarias. Se trata de un fenómeno estereoselectivo y puede ser empleado para la purificación de peptidasas.

Para el desarrollo de cromatografías de afinidad, generalmente se utilizan geles orgánicos como la agarosa (sefarosa), polímeros de acrilamida, fractogel (TSK) y sílices (CPG) como material de soporte sobre el cual se unirá de manera covalente el ligando específico. Una vez que las moléculas de proteína son inyectadas en la columna cromatográfica y luego de establecerse un equilibrio (adsorción/desorción) con el ligando, la elución se lleva a cabo modificando el ambiente en el cual se encuentra el complejo formado por afinidad. Las estrategias más utilizadas para desestabilizar la adsorción y permitir la elución de la proteína suelen ser la modificación de la fuerza iónica, el cambio de pH y el agregado de agentes modificadores o inhibidores que interactúan con el sitio activo de la proteasa, lo que produce la elución debido a la competencia de unión entre las moléculas ligadas y libres (López *et al.*, 2009; Janson *et al.*, 2011).

III.1.2.4 Hidrofobicidad

Otra característica que es aprovechada para la separación de proteínas es la hidrofobicidad de las moléculas. Las interacciones hidrofóbicas tienen lugar cuando compuestos no polares son colocados en un medio acuoso. Existen dos técnicas que utilizan esta cualidad en la separación de proteínas, las cuales se explican a continuación.

La separación de proteínas mediante **cromatografía de interacción hidrofóbica** se basa en la interacción reversible entre las proteínas y un ligando no polar que se encuentra unido a una matriz. Este tipo de cromatografía puede ser empleada en combinación con otros métodos cromatográficos, o como paso continuo luego de precipitaciones salinas sin previa preparación de la muestra ya que la presencia de alta concentración de sales aumenta las interacciones entre los componentes hidrofóbicos de la muestra y el ligando. La elución de las proteínas se logra modificando la concentración de soluto durante la corrida cromatográfica (Janson *et al.*, 2011; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012).

Por otra parte, la **cromatografía de fase reversa** se caracteriza por la presencia de una fase estacionaria menos polar que la fase móvil. Se utiliza una matriz funcionalizada con grupos hidrofóbicos y, en este caso, las moléculas se asocian a la fase estacionaria debido a las interacciones hidrofóbicas entre el soluto y la fase móvil. Las proteasas que poseen superficies hidrofóbicas se unen fuertemente a la matriz. Por lo tanto, para llevar a cabo la elución se suelen usar gradientes de concentración creciente de solventes orgánicos, como el acetonitrilo o el metanol. En muchas ocasiones las proteasas se desnaturalizan en el proceso y pierden su actividad biológica, por lo que esta técnica es empleada principalmente con fines analíticos (Janson *et al.*, 2011; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012).

III.1.3 Peptidasas purificadas a partir de bromeliáceas

Como se mencionó en el **Capítulo II**, las peptidasas resultan indispensables para el desarrollo de funciones vitales y son esenciales para la supervivencia de todos los organismos. Sin embargo, en algunas familias botánicas se observa la presencia de cantidades inusuales de estas enzimas, por lo que han sido objeto de estudio desde hace décadas, principalmente especies de las familias Moraceae (*Ficus spp.*, *Maclura pomifera* (Raf.) C.K. Schneid.), Caricaceae (*C. papaya* L.), Apocynaceae (*Asclepias spp.*, *Calotropis spp.*, *Araujia spp.*) y Bromeliaceae (*A. comosus*, *Bromelia spp.*). A lo largo del territorio argentino habitan alrededor de 135 especies de

bromeliáceas distribuidas en 14 géneros (www.floraargentina.edu.ar, visitado el 11/02/23), varias de las cuales han sido estudiadas por la presencia de peptidasas en sus frutos.

III.1.3.1 *Ananas comosus* (L.) Merr., “ananá”.

La especie del “ananá” es una de las más estudiadas entre las plantas productoras de proteasas. Los tejidos vegetales de esta especie contienen al menos 4 endopeptidasas cisteínicas y, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los frutos, en el ananá el contenido de proteasas es menor cuando la infrutescencia está inmadura. Las peptidasas más estudiadas son la bromelina de tallo (EC 3.4.22.32) y la bromelina de fruto (EC 3.4.22.33), seguidas por la ananaína (EC 3.4.22.31) y la comosaína. Al extracto acuoso de tallo y de fruto se lo denomina **bromelina** y se sabe que cumple un rol fisiológico como proteína de defensa, en el desarrollo, madurez y envejecimiento. Se han estudiado efectos medicinales para el tratamiento de condiciones clínicas como la inhibición reversible de la agregación plaquetaria, en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la coagulación sanguínea, en el tratamiento de quemaduras, entre otras (Ramli *et al.*, 2018).

III.1.3.2 Especies del género *Bromelia* L.

Se han estudiado las peptidasas de muchas especies del género bromelia, algunas de ellas con características interesantes desde el punto de vista de su aplicación a nivel industrial debido a su alta estabilidad térmica y la presencia de actividad enzimática a un pH óptimo cuyo rango se encuentra cercano a la neutralidad o es ligeramente alcalino, como es el caso las proteasas de *B. hieronymi* (Bruno *et al.*, 2003; 2006; 2008) y *B. balansae* (Pardo, *et al.*, 2000), de las cuales se han aislado, caracterizado y purificado las peptidasas cisteínicas: hieronymaína I, II y III, y balansaina I, respectivamente. Por otro lado, se purificó una peptidasa de *Bromelia antiacantha* Bertol. denominada AntA (Vallés & Cantera, 2018) la cual presenta su máxima actividad a pH 9, estabilidad térmica a 45 °C y cuya secuencia N-terminal exhibe altas coincidencias con otras proteasas de la misma familia. También han sido estudiadas las proteasas de hojas y frutos de *B. serra* (Gomez-Herrera *et al.*, 2022; Caffini *et al.*, 1988); mientras que las proteasas presentes en las hojas exhiben características de alta estabilidad térmica, reteniendo cerca del 50 % de su actividad luego de 60 min a 98 °C, y mayor actividad a pH ácido, los extractos proteolíticos preparados a partir de los frutos pierden más del 60 % de su actividad luego de 20 min a 65 °C y presentan su pH óptimo a valores cercanos a la neutralidad. También han sido estudiados los extractos proteolíticos de *B. hemispherica* Lam., *B. karatas* L., *B. pinguin* L., entre otras (Cortez-Vásquez *et al.*, 2008; Meza-Espinoza *et al.*, 2018; Moreno-Hernandez *et al.*, 2017).

III.1.3.3 *Pseudananas macrodontes*

Las proteasas de *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms fueron separadas mediante cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular. Se trata de peptidasas cisteínicas y se lograron purificar dos fracciones denominadas macrodontaína I y II, cuyas masas moleculares son 25 y 27 kDa, respectivamente. La macrodontaína I fue secuenciada, obteniéndose un alto porcentaje de identidad con las peptidasas de *A. comosus* (López *et al.*, 2000).

III.2 Materiales y métodos

III.2.1 Precipitación isoelectrica

Con el objetivo de separar las fracciones proteicas presentes en los extractos crudos de *B. serra*, en base en los resultados obtenidos en la **sección II.3.4**, se llevó a cabo un fraccionamiento por precipitación isoelectrica. Alícuotas de 0,6 ml de EC fueron mezcladas con 1,2 ml de buffer de distintos valores de pH. Los buffers utilizados fueron: buffer citrato/fosfato de sodio 0,1-0,2 M de pH 3,0 y 4,7, y buffer de Good 0,1 M de pH 6,3 y 7,7; los valores de pH fueron ajustados mediante el agregado de HCl o NaOH 1 M cuando fue necesario. Una vez homogeneizadas, las muestras se dejaron reposar durante 30 min a 4 °C para evitar la autodegradación de las enzimas seguido por un paso de centrifugación a 16000 x g durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron descartados y los precipitados fueron resuspendidos en 0,3 ml de agua bidestilada. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por IEF, cuyo método se describe en la **sección 2.7 del Capítulo II**.

III.2.2 Separación cromatográfica

Se emplearon diferentes técnicas de cromatografía líquida de alta resolución para separar las proteasas presentes en los extractos de *B. serra*. Para ello, se utilizó un equipo ÄKTA Purifier 10 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), que cuenta con un detector de absorbancia que permite realizar un seguimiento de las fracciones cromatográficas a medida que son eluidas de la columna. En todos los casos se trabajó entre 18-20 °C para minimizar la autoproteólisis. Los compuestos fueron detectados a medida que fueron eluidos de la columna siguiendo la absorbancia a 280, 215 y 330 nm (A_{280} , A_{215} y A_{330}), longitudes de onda a las cuales absorben los aminoácidos aromáticos, el enlace peptídico y compuestos fenólicos, respectivamente.

Previo a ser inyectada en la columna, la muestra (EC) fue purificada parcialmente por precipitación acetónica, como se explica en la **sección II.2.4**. El precipitado obtenido se resuspendió en el buffer de corrida de la cromatografía correspondiente según el caso y luego la muestra fue brevemente centrifugada para evitar el ingreso de agregados proteicos y partículas no deseadas en las columnas cromatográficas. Alternativamente, las muestras fueron filtradas con membranas de distintos tamaños de corte (3 kDa, 10 kDa).

III.2.2.1 Exclusión molecular

Se realizaron cromatografías de exclusión molecular utilizando una columna empacada con Sephadex G-25 y otra columna pre-empacada HiTrap Desalting, 5 ml (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) (Ver **Tabla III.1**).

III.2.2.2 Intercambio iónico

Para separar las proteasas según su punto isoeléctrico, se utilizó el método de intercambio iónico. Se emplearon columnas empacadas con resinas SP Sepharose (sulfopropil sefarosa, 54 ml) y Q Sepharose (amonio cuaternario sefarosa, 19 ml) y las columnas pre-empacadas HiTrap Q HP (GE Healthcare, 5 ml) y HiTrap SP HP (GE Healthcare, 5 ml), de intercambio aniónico y catiónico, respectivamente. La elución de las proteínas se llevó a cabo mediante la utilización de un gradiente de NaCl 1 M variando el tipo de gradiente con objetivo de encontrar un esquema óptimo de separación.

III.2.2.3 Esquemas cromatográficos empleados

En la **Tabla III.1** se muestran los detalles experimentales de las diferentes técnicas cromatográficas utilizadas.

Tabla III.1. Detalles experimentales de los métodos cromatográficos utilizados para separar las proteasas de *B. serra* (CV= volúmen de columna).

Principio de separación	Columna/Relleno	Tratamiento de la muestra	Buffer de elución	Gradiente de NaCl (1 M)
Intercambio catiónico fuerte	Pre-empacada HiTrap SP HP 5 ml SP Sepharose	Precipitación acetónica	Buffer citrato 0,02 M pH=5,5	0-100 % en 4 CV
		Precipitación acetónica	Buffer citrato 0,01 M pH=5,0	0-100 % en 4 CV
		Precipitación acetónica	Buffer citrato 0,01 M pH=4,0	0-100 % en 4 CV
		Filtrado con 3 kDa (muestra > 3kDa)	Buffer citrato 0,02 M pH=4,0	0-100 % en 4 CV
		Exclusión molecular (G25), concentrada por liofilización, precipitación acetónica	Buffer citrato 0,01 M pH=4,0	0-100 % en 4 CV

	Empacada con resina SP Sepharose, 54 ml	Precipitación acetónica	Buffer citrato 0,01 M pH=4,0	0-100 % en 2 CV
Intercambio aniónico fuerte	Pre-empacada HiTrap Q HP 5 ml Q Sepharose	Precipitación acetónica	Buffer citrato 0,02 M pH=5,5	0-100 % en 4 CV
		Filtrado con 3KDa (muestra > 3kDa)	Buffer citrato 0,02 M pH 6,0	0-100 % en 4 CV
		Precipitación acetónica, filtrado con 10 kDa (fracción > 10 kDa)	Buffer citrato 0,02 M pH 6,0	0-100 % en 4 CV
		Precipitación acetónica	Tris – HCl 0,01 M pH=8,9	0-100 % en 4 CV
		Filtrado con 3KDa (muestra>3kDa)	Tris – HCl 0,01 M pH=8,9	0-100 % en 4 CV
		Precipitación acetónica	Tris – HCl 0,01 M pH=8,9	0-100 % en 6 CV
		Precipitación acetónica	Tris – HCl 0,01 M pH=8,9	0-50 % en 5 CV
		Precipitación acetónica	Tris – HCl 0,01 M pH=9,0	0-100 % en 6 CV
		Intercambio aniónico, filtrado con 10 kDa (re-cromatografía)	Buffer citrato 0,02 M pH=5,0	0-100 % en 4 CV
		Intercambio aniónico, filtrado con 10 kDa (recromatografía)	Buffer citrato 0,02 M pH=5,0	0-100 % en 10 CV
	Empacada con resina Q Sepharose, 19 ml	Precipitación acetónica	Tris – HCl 0,01 M pH=9,3	0-100 % en 5 CV
Exclusión molecular	Empacada con resina Sephadex G25, 35 ml	Sin tratar	Citrato/fosfato de sodio 0,01 M pH 5,0	-
	Pre-empacada HiTrap Desalting (Sephadex G25)	Sin tratar	Citrato/fosfato de sodio 0,02 M pH 5,0	-

III.2.3 Análisis de las fracciones cromatográficas

III.2.3.1 Actividad enzimática

La actividad enzimática de las fracciones cromatográficas se evidenció utilizando diferentes métodos:

a) Actividad caseinolítica en tubo de ensayo: se midió la actividad caseinolítica según el protocolo descrito en la **sección II.2.6**. Para ello se mezclaron 100 μl de cada fracción cromatográfica con 1,1 ml de caseína al 1 %, pero a diferencia del método original, se incubó durante tiempos más extensos ya que, en las fracciones eluidas de las columnas, la concentración de proteasas es mucho menor y adicionalmente puede ocurrir autólisis durante todo el proceso, lo que ocasiona una disminución en la actividad enzimática.

b) Actividad caseinolítica sobre gel de agarosa: se preparó un gel de agarosa al 1 % en buffer fosfatos 0,05 M pH 6,5, idéntico al utilizado en zimografía (**sección II.2.8**). En este caso la preparación se colocó en una caja de Petri y se dejó enfriar. Una vez gelificado, se embebió en solución de caseína 1 % preparada con el mismo buffer, se escurrió y se dejó secar al aire. Sobre el gel se depositaron 10 μl de cada muestra (salida de columna o , utilizando el EC como control positivo y solución de albúmina como control negativo. La placa se colocó en una cámara húmeda y se incubó en estufa a 50 °C por 15-30 min. Se fijó y coloreó de la misma manera que para la técnica de zimograma. La actividad se evidenció como áreas transparentes sobre fondo azul.

c) Actividad proteolítica sobre gelatina: alícuotas de 5 μl de las fracciones cromatográficas o de las muestras concentradas, fueron sembradas sobre una película fotográfica color, revelada sin exposición. La película conteniendo las muestras fue colocada en una cámara húmeda e incubada a 50 °C durante 15-30 min. La desaparición de las capas de gelatina del film fotográfico revela la presencia de enzimas proteolíticas. (Adams & Tuquan, 1961; Fratello, 1968).

III.2.3.2 Determinación de puntos isoeléctricos

Las fracciones cromatográficas fueron desaladas por precipitación con 4 volúmenes de acetona (entre 1 y 3 lavados, según el caso). El precipitado obtenido se resuspendió en agua bidestilada en un volumen suficiente para solubilizar las proteínas y adecuado para obtener una solución más concentrada ya que, la concentración de proteasas en las fracciones cromatográficas

suele ser baja en comparación con el EC, como se mencionó previamente. El isoelectroenfoque se realizó de la manera descrita en la **sección II.2.8**.

III.2.3.3 Determinación de la huella peptídica por espectrometría de masas

La determinación de la huella peptídica o PMF (*peptide mass fingerprint*) es una técnica que se utiliza para la identificación de proteínas. Para ello, las proteínas son digeridas previamente a la secuenciación por espectrometría de masas.

El ensayo se realizó en el laboratorio de espectrometría de masas CEQUIBIEM (Centro de Estudios Químicos y Biológicos de Espectrometría de Masas), de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina, utilizando un espectrómetro MALDI-TOF-TOF, (del inglés “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight”) modelo Ultraflex II (Bruker, Billerica, MA, EEUU).

Brevemente, las bandas cortadas se lavaron secuencialmente con 50 mM de bicarbonato de amonio (AB), 25 mM AB, 50 % ACN y 100 % ACN; se redujeron y alquilaron con 10 mM de ditiotretitol (DTT) y 20 mM de iodoacetamida (IAA), y se digirieron en gel con 100 ng de tripsina (Promega V5111) en 25 mM AB durante la noche a 37°C. Los péptidos se recuperaron por elución con un 50 % de ACN / 0,5 % de TFA, incluyendo una breve sonicación, y luego se concentraron por secado rápido al vacío. Las muestras se resuspendieron en 15 µl de agua conteniendo 0,1 % de ácido fórmico (AF).

Las muestras se mezclaron 1:1 con una solución saturada de matriz α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) en 0,1 % TFA 30:70 agua:acetonitrilo y se sembraron sobre placas MALDI “anchor Chip” de Bruker Daltonics.

Los espectros se generaron con un espectrómetro de masa Ultraflex II Bruker Daltonics UV-MALDI-TOF-TOF equipado con un láser de Nd:YAG (λ em 355 nm). Se adquirieron datos en modo reflectron positivo en rango de m/z de 800-4000 m/z. Se calibró el instrumento usando calibrantes externos de Bruker PepMix II. Además, se generó un espectro de fragmentación usando el método LIFT.

Los espectros generados se visualizaron con el software FlexAnalysis 3.3, que también se utiliza para generar las listas de picos.

La determinación de la identidad de las proteínas contenidas en cada una de las bandas seleccionadas para análisis se realizó mediante el programa “Mascot Database Search” (Matrix

Science, Boston, MA; <http://www.matrixscience.com/search-form-select.html>). Se buscó contra la base de datos de Bromeliaceae con una tolerancia de masa de 20-100 ppm para el parental y de 0,5 Da para los fragmentos. Se permitió un *miscleavage* de tripsina, y como modificación variable se permitió la oxidación de metioninas, y como modificación fija la carbamidometilación de cisteínas.

Utilizando el software Biotoools, se combinaron espectros de MS y MSMS para realizar búsquedas combinadas a través del Mascot.

III.3 Resultados y discusión

III.3.1 Fraccionamiento por precipitación isoeléctrica

Se fraccionó el EC de *B. serra* mediante precipitación por punto isoeléctrico. Cuando se practicó esta técnica a pH 3 se pudo observar en el gel de IEF (**Figura III.1, línea 2**) la presencia de dos bandas de pI cercano a 5, las cuales habían sido visualizadas en el IEF de la **Figura II.24 b (Capítulo II)**. Contrariamente, las proteasas alcalinas no se pudieron separar; esto puede deberse a que no se empleó el pH adecuado ya que los primeros IEF realizados presentaron una banda de pI < 8, siendo ese el motivo por el cual se seleccionó el buffer de pH 7,7 para realizar la precipitación isoeléctrica. Sin embargo, durante el desarrollo de la investigación se lograron obtener geles de IEF mejor resueltos que mostraron finalmente que las proteasas alcalinas presentan valores de pI entre 8,15-8,65. Se proyecta a futuro obtener una muestra enriquecida en las peptidasas alcalinas por precipitación con buffer de pH alrededor de 8,4.

El método de precipitación isoeléctrica ha dado buenos resultados para recuperar fracciones proteicas de diversos extractos, especialmente obtenidos a partir de legumbres (Alonso-Miravalles *et al.*, 2019; Boye *et al.*, 2010); sin embargo, como método de purificación resulta ser poco eficiente ya que generalmente se obtienen precipitados que contienen proteínas con diferentes puntos isoeléctricos (Sironi *et al.*, 2005). Por otra parte, algunas proteínas como por ejemplo las albúminas, retienen en gran medida su solubilidad cuando son llevadas a un valor de pH equivalente a su punto isoeléctrico. Cuando esta técnica se aplica a la recuperación de una mezcla de proteínas el punto isoeléctrico se considera como el pH al cual la solubilidad es mínima, factor que se ve afectado por la presencia de sales (Glatz, 1990), aunque no necesariamente todas las proteínas de la muestra precipiten a ese valor de pH. Por lo tanto, en lo que respecta a la purificación preliminar de las proteasas de *B. serra*, se considera una técnica prometedora para ser evaluada a futuro, aunque es necesario estudiar varios factores como por ejemplo cómo varía la solubilidad de la mezcla de proteínas cuando se modifica el pH y la concentración de sales del medio, además de evaluar qué sucede cuando los valores de pH son ajustados según los puntos isoeléctricos como fue anteriormente expuesto.

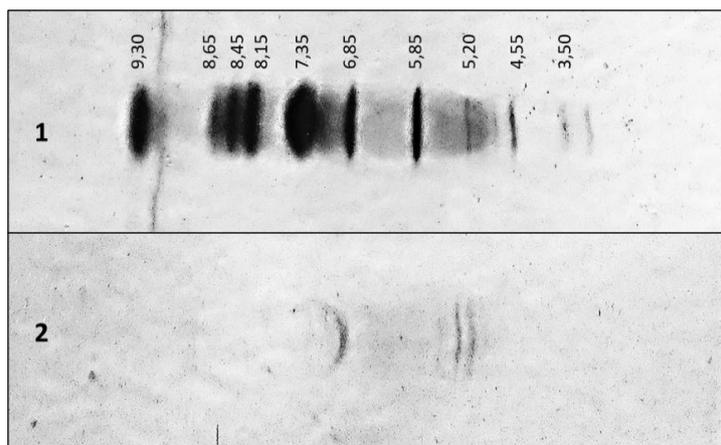


Figura III.1. Imagen del gel de IEF correspondiente a la fracción ácida del EC de *B. serra* (línea 2) precipitada a pH=3 y a los patrones de pI (línea 1).

III.3.2 Separación cromatográfica

III.3.2.1 Cromatografía de exclusión molecular

El EC fue fraccionado mediante cromatografía de exclusión molecular (G25). Se utilizaron dos columnas, una preempacada con G25 de 5 ml y otra empacada con 35 ml del mismo relleno. La elución de la muestra fue monitoreada mediante la lectura continua de las A_{280} , A_{215} y A_{330} . La actividad proteolítica de las fracciones fue determinada por dos métodos diferentes, mediante la siembra directa de las salidas de columna sobre film fotográfico y por digestión de caseína embebida en un gel de agarosa tipo zimografía.

Se evaluó la actividad de las fracciones concentradas provenientes de la columna de 35 ml, visualizadas en el cromatograma (**Figura III.2**) como dos grandes picos en la A_{280} denominados Pico 1 (fracciones I y II) y Pico 2 (fracciones III-VI), los cuales resultaron ser activos (**Figura III.3**).

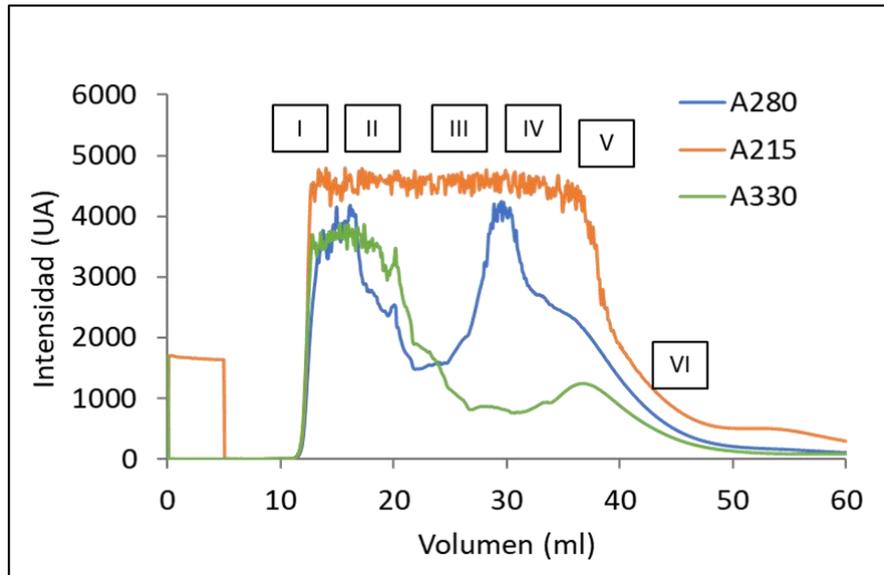


Figura III.2. Cromatografía de exclusión molecular (G25, 35 ml). Muestra: 3 ml de precipitado acetónico redisoluto en buffer citrato 0,01 M pH 5 (buffer de corrida). Velocidad de flujo: 0,5 ml/min. Fracciones colectadas cada 7 ml, excepto la II (4,5 ml).

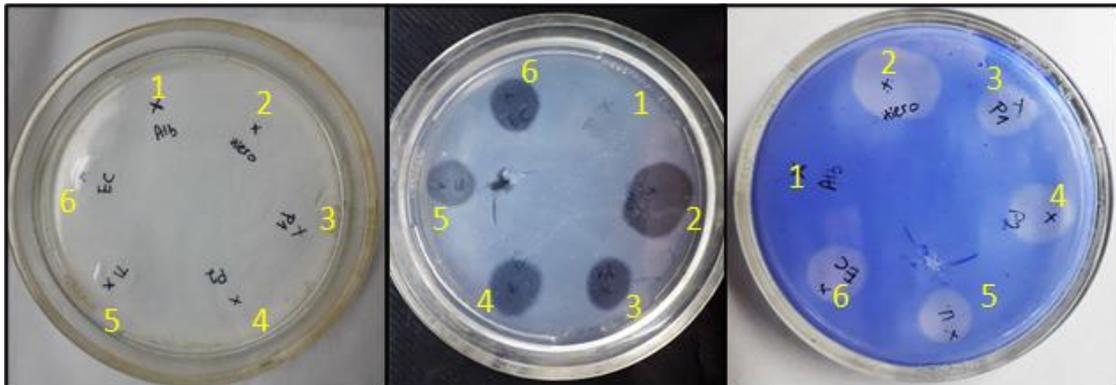


Figura III.3. Actividad proteolítica sobre gel de agarosa embebido en caseína. **1:** albúmina (control negativo). **2:** Extracto crudo de *B. hieronymi* (control positivo). **3:** Pico 1 (fracciones I y II del cromatograma de la Figura III.2). **4:** Pico 2 (fracciones III y IV de la Figura III.2). **5:** Fracción > 3kDa del EC de *B. serra*. **6:** EC de *B. serra*.

Por otra parte, se testeó la actividad de las fracciones eluidas de la columna HiTrap, donde se observa que las fracciones 1, 2 y 3 (I, II y III de la **Figura III.4**) presentan actividad proteolítica, mientras que el resto de las fracciones no resultan activas tal como se observa en la **Figura III.5**.

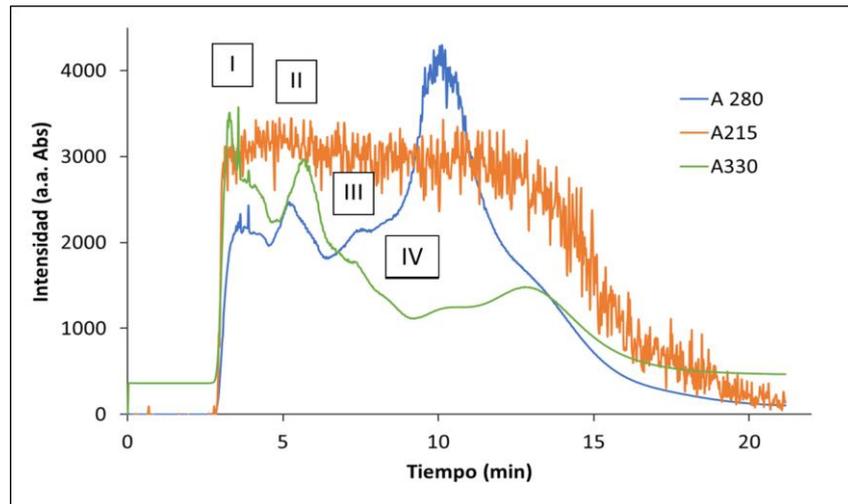


Figura III.4. Cromatografía de exclusión molecular (G25). Muestra: 0,5 ml de precipitado acetónico redissuelto en buffer citrato 0,02 M pH 5 (buffer de corrida). Velocidad de flujo: 0,5 ml/min. Fracciones colectadas cada 2 ml.

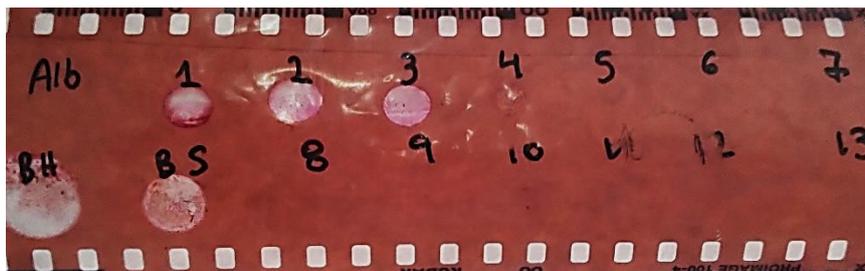


Figura III.5. Actividad proteolítica sobre film fotográfico. Alb: albúmina (control negativo). BH: extracto crudo de *B. hieronymi* (control positivo). BS: extracto crudo de *B. serra*. 1-13: fracciones cromatográficas (G25).

A partir de estos resultados se pudo observar similitudes en ambos cromatogramas, tanto en el perfil de la A_{280} y A_{330} , así como en la actividad proteolítica de las fracciones, por lo que ambas columnas pueden ser utilizadas para separar la fracción activa, siendo más conveniente el empleo de una u otra de acuerdo a la cantidad de muestra que se quiera recuperar. Ambos métodos utilizados para evaluar la actividad de las fracciones cromatográficas resultaron útiles, siendo más práctico el testeo sobre el film fotográfico utilizando las salidas de columna sin tratar ya que de esta manera se evitan varios procedimientos metodológicos y la consecuente pérdida de actividad.

Caffini *et al.* (1988) utilizaron un paso cromatográfico de exclusión molecular (49,5 ml de Sephadex G-75, 1 volumen de columna en 3,5 h aproximadamente; tiempo total de la corrida

estimado en 10 h; 2 ml de muestra) para separar una pequeña fracción activa del EC de *B. serra* (A_{280} : 0,5 UA—unidades de absorbancia) flanqueada por dos fracciones mayoritarias inactivas, una de mayor masa molecular con elevada absorbancia a A_{330} nm (A_{280} : 3,5 UA), y otra de menor masa molecular y nula A_{330} (A_{280} : 2,5 UA). En este trabajo de tesis, mediante la aplicación de un volumen de muestra cuatro veces menor (0,5 ml) a la columna HiTrap G25 se obtienen tres fracciones activas (A_{280} entre 2 y 2,5 UA), además de una fracción inactiva de menor peso molecular ($A_{280} > 4$ UA) y menor absorbancia A_{330} . No se observa la separación de una primera fracción inactiva de elevado peso molecular, lo cual puede deberse a las características de la resina utilizada, ya que el relleno G-75 permite la separación en un rango de masas moleculares más elevadas que el G-25. De todas maneras, el empleo de la columna HiTrap G-25 (5 ml) permitió la separación de fracciones activas con elevada A_{280} en un menor tiempo, ya que cada corrida cromatográfica se desarrolla en poco más de 20 min, lo que permite separar la fracción proteolítica del PAR de manera sencilla, pudiendo utilizarse como primera etapa en la purificación cromatográfica de las peptidasas.

III.3.2.2 Cromatografía de intercambio iónico

De acuerdo con los resultados obtenidos en el Capítulo II (sección 2.3.5), el PAR obtenido a partir de frutos de *B. serra* presentó siete bandas mayoritarias cuando se analizó mediante IEF, de las cuales dos bandas presentaron pI alcalino, una pI cercano a seis y cuatro pI más ácido. De todas ellas, la única que no presentó actividad enzimática fue la de pI cercano a 6, mientras que las bandas alcalinas resultaron ser las más activas. Debido a que los extractos de *B. serra* contienen proteínas con diferentes puntos isoeléctricos, se utilizó este parámetro para intentar purificar las peptidasas mediante cromatografías de intercambio aniónico y catiónico.

En primer lugar, se utilizó el PAR resuspendido en buffer citrato de pH 5,5. A este pH se espera que las proteínas de pI mayor a 5,5 se encuentren cargadas positivamente. Si se utiliza un intercambiador catiónico las proteínas más alcalinas deberían quedar retenidas en la columna, mientras que las de pI ácido deberían ser eluidas con el lavado antes de comenzar el gradiente salino. Por el contrario, si se inyecta la misma muestra en una columna de intercambio aniónico, las proteínas que se espera que queden retenidas serían las de pI más ácido, mientras que las de pI alcalino serían eluidas durante la etapa de lavado de la columna (Karlsson *et al.*, 1998).

Las estrategias mencionadas fueron el punto de partida; se realizaron diferentes variaciones en las condiciones de corrida en cuanto al pH, velocidad de flujo y gradiente salino,

así como la forma de preparar la muestra, con el objetivo de mejorar los resultados y lograr la retención y separación de las peptidasas.

III.3.2.2.1 Cromatografía de intercambio catiónico

Se intentó separar las proteasas de pl alcalino utilizando un intercambiador catiónico fuerte (SP). En principio, se llevó a cabo la corrida a pH 5,5 y, a diferencia de lo esperado según la bibliografía citada, no se logró retener dichas proteínas. Por el contrario, la muestra fue eluida completamente con el primer lavado de columna previo al inicio del gradiente salino (**Figura III.6 a**), por lo que se procedió a utilizar valores de pH aún más ácidos; sin embargo, no se obtuvieron mejoras en los perfiles cromatográficos.

Con el objetivo de mejorar la interacción entre la muestra y el intercambiador catiónico, se eliminaron del PAR los compuestos <3 kDa empleando tubos Millipore. En el perfil cromatográfico se observó que una pequeña fracción proteica fue retenida en la columna (tiempo de retención, RT=36-41 min). En la **Figura III.6 b** se observa en el cromatograma un pico de $A_{215}=0,543$ UA, con muy baja intensidad de A_{280} (0,106 UA). Durante el procedimiento de filtrado con membranas de 3 kDa se eliminaron moléculas más pequeñas como glúcidos, compuestos fenólicos y péptidos, los cuales probablemente interactuaron con las proteínas de interés, interfiriendo en su unión a la resina en cromatografía de la **Figura III.6.a**. Se intentó mejorar la técnica mediante la modificación de otras variables como la concentración de la muestra, el número de lavados con acetona, la carga de una fracción activa proveniente de la cromatografía de exclusión molecular (**inciso III.3.2.1**) y, adicionalmente, se utilizó una columna empacada con SP sefarosa de 54 ml, aunque en ninguno de estos casos se consiguió un mejor resultado. Si bien sí se logró mejorar la técnica en cierta medida (**Figura III.6 b** respecto de la **III.6 a**), no se consideró relevante continuar con este método, ya que las cantidades de proteína recuperadas fueron muy bajas. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Vallés & Cantera (2018), quienes ante una situación de similar complejidad, utilizando la misma columna, mediante una única etapa cromatográfica lograron purificar una proteasa cisteínica de *B. antiacantha*, Antiacantaína A (isoformas de pl 7,3 y 8,5), a partir de un extracto con al menos tres peptidasas, utilizando buffer citrato 0,01 M de pH 4,5 y un gradiente salino de 0,0 a 0,3 M de NaCl.

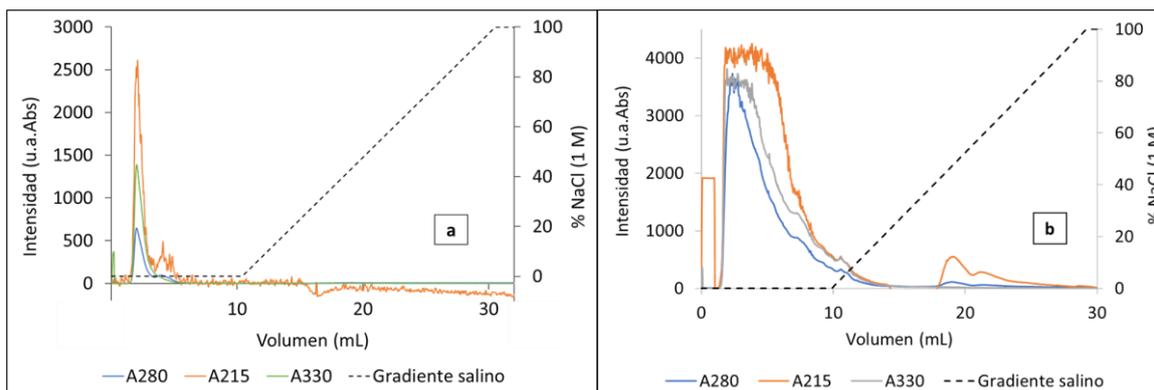


Figura III.6. Cromatografías de intercambio catiónico (HiTrap SP HP, 5 ml): **a.** Muestra: 0,25 ml de PAR resuspendido en buffer citrato 0,02 M de pH 5,5 (buffer de corrida), velocidad de flujo de 1 ml/min; **b.** Muestra: 0,25 ml de la fracción > 3 kDa del EC, suspendida en buffer citrato 0,02 M de pH 4 (buffer de corrida), velocidad de flujo de 0,5 ml/min.

III.3.2.2.2 Cromatografía de intercambio aniónico

Se realizaron diversas cromatografías empleando una columna HiTrap Q HP (5 ml), utilizando diferentes condiciones y variaciones en la preparación de la muestra.

Cuando el PAR fue inyectado en la columna cromatográfica utilizando buffer de corrida de pH 8,9, se esperaba que todas las proteínas quedaran retenidas. En el cromatograma (**Figura III.7**) se observa una fracción no retenida la cual presentó actividad proteolítica y otra fracción retenida que eluye con 35-50 % de NaCl 1 M. Esta última mostró un perfil en el cual se distingue un pico principal en la A₂₈₀, que presenta baja actividad enzimática. Siguiendo la A₂₁₅ se observan dos picos solapados, el primero coincide con la punta del pico de mayor intensidad en la A₂₈₀, mientras que el segundo coincide con su bajada, el cual presenta la mayor actividad enzimática ($0,01 \pm 0,0$ Ucas/ml). Por IEF se pudo observar que, mediante este método, las proteasas alcalinas están presentes en la fracción no retenida y eluyen con el primer lavado (**Figura III.8 B**, líneas 3 y 4), mientras que las proteínas de pI intermedio y ácido quedan retenidas en la columna. En un primer IEF (**Figura III.8 A**) se pudo observar que a medida que avanza la corrida cromatográfica, las proteasas eluyen de mayor a menor pI, tal como se predijo según la bibliografía citada. Si bien se observa distorsión en el gel debido a la retención de sales en la muestra, se distingue en la calle correspondiente a la fracción 10 tres bandas principales con valores de pI aproximados a 6, 5 y 3,5. En la calle que contiene la fracción 11 se observa la desaparición de la banda menos ácida (pI 6) y en la que contiene la fracción 12 se puede observar un banda mayoritaria de pI 3,5. Posteriormente se corroboró por IEF la presencia de la proteasa de pI 3,5 en la fracción cromatográfica correspondiente al mismo RT (**Figura III.8 B**, línea 12).

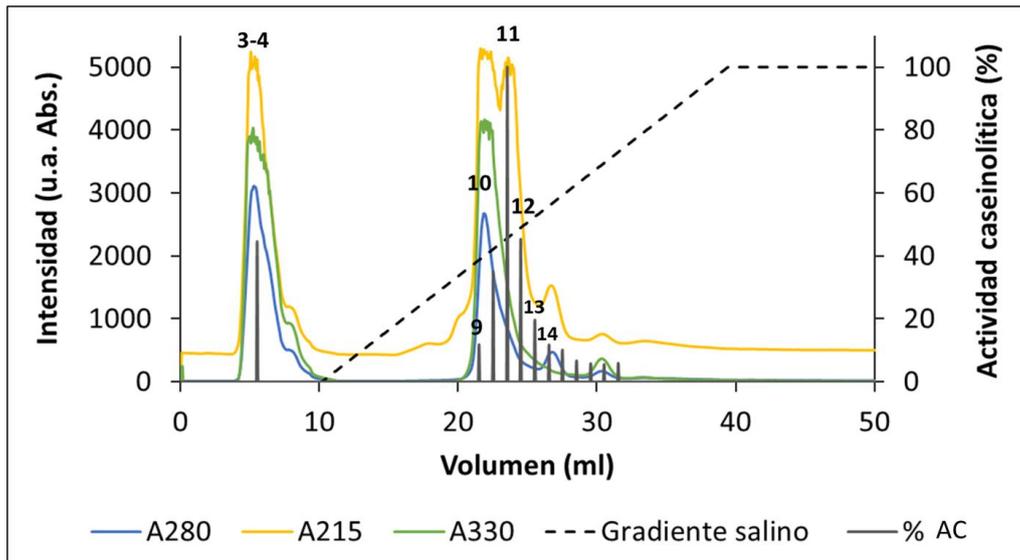


Figura III.7. Cromatografía de intercambio aniónico (HiTrap Q HP, 5 ml). Muestra: 0,3 mL del precipitado acetónico redisoluto en buffer de corrida (Tris-HCl 0,01 M pH 8,9). Velocidad de flujo: 0,5 ml/min. Las líneas de color celeste, amarillo y verde corresponden a la intensidad de A₂₈₀, A₂₁₅ y A₃₃₀, respectivamente. La línea negra punteada corresponde al gradiente de NaCl 1 M (0-100 %) llevado a cabo en 6 CV. Las barras grises corresponden al porcentaje de actividad caseinolítica (%AC) de las fracciones colectadas a lo largo de la corrida cromatográfica (3-4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, etc.).

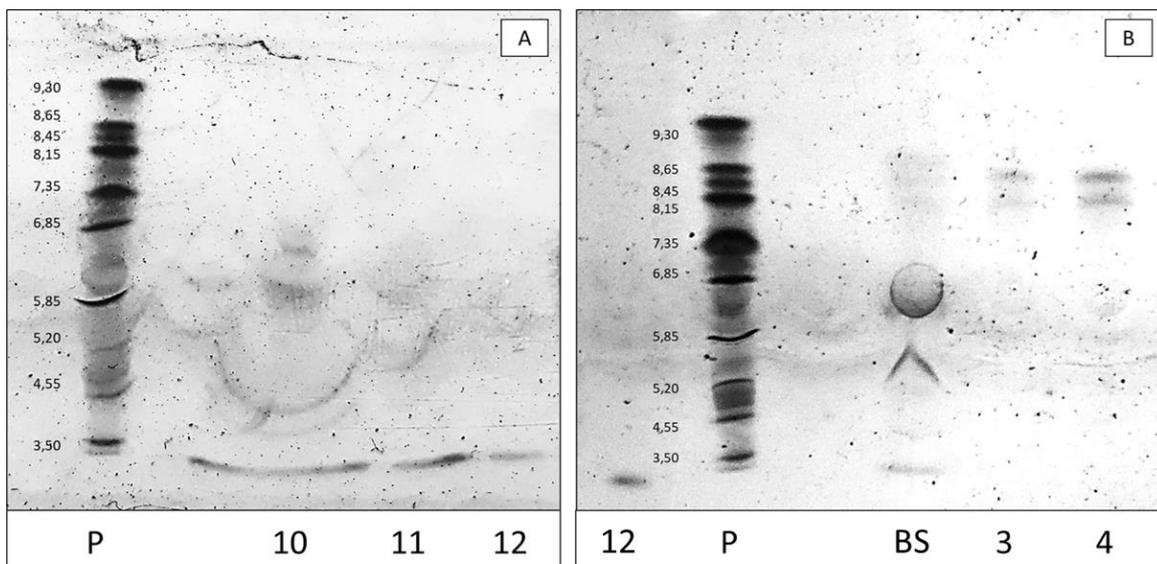


Figura III.8. A) IEF de las salidas de columna correspondiente a la cromatografía de la Figura 3 (10, 11 y 12: fracciones eluidas sucesivamente). P: patrones de pl. B) IEF correspondiente al pico de máxima absorción a 280 nm (12) y al no retenido (3 y 4) de una cromatografía de intercambio aniónico equivalente a la de la figura 3. P: patrones de punto isoeléctrico. BS: PAR de *B. serra* (muestra cargada en la columna).

Para intentar purificar las proteasas de $pI < 5$ se utilizó la muestra obtenida mediante precipitación isoelectrica, la cual fue eluida a través de la columna HiTrap Q HP a pH 5. Como se observa en la **Figura III.9**, se obtuvo una fracción no retenida con actividad caseinolítica, mientras que las proteínas retenidas en la columna se separaron en tres picos, dos de muy baja intensidad de A_{280} (30 y 38 % de NaCl 1M) con actividad caseinolítica mayor al 90 % y otro pico con un máximo de A_{280} más elevado, que presentó alrededor del 30 % de actividad enzimática (62 % de NaCl 1M).

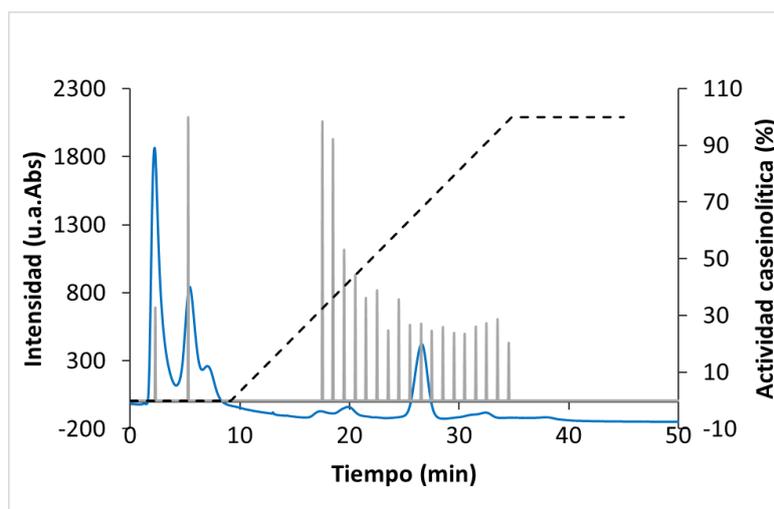


Figura III.9. Cromatografía de intercambio aniónico (HiTrap Q HP, 5 mL). Muestra: 0,5 ml de la fracción ácida obtenida por precipitación isoelectrica, resuspendida en buffer citrato 0,02 M de pH 5 (buffer de corrida). La línea celeste corresponde a la A_{280} y la punteada al gradiente de NaCl 1 M (6 CV). Las barras grises corresponden al porcentaje de actividad caseinolítica de las fracciones (1 ml).

Por otra parte, se realizaron cromatografías de intercambio aniónico a pH 6,0 utilizando el PAR filtrado con 10 kDa y concentrado, obteniéndose perfiles variables que muestran uno, dos o tres picos retenidos. En el cromatograma de la **Figura III.10**, se observa un único pico retenido con su máximo de absorción a los 41 min de retención. Los cromatogramas de A_{280} , A_{215} y A_{330} presentan un perfil similar.

La fracción colectada fue recromatografiada a pH 5 utilizando la misma columna y un gradiente salino de 10 volúmenes de columna a diferencia del anterior que fue realizado en cuatro. El perfil mostró un pico principal con un $RT=25$ min solapado con otro pico que muestra su máximo de absorción a 280 nm a los 31 min de retención en la columna y un último pico a un RT de 40 min de muy baja intensidad, pero mejor resuelto (**Figura III.11**).

Se midió la actividad caseinolítica de la fracción pura mediante el método en tubo de ensayo, obteniéndose una actividad enzimática de $0,01 \pm 0,0$ Ucas/ml, lo que representa un 1,4 % de la actividad presente en el extracto.

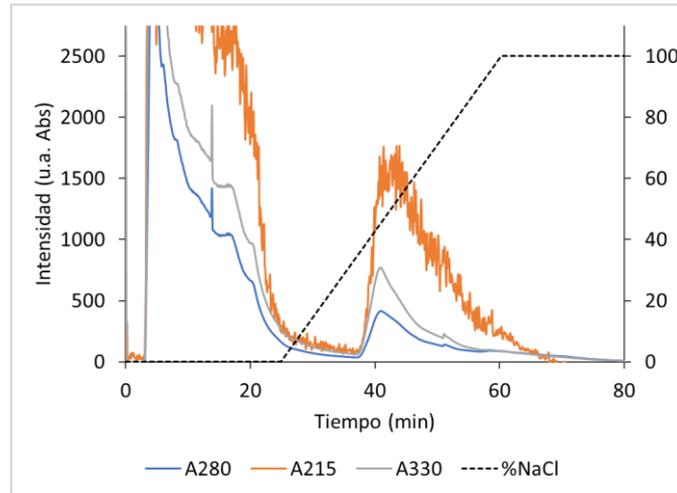


Figura III.10. Cromatografía de intercambio aniónico (HiTrap Q HP, 5 mL). Muestra: 0,5 ml de PAR filtrado con 10 kDa resuspendido en buffer citrato 0,02 M de pH 6 (buffer de corrida), concentrado tres veces. Las líneas celeste, naranja y gris corresponden a A_{280} , A_{215} y A_{330} , respectivamente. La línea negra punteada corresponde al gradiente de NaCl 1M (4 CV).

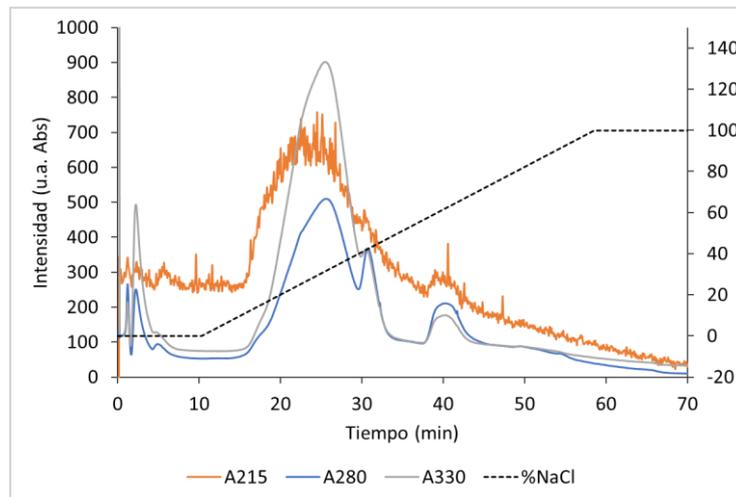


Figura III.11. Recromatografía de intercambio aniónico (HiTrap Q HP, 5 mL) de la fracción retenida en la cromatografía ilustrada en la Figura 8 (0,1 ml). Buffer citrato 0,02 M de pH 5. Las líneas celeste, naranja y gris corresponden a la A_{280} , A_{215} y A_{330} , respectivamente. La línea negra punteada corresponde al gradiente de NaCl 1M (10 CV).

Debido a que en las recromatografías se recuperó baja cantidad de proteína se descartó esta etapa y se realizaron algunos cambios sobre el paso anterior (cromatografía de intercambio aniónico a pH 6) para obtener una mejor resolución en la separación de las proteínas. Para ello, se agregó un tiempo de espera (5-10 min) entre la inyección de la muestra y el inicio de la corrida, lo que aumentó aproximadamente tres veces la cantidad de proteína retenida en la columna (**Figura III.12**), y por otra parte se aumentó de cuatro a seis el número de CV del gradiente salino, lo cual permitió una separación en tres picos, a diferencia de lo ocurrido en la cromatografía de la **Figura III.10**.

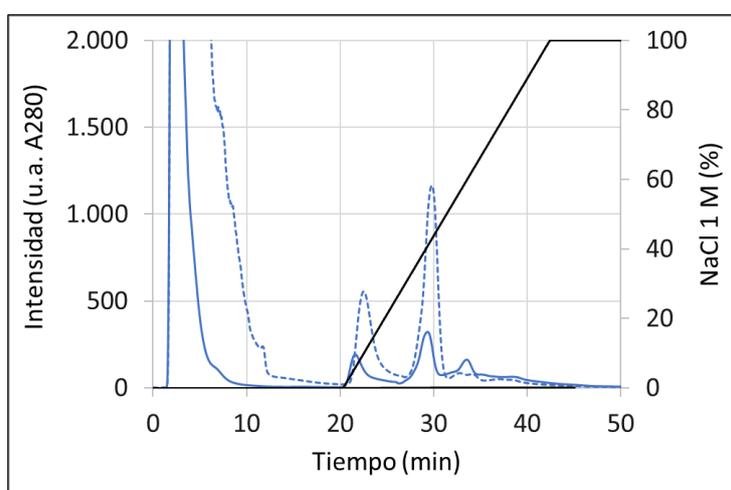


Figura III.12. Perfiles de A_{280} (HiTrap Q HP, 5 mL). Muestra: 0,5 ml del PAR filtrado con 10 kDa, concentrado dos veces, resuspendido en buffer citrato de pH 6,0 (buffer de corrida). Línea celeste continua: cromatografía de la muestra eluida sin tiempo de espera luego de la inyección. Línea celeste punteada: cromatografía de A_{280} de la muestra eluida luego de 10 min de espera posterior de la inyección. Línea negra: Gradiente de NaCl 1M (6 CV).

Si bien Caffini *et al.* (1988) partiendo de un polvo acetónico y utilizando DEAE Sephacel lograron retener una pequeña fracción activa con $pI < 8$ (A_{280} aproximada: 0,1 UA), esto se logró sólo luego de dos cromatografías previas de exclusión molecular de larga duración, sin reportar su valor de pI o verificar su pureza. En cambio, en este trabajo de tesis se logró retener todas las proteínas de pI menor a 8 presentes en los extractos acuosos de *B. serra*, mediante un único paso cromatográfico utilizando SP Sepharose ($A_{280} > 2,5$ UA). Se pudo corroborar mediante IEF la presencia de las dos bandas proteicas de pI alcalino en la fracción no retenida y la presencia de las otras bandas de pI menor a 6 previamente identificadas en el EC, las cuales son retenidas en la columna. Por otra parte, se logró aislar la peptidasa de $pI < 3,5$ (**Figura 6 b**, calle 12 en el IEF)

y se pudieron identificar las demás proteínas de diferentes pI retenidas en la columna. Si bien todavía parece existir un solapamiento entre picos en el cromatograma, se pudo visualizar al IEF la banda única de pI < 3,5 (A_{280} aproximada: 1 UA) a la cual se le pudo determinar la huella peptídica.

III.3.3 Actividad caseinolítica y tabla de purificación

A partir de los valores de actividad caseinolítica y concentración proteica se calcularon los valores de actividad específica, el grado de purificación y el rendimiento de cada etapa de purificación, los cuales se muestran en la **Tabla III.2**.

Tabla III.2. Esquema de purificación de las peptidasas de pI <5,0 de *B. serra*.

Muestra	Volumen (ml)	Proteínas totales (mg)	Actividad total (Ucas)	Actividad específica (Ucas/mg)	Grado de purificación (n-veces)	Rendimiento (%)
EC	1	0,3210	1,0026	3,1234	1	100 %
PAR	0,5 (2X)	0,1780	0,9400	5,2809	1,6908	93,7562
NR	4	0,1475	0,1626	1,1018	0,3528	0,1622
P1	2,4	0,0078	0,0077	0,9843	0,3151	0,7673
P2	3	0,0143	0,0064	0,4474	0,1433	0,6379

Como se puede observar en la **Tabla III.2** los valores de actividad caseinolítica obtenidos para las salidas de columna fueron demasiado bajos, esto puede deberse a que las fracciones colectadas presentaron una baja concentración de proteínas, lo que se vio reflejado en una disminución de la AE con respecto a la muestra de partida. Por lo tanto, a diferencia de lo que se espera con este tipo de esquemas, en este caso no se obtuvo una mejora en el grado de purificación. Se proyecta a futuro mejorar esta técnica ya que se pudo demostrar que es útil para separar las proteasas más ácidas de *B. serra*.

III.3.4 Huella peptídica de la proteasa de $pI < 3,5$

Se obtuvo la huella peptídica de la proteasa de pI menor a 3,5, cuyo espectro de masas se muestra en la **Figura III.13**. Los valores de relación masa/carga (m/z) (**Tabla III.3**) se contrastaron con los péptidos teóricos resultantes de la digestión trípica *in silico* de las secuencias de proteasas cisteínicas anteriormente reportadas, cada una especificada con su número de identificación (ID) o *accession number* de la base de datos UniProt. El análisis se realizó mediante el *software* FindPept contrastando con las siguientes secuencias de bromeliáceas: Bh-cp I de *Bromelia hieronymi* (D2U6V5); fastuosáina de *Bromelia fastuosa* (A1E254); bromelina de tallo (P14518), ananaína (P80884) y bromelina de fruto (O23791) de *Ananas comosus*; macrodontaína I (P83443) de *Pseudananas macrodontes* (P83447). Así también, los valores de m/z experimentales se contrastaron con secuencias de peptidasas de otras familias: caricaína (P10056) de *Carica papaya* (Caricaceae); proceraína (A0A165EL94) y proceraína B (A0A0A0Q2K8) de *Calotropis procera* (Apocynaceae). Adicionalmente, siguiendo el mismo procedimiento, se calculó el porcentaje de cobertura de los extremos amino terminales de peptidasas de *B. hieronymi*, *B. pinguin*, *B. fastuosa*, *B. antiacantha*, *P. macrodontes*, *A. comosus* (Bromeliaceae), *Solanum granuloso-leprosum* Dunal (Solanaceae) y *C. procera* (Apocynaceae), los cuales se muestran en la **Tabla III.4**.

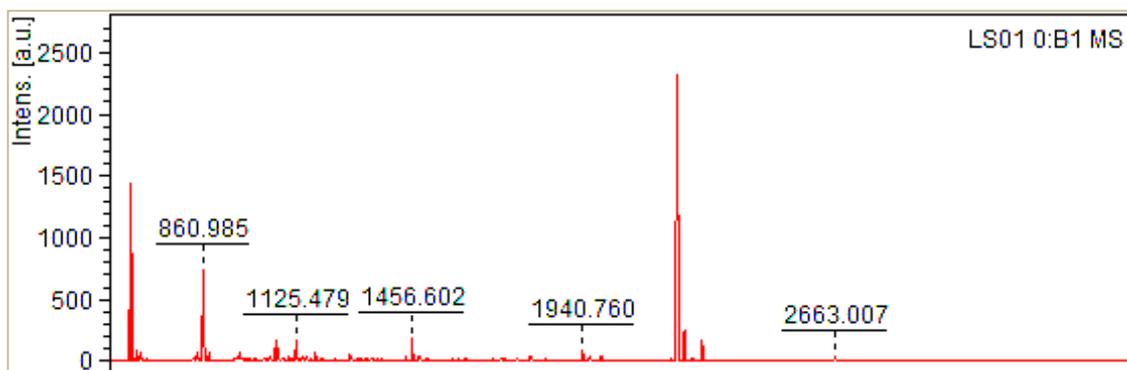


Figura III.13. Espectro de masas correspondiente a la digestión trípica de la proteasa de $pI < 3,5$ de *B. serra*.

Cabe destacar que se cubrió el 100 % de la secuencia amino terminal de la Hieronimaína III y un 64 % de la Hieronimaína II, mientras que no hubo coincidencias con la Hieronimaína I. Se observó que los valores de m/z experimentales coinciden con los péptidos tríplicos teóricos de

otras peptidasas de bromeliáceas, cubriendo más del 40 % de las secuencias amino terminales de la comosaína, bromelina de fruto y bromelina de tallo (*A. comosus*), y de la fastuosaína (*B. fastuosa*), aunque no se encontraron coincidencias con los péptidos trípticos teóricos de la pinguinaína A1, A2, B1 y B2 (*B. pinguin*) ni con la antiacantaína A (*B. antiacanta*). Con respecto a las peptidasas de otras familias, se obtuvo sólo un 23 % de cobertura de la granulosaína I (*S. granuloso-leprosum*, Solanaceae) y no se observó coincidencia con la proceraina (*C. procera*, Apocynaceae). Esto podría deberse a que las peptidasas de especies que pertenecen a la misma familia suelen presentar similitudes ya que están relacionadas filogenéticamente, tal como ha sido reportado por Bruno *et al.* (2011) quienes construyeron un árbol filogenético a partir de secuencias de varias peptidasas vegetales incluyendo especies de diferentes familias, lo cual les permitió demostrar que todas las secuencias de bromeliáceas constituyen un grupo separado.

Tabla III.3. Valores de la relación masa/carga (m/z) de los fragmentos trípticos de la proteasa de pl 3,5 de *B. serra*

m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z
606,308	679,418	876,952	1065,989	1309,553	1588,628	1929,656
612,159	681,885	892,934	1072,010	1321,498	1608,646	1940,760
615,530	683,604	900,142	1081,965	1332,551	1685,642	1963,735
628,258	685,309	906,125	1106,478	1341,574	1708,586	1994,767
643,908	695,626	922,039	1110,706	1366,522	1709,607	2232,875
649,937	699,441	938,110	1125,479	1438,581	1717,681	2663,007
655,962	711,560	963,419	1158,246	1456,602	1755,677	2679,015
659,731	854,968	987,488	1164,514	1475,621	1795,679	2692,087
665,910	860,985	1050,036	1180,298	1569,613	1838,779	2809,000
671,938	870,944	1059,986	1283,022			

En cuanto a la comparación con los PMF teóricos obtenidos para las secuencias completas, el mayor porcentaje de cobertura se obtuvo para la caricaína (*C. papaya*) cubriendo un 23,27 % de la secuencia, seguido por una cobertura del 22,06 % para la proceraina (*C. procera*) y del 14,62 % para la bromelina de tallo (*A. comosus*). En el **Anexo I** se muestra la comparación de las secuencias de las proteasas reportadas (color negro) con los péptidos teóricos obtenidos por digestión tríptica *in silico* de la proteasa de pl menor a 3,5 (secuencias en diferentes colores). A partir de estos datos se calcularon los porcentajes de cobertura mostrados en la **Tabla III.5**.

Tabla III.4. Comparación entre los valores de m/z experimentales obtenidos por digestión trípica de la peptidasa de pI<3,5 de *B. serra* (PMF) y los péptidos teóricos obtenidos mediante digestión trípica *in silico* de las secuencias amino terminales de diferentes peptidasas cisteínicas.

Organismo	Proteasa	Secuencia amino-terminal	Cobertura (%)	Referencia
<i>B. hieronymi</i>	Hieronymaína I	- ALPESIDWRA KGAVTEVKRQ D-----	0	Bruno <i>et al.</i> , 2003
	Hieronymaína II	- AVPQSIDWRV YGAV-----	64	Bruno <i>et al.</i> , 2006
	Hieronymaína III	- AVPQSIDWRG YGAVTTSRNQ G-----	100	Bruno <i>et al.</i> , 2008
<i>A. comosus</i>	Ananaína	- SVPQSIDWRD SGAVTSVKNQ G-----	0	Lee <i>et al.</i> , 1997
	Comosaína	- -VPQSIDWRN YGAVTSVKNQ G-----	45	Napper <i>et al.</i> , 1994
	Bromelaína de tallo	- AVPQSIDWRD YGAVTSVKNQ N-----	43	Ritonja <i>et al.</i> , 1998
	Bromelaína de fruto	- AVPQSIDWRD YGAVNEVKNQ N-----	43	Muta <i>et al.</i> , 1994
<i>B. pinguin</i>	Pinguinaína A1	- -VPESIDWRD YGAVTSVKNQ GEXIY----	0	
	Pinguinaína A2	- -VPESIDWRD YGAVTSVKNQ GSXG-----	0	Payrol <i>et al.</i> , 2008
	Pinguinaína B1 y B2	- -VPESIDWRR YGAVTSVKNQ G-----	0	
<i>B. antiacantha</i>	Antiacanthaína A	- AVPESIDWRY GAVT-----	0	Vallés & Cantera, 2018
<i>B. fastuosa</i>	Fastuosainaína	- AVPQSIDWRD YGAVTSVKNQ G-----	43	Cabral <i>et al.</i> , 2006
<i>P. macrodontes</i>	Macrodongtaína I	- AVPQSIDWRD YGAVNEVKNQ GPCGGCW--	33	López <i>et al.</i> , 2000
<i>S. granuloso-leprosum</i>	Granulosainaína	D RLPASVDWRG KGVLLVLVKNQ GQC-----	21	Vallés <i>et al.</i> , 2008
<i>C. procera</i>	CpCP-1, 2 y 3	F PVPCSVDWRE KGALVPIKNQ GRCGSCWAF	0	Ramos <i>et al.</i> , 2013
<i>M. pomífera</i>	Pomiferina I	- ITETHNFLAL SXKSGLWPST NYGD-----	0	Reyes Jara <i>et al.</i> , 2021

Tabla III.5. Comparación entre los valores de m/z experimentales obtenidos por digestión trípica de la peptidasa de pI < 3,5 de *B. serra* (PMF) y los péptidos teóricos obtenidos mediante digestión trípica *in silico* de las secuencias completas de diferentes peptidasas cisteínicas.

Organismo	Peptidasa	Cobertura (%)	ID UniProt
<i>C. papaya</i>	Caricaína	23,27	P10056
<i>A. comosus</i>	Ananaína	6,67	P80884
	Bromelina de tallo	14,62	P14518
	Bromelina de fruto	2,28	O23791
<i>C. procera</i>	Proceraína	22,06	A0A165EL94
	Proceraína B	12,4	A0A0A0Q2K8
<i>P. macrodontes</i>	Macrodongtaína I	7,51	P83443
<i>B. hieronymi</i>	Hieronymaína	3,97	D2U6V5
<i>B. antiacantha</i>	Antiacantaína A	2,67	A0A515MFQ5
<i>B. fastuosa</i>	Fastuosainaína	2,47	Q6Q2T4

III.4 Conclusiones

En el desarrollo de este capítulo se aplicaron diferentes métodos de purificación para separar las proteínas de *B. serra*. Mediante la técnica de precipitación isoeléctrica se obtuvo un extracto parcialmente purificado, conteniendo mayoritariamente la fracción proteica de pI cercano a 5. Cuando se analizó esta muestra por cromatografía de intercambio aniónico se identificaron tres fracciones con actividad proteolítica. Usualmente, el método de precipitación por punto isoeléctrico resulta útil para aislar proteínas a partir de subproductos provenientes de la molienda de semillas, generalmente leguminosas (Shrestha *et al.*, 2021; Alonso-Miravalles *et al.*, 2019; Boye *et al.*, 2010). Cuando se utiliza para separar una mezcla de proteasas cuyos puntos isoeléctricos se encuentran cercanos entre sí, como es el caso de *B. serra*, aunque se utilice el pH exacto en el cual la solubilidad de la proteína de interés es mínimo, suelen precipitar proteínas con diferente pI, por lo que resulta un método poco eficiente, sin embargo puede ser considerado como una etapa preliminar de purificación ya que permite separar las fracciones de pI ácido y alcalino.

Por otra parte, mediante cromatografía de exclusión molecular se logró separar una fracción activa (RT=2,8-8,8 min) del EC, de otra inactiva (RT=8,8-15,8 min), por lo que éste resulta ser un buen método para ser utilizado en una primera etapa de purificación, como paso previo a otros métodos cromatográficos.

Utilizando una columna de intercambio aniónico a pH 8,9 se logró retener las cinco proteínas ácidas presentes en los extractos de *B. serra*, mientras que a pH 6 se logró excluir de la columna aquellas de pI 6, 5,2 y 5, mejorando la *performance* del esquema para retener las proteasas de pI más ácido. Así, mediante IEF se observó en una fracción una banda única de pI menor a 3,5 a la cual se le determinó la huella peptídica por espectrometría de masas. Los valores de m/z obtenidos experimentalmente fueron contrastados con los valores de m/z correspondientes a la digestión trípica teórica de otras proteasas de bromeliáceas ya secuenciadas. El análisis mediante el software FindPept permitió determinar el porcentaje de cobertura de varias secuencias amino terminales y secuencias completas de peptidasas cisteínicas de bromeliáceas y de especies de otras familias. Se obtuvieron coberturas mayores al 40 % para los extremos amino terminales de seis peptidasas de bromeliáceas, mientras que cuando se contrastó con secuencias completas de proteasas de la misma familia se encontraron coincidencias menores al 15 %.

El esquema cromatográfico obtenido posibilitó la purificación de una de las proteasas de frutos de *B. serra*, lo que permitirá a futuro la caracterización cinética de la enzima, aportando al estudio del sistema proteolítico de esta especie. En este capítulo se describen dos métodos sencillos para obtener una muestra enriquecida en las proteínas de interés, por precipitación isoeléctrica se logra separar la fracción de pI menor a 6 y mediante un paso de exclusión molecular se logra obtener la fracción activa del extracto. Dichas fracciones pueden ser utilizadas para continuar el esquema de purificación por intercambio aniónico o catiónico para separar las peptidasas de pI ácido o alcalino, respectivamente, teniendo en cuenta que cuando la muestra se deja interactuar unos pocos minutos con la resina, aumenta la retención de las proteínas en la misma, lo que mejora la eficiencia del método. Si se proyecta evaluar su uso para aplicaciones en biomedicina, los esquemas obtenidos podrían ser el punto de partida para obtener las fracciones puras. Sin embargo, su utilización como fracción pura para su uso en la industria alimentaria resulta poco conveniente ya que el esquema de purificación alcanzado presenta un bajo rendimiento, lo que se ve reflejado en un alto costo; en tal caso, la utilización de los extractos crudos o parcialmente purificados representan la opción más adecuada.

III.5 Bibliografía

Adams, C. W. M., & Tuqan, N. 1. (1961). The histochemical demonstration of protease by a gelatin-silver film substrate. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 9(5), 469-472.

Alonso-Miravalles, L., Jeske, S., Bez, J., Detzel, A., Busch, M., Krueger, M., ... & Arendt, E. K. (2019). Membrane filtration and isoelectric precipitation technological approaches for the preparation of novel, functional and sustainable protein isolate from lentils. *European Food Research and Technology*, 245, 1855-1869.

Anton, A. M. & Zuloaga, F. O. (directores), Flora Argentina. Géneros y especies de la familia Bromeliaceae, recuperado el 11 de febrero de 2023. <<http://www.floraargentina.edu.ar>>.

Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537-546.

Bruno, M. A., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & López, L. M. (2003). Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Journal of protein chemistry*, 22(2), 127-134.

Bruno, M. A., Trejo, S. A., Avilés, F. X., Caffini, N. O., & López, L. M. I. (2011). Cloning, sequencing, and identification using proteomic tools of a protease from *Bromelia hieronymi* Mez. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165, 583-593.

Bruno, M. A., Trejo, S. A., Aviles, X. F., Caffini, N. O., & Lopez, L. M. (2006). Isolation and characterization of hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *The Protein Journal*, 25(3), 224-231.

Bruno, M. A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., & 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), 426-433.

Cabral, H., Leopoldino, A. M., Tajara, E. H., Greene, L. J., Faça, V. M., Mateus, R. P., ... & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2006). Preliminary functional characterization, cloning and primary sequence of Fastuosain, a cysteine peptidase isolated from fruits of *Bromelia fastuosa*. *Protein and peptide letters*, 13(1), 83-89.

Caffini, N. O., Natalucci, C. L., Priolo, N. S., & Buttazoni, M. S. (1988). Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrónica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb. *Acta farmacéutica bonaerense*, 7, 9-14.

Cortés-Vázquez, M. I., Muñoz-Sánchez, J. L. & Briones-Martínez, R. (2008). Substrate specificity of a cationic peptidase from *Bromelia hemisphaerica* L. *Natural Product Communications*, 3(3), 1934578X0800300309.

Fratello, B. (1968). Enhanced interpretation of tissue protease activity by use of photographic color film as a substrate. *Stain Technology*, 43(3), 125-128.

Glatz, C. E. (1990). Precipitation. *Separation processes in biotechnology*, 329-356.

Gómez Herrera, M. D., Luaces, P. A., Liggieri, C., Bruno, M., & Avanza, M. V. (2022). Proteolytic characterization of a novel enzymatic extract from *Bromelia serra* leaves. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94.

Hong, P., Koza, S., & Bouvier, E. S. (2012). A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 35(20), 2923-2950.

Janson, J. C. (Ed.). (2011). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*. John Wiley & Sons.

Karlsson, E., Rydén, L., & Brewer, J. O. H. N. (1998). Ion exchange chromatography. In *Protein purification* (pp. 145-205). Wiley-VCH, New York.

Lee, K. L., Albee, K. L., Bernasconi, R. J., & Edmunds, T. (1997). Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. *Biochemical Journal*, 327(1), 199-202.

Liu, S., Li, Z., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., & Cong, H. (2020). Recent advances on protein separation and purification methods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284, 102254.

López, L. M. I.; Lazza, C. M.; Llerena Suster, C. R.; Torres, M. J.; Obregón, W. D. (2009). Estrategias de purificación de proteasas en N. O. Caffini (Ed.), *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales* (pp. 151–162). Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTED

López, L. M., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D., & Caffini, N. O. (2000). Purification and characterization of macrodonta I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodonta* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expression and purification*, 18(2), 133-140.

Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L. M., & Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y repliegamiento de proteínas. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(3), 415-429.

Meza-Espinoza, L., de los Ángeles Vivar-Vera, M., de Lourdes García-Magaña, M., Sáyago-Ayerdi, S. G., Chacón-López, A., Becerrea-Verdín, E. M., & Montalvo-González, E. (2018). Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from *Bromelia karatas* fruit and compared with *Bromelia pinguin* proteases. *Food science and biotechnology*, 27, 509-517.

Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Navarrete, E. L. C., Mazorra-Manzano, M. Á., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V. A., & Salazar-Leyva, J. A. (2017). Partial characterization of the proteolytic properties of an enzymatic extract from "Aguama" *Bromelia pinguin* L. fruit grown in Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 181-196.

Muta E, Okamoto Y, Ota S (1994) DDBJ, Accession D38531, (Direct Submission)

Napper, A. D., Bennett, S. P., Borowski, M., Holdridge, M. B., Leonard, M. J., Rogers, E. E., ... & Shames, S. L. (1994). Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochemical Journal*, 301(3), 727-735.

Pardo, M. F., López, L. M., Canals, F., Avilés, F. X., Natalucci, C. L., & Caffini, N. O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3795-3800.

Payrol, J. A., Obregón, W. D., Trejo, S. A., & Caffini, N. O. (2008). Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *The Protein Journal*, 27, 88-96.

Ramli, A. N. M., Manas, N. H. A., Hamid, A. A. A., Hamid, H. A., & Illias, R. M. (2018). Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from *Ananas comosus*. *Food chemistry*, 266, 183-191.

Ramos, M. V., Araújo, E. S., Jucá, T. L., Monteiro-Moreira, A. C. O., Vasconcelos, I. M., Moreira, R. A., ... & Moreno, F. B. (2013). New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 211-219.

Ritonja, A., Buttle, D. J., Rawlings, N. D., Turk, V., & Barrett, A. J. (1989). Papaya proteinase IV amino acid sequence. *FEBS letters*, 258(1), 109-112.

Shrestha, S., van't Hag, L., Haritos, V. S., & Dhital, S. (2021). Lupin proteins: Structure, isolation and application. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 928-939.

Sironi, E., Sessa, F., & Duranti, M. (2005). A simple procedure of lupin seed protein fractionation for selective food applications. *European Food Research and Technology*, 221, 145-150.

Vallés, D., & Cantera, A. M. (2018). Antiacanthain A: new proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *International journal of biological macromolecules*, 113, 916-923.

Vallés, D., Bruno, M., López, L. M., Caffini, N. O., & Cantera, A. M. B. (2008). Granulosain I, a cysteine protease isolated from ripe fruits of *Solanum granuloso-leprosum* (Solanaceae). *The Protein Journal*, 27, 267-275.

Capítulo IV

LIBERACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE PROTEÍNAS
ALIMENTARIAS

En este capítulo se abordan los objetivos N° 2, 3 y 4, en cuanto a la utilización de preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de bromelias para hidrolizar proteínas alimentarias, la determinación de la presencia de péptidos antioxidantes e inhibitorios de la ECA como potenciales antihipertensivos en dichos hidrolizados y su posterior fraccionamiento, caracterización y secuenciamiento.

IV.1 Introducción

IV.1.1 Hidrolizados de proteínas alimentarias

Las proteínas alimentarias, además de constituir una de las principales fuentes de nutrientes, pueden contener péptidos encriptados en su secuencia original, los cuales pueden liberarse por la acción de enzimas agregadas para tal fin, durante el procesamiento del alimento debido a las propias enzimas de las materias primas, o a partir de la fermentación microbiana. Dichos fragmentos proteicos muchas veces ejercen efectos positivos para la salud humana, se han reportado péptidos reguladores de la presión sanguínea, antimicrobianos, inmunomoduladores, antioxidantes, entre otros (Chakrabarti *et al.*, 2018). A estos fragmentos proteicos con actividades biológicas específicas se los denomina **péptidos bioactivos** y son ampliamente estudiados para su aplicación en diferentes áreas de la salud. Por ejemplo, las proteínas de la leche presentan una amplia gama de secuencias que contienen péptidos agonistas y antagonistas opioides, péptidos hipotensores potenciales que inhiben la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), péptidos quelantes de metales, inmunomoduladores, antibacterianos y antitrombóticos (Sánchez-Vega & Sepúlveda-Ahumada, 2020), que se resumen en la **Tabla IV.1**. Por otra parte, existen otros beneficios que resultan de la hidrólisis de proteínas alimentarias y están relacionados con el mejoramiento de la digestibilidad, la modificación de la textura o el sabor, los cambios en las propiedades físicas (solubilidad, viscosidad, etc.) y la reducción de la alergenicidad (Tavano, 2013; D'Auria *et al.*, 2021).

Tabla IV.1. Péptidos bioactivos derivados de proteínas de la leche.

Actividad biológica	Péptido	Proteína precursora	Referencias
Agonista opioide	β -casomorfinas β -lactorfinas	β -caseína β -LG	Sienkiewicz-Szłapka <i>et al.</i> , 2009 Asledottir <i>et al.</i> , 2017 Nguyen <i>et al.</i> , 2015; 2019 Yoshikawa, 2015
Antagonista opioide	Casoxinas Lactoferroxinas	κ -caseína Lactoferrina	Sienkiewicz-Szłapka <i>et al.</i> , 2009
Inhibidor de la ECA	Lactokininas α -lactorfinas	β -LG α -LA	Maes <i>et al.</i> , 2004 Nurminen <i>et al.</i> , 2000
Inmunomodulador	Inmunopéptidos β -casomorfinas Fosfopéptido	β -caseína β -caseína Caseínas	Jiehui <i>et al.</i> , 2014 Hag <i>et al.</i> , 2014 Bajali Raja <i>et al.</i> , 2010
Antimicrobiano	Caseidina Isracidina	β -caseína α_{S1} -caseína	Birkemo <i>et al.</i> , 2009
Antitrombótico	Casoplatelina Casopiastrina	κ -caseína κ -caseína	Korish <i>et al.</i> , 2020 Guzmán-Rodríguez <i>et al.</i> , 2019
Quelante de metales	Quelante de hierro	Caseína β -LG	Miao <i>et al.</i> , 2019 Athira <i>et al.</i> , 2021

IV.1.1 Sustratos proteicos

IV.1.1.1 Aislado proteico de soja

El aislado proteico de soja (*Glycine max* L. Merr.) está compuesto principalmente por 4 proteínas mayoritarias, las cuales han sido caracterizadas como 2S, 7S, 11S, y 15S de acuerdo con sus coeficientes de sedimentación, luego de centrifugar a alta velocidad. Las más abundantes son la β -conglucina (7S) y la glicina (11S), representando aproximadamente el 70 % de la proteína cruda. La β -conglucina es una glicoproteína formada por tres subunidades: α (72 kDa), α' (76 kDa), y β (53 kDa), en cambio, la glicina es una proteína hexamérica, compuesta por cinco subunidades diferentes, cada una de las cuales constituye un polipéptido ácido (A) unido a un polipéptido básico (B) mediante un puente disulfuro (**Figura IV.1**). Las subunidades AB forman cilindros hexagonales (Zheng *et al.*, 2022).

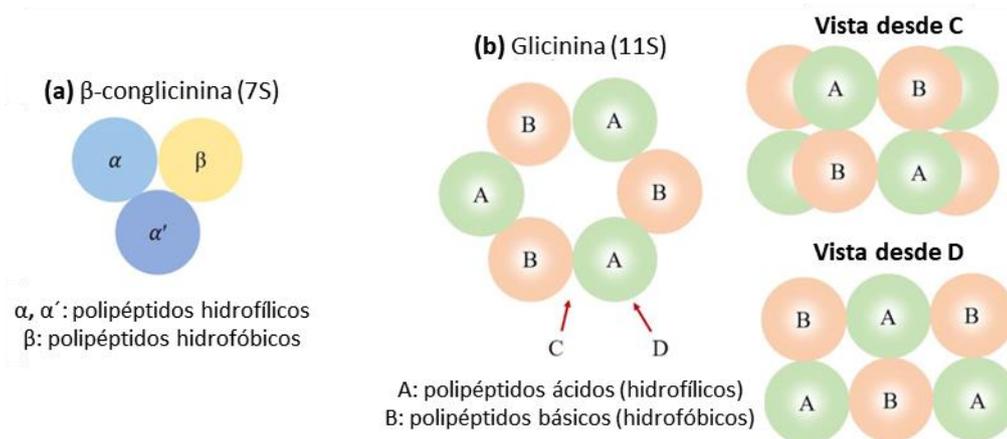


Figura IV.1. Esquematización de las estructuras formadas por las proteínas mayoritarias de la soja. Tomado de Zheng *et al.* (2022).

IV.1.1.2 Proteínas de leche bovina

Las proteínas de la leche de vaca (*Bos taurus*) pueden clasificarse en dos grandes grupos: caseínas y proteínas de lactosuero. Las caseínas constituyen el 80 % del contenido proteico de la leche bovina y se definen como la fracción proteica que precipita cuando la leche se acidifica a pH=4,6. Son sintetizadas en la glándula mamaria, se denominan α -, β - y κ - caseínas y sus pesos moleculares aproximados son 23-23,6 kDa para las α - y β - caseínas, y 19 kDa para la κ - caseína. No poseen una estructura bien definida por lo que su secuencia aminoacídica no es tan crítica para ejercer su función si se compara con otras proteínas globulares. Como consecuencia de esto, las caseínas constituyen una de las familias de proteínas de mamíferos más divergentes en sentido evolutivo, esto implica que, al existir diferentes variantes genéticas, los pesos moleculares también van a fluctuar en función de su composición aminoacídica. Debido a su naturaleza anfifílica y la presencia de grupos fosfato esterificados en algunos residuos de serina, las caseínas interactúan entre sí y con el fosfato cálcico para formar grandes complejos esféricos denominados micelas. Disminuyendo las fuerzas repulsivas que mantienen la estabilidad de estas partículas, se puede inducir la formación de agregados proteicos. Esto se logra, por ejemplo, por acción de la quimosina en presencia de calcio o por acidificación (Sánchez-Vega & Sepúlveda-Ahumada, 2020; Treweek, 2012; Ikonen & Ojala, 1995; Corredig, 2019).

Las proteínas que no precipitan cuando la leche se acidifica a pH=4,6 se denominan proteínas de lactosuero. Las mismas pueden ser de síntesis mamaria, como la α -lactoalbúmina (α -LA), la β -lactoglobulina (β -LG) y la lactoferrina, o bien de procedencia sanguínea, como la seroalbúmina (SAB) y las inmunoglobulinas. Las propiedades funcionales del lactosuero vienen dadas por las de sus dos principales proteínas: α -LA y la β -LG (Correa *et al.*, 2010).

La α -LA es la segunda proteína mayoritaria del lactosuero bovino, encontrándose en una concentración de entre 1 y 1,5 mg/ml. Está formada por una cadena polipeptídica única de 123 aminoácidos, cuyo peso molecular es de unos 14,2 kDa. Posee una estructura terciaria globular y muy compacta que es estabilizada por cuatro puentes disulfuro.

La β -LG, se encuentra en el lactosuero bovino en concentraciones de 2 a 4 mg/ml. Está formada por una cadena de 162 aminoácidos y su peso molecular es de 18,4 kDa. Al pH de la leche, la β -LG de los rumiantes forma dímeros con los monómeros unidos de manera no covalente. La estructura terciaria de los monómeros se mantiene gracias a dos puentes disulfuro. También posee un grupo tiol libre correspondiente a la cisteína con posición 121 en la secuencia, que es muy importante en la asociación con otras moléculas, especialmente con la k-caseína, lo cual tiene una gran influencia en la coagulación de la leche inducida por la quimosina (Gil Zamora, 2007).

La albúmina de la leche es la misma que se encuentra en la sangre ya que procede de ella. Es una proteína formada por una cadena de 528 aminoácidos, cuyo peso molecular es de 66,382 kDa. En el lactosuero se encuentra en una concentración de alrededor de 0,4 mg/ml.

Las inmunoglobulinas forman parte del sistema de defensa. La estructura básica, en forma de "Y", está constituida por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas glicosiladas, unidas por puentes disulfuro. En la leche bovina, aproximadamente el 80 % de las inmunoglobulinas son IgG. La concentración de estas proteínas es de entre 0,4 y 1 mg/ml (Calvo, 2009).

La lactoferrina es una proteína de cadena sencilla con una masa molecular de alrededor de 80 kDa y tiene un papel activo en la fijación del hierro. La proteína contiene enlaces disulfuro intramoleculares, pero no grupos sulfhidrilo libres. La cadena polipeptídica de lactoferrina está formada por dos lóbulos globulares unidos por una α -hélice sensible al ataque proteolítico (Sánchez-Vega & Sepúlveda-Ahumada, 2020).

IV.1.2 Péptidos bioactivos

Como se mencionó anteriormente, los péptidos bioactivos son aquellos fragmentos proteicos que ejercen un efecto positivo sobre las funciones corporales y la salud humana (Kitts & Weiler, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2018). Las enzimas más utilizadas para la obtención de péptidos mediante hidrólisis son la pepsina, quimotripsina y principalmente la tripsina ya que pueden simular el efecto de la digestión gastrointestinal en la liberación de péptidos a partir de los alimentos. Otras enzimas estudiadas han sido la alcalasa y la termolisina. Si bien la liberación de

péptidos ocurre naturalmente durante el proceso digestivo, la generación de péptidos utilizando otras enzimas diferentes pueden resultar en la producción de péptidos con mayor espectro de acción (Tavano, 2013). Dentro de las enzimas vegetales, las más utilizadas para la obtención de péptidos bioactivos son las que poseen cisteína en su sitio activo como la papaína, la ficina y la bromelina, que se obtienen a partir de los frutos, del látex, de las hojas o de los tallos de la papaya (*Carica papaya*), de la higuera silvestre (*Ficus insipida*) y de la piña (*A. comosus*) (Mazorra-Manzano, 2017).

Los péptidos bioactivos generalmente poseen secuencias entre 3 y 20 aminoácidos (Shahidi & Zhong, 2008), aunque los hay también más pequeños como es el caso del dipéptido Val-Tyr que posee actividad inhibitoria de la ECA (Matsui *et al.*, 2002), o la lunasina, un péptido formado por 43 aminoácidos que posee actividad anticancerígena (Alves de Souza *et al.*, 2022). Han sido reportadas numerosas actividades biológicas atribuidas a péptidos, incluyendo actividad antihipertensiva, antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana y opioide, entre otras (Sánchez & Vázquez, 2017).

En el desarrollo de este trabajo de tesis el enfoque se realizó sobre los péptidos con actividad antioxidante y los antihipertensivos, más específicamente los que son capaces de inhibir a la ECA.

IV.1.2.1 Actividad antioxidante

Las especies reactivas del oxígeno “ROS” (*reactive oxygen species*) inician reacciones que dañan moléculas biológicas pudiendo provocar consecuentemente diversas patologías. Son generadas por el organismo o pueden ser incorporadas de fuentes exógenas. Por otra parte, causan deterioro en alimentos durante su procesamiento y almacenamiento, especialmente a través de la oxidación de lípidos. Algunos antioxidantes sintéticos como el BHT (butilhidroxitolueno) y el BHA (butilhidroxianisol) son empleados en la industria alimentaria, pero en la actualidad su uso está siendo cuestionado porque podrían provocar daño hepático. Actualmente numerosas investigaciones están direccionadas a encontrar antioxidantes de origen vegetal o productos que contengan péptidos antioxidantes liberados por hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias (Carvajal Carvajal, 2019).

Las propiedades antioxidantes de los péptidos están relacionadas con su composición aminoacídica, estructura, e hidrofobicidad. En relación a la composición, los aminoácidos Tyr, Trp, Met, Lys y Cys han sido reportados por su capacidad de reducir el ion férrico (III) a ferroso (II) y por quelar a los iones ferroso (II) y cúprico (II); los aminoácidos aromáticos pueden sustraer

radicales por donación de protones; por otro lado, la histidina (aminoácido básico) puede ser responsable de actividad antioxidante por su capacidad para donar protones y por sustraer radicales mediante su acción quelante o por entrapamiento de lípidos. El grupo sulfhidrilo de la cisteína posee una acción antioxidante debido a su interacción directa con radicales (Sarmadi & Ismail, 2010; Reyes Jara *et al.*, 2018).

IV.1.2.2 Actividad antihipertensiva

La hipertensión arterial es una enfermedad que disminuye la calidad y expectativa de vida. Dentro de los mecanismos fisiológicos de la hipertensión, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es uno de los más estudiados, siendo la renina y la ECA las principales enzimas involucradas en su regulación. Diferentes drogas sintéticas antihipertensivas han sido reportadas por causar efectos secundarios como mareos, disgeusia, dolor de cabeza, angioedema y tos. Es por esto que las investigaciones recientes se han volcado hacia la búsqueda de péptidos antihipertensivos provenientes de alimentos. Se han estudiado péptidos que actúan sobre el SRAA, regulando la presión arterial, como por ejemplo el péptido ALPMHIR obtenido a partir de la hidrólisis trípica de la β -LG (Ferreira *et al.*, 2007; Daliri *et al.*, 2017).

IV.2 Materiales y métodos

IV.2.1 Preparación de los hidrolizados

Se obtuvieron diferentes hidrolizados proteicos utilizando tres extractos enzimáticos obtenidos a partir de frutos de bromelias autóctonas para hidrolizar tres sustratos correspondientes a proteínas alimentarias. Todos los hidrolizados fueron preparados utilizando una proporción enzima sustrato de 1 a 9 (v/v).

IV.2.1.1 Preparación de las soluciones enzimáticas

Se emplearon los extractos Bh A, Bh B y 2.Bs-i parcialmente purificados con 4 volúmenes de etanol resuspendidos en buffer de extracción: buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,6 con cisteína 5 mM o buffer citrato/fosfato de sodio 0,1-0,2 M de pH 5,0 con cisteína 5 mM, para los extractos de *B. hieronymi* y *B. serra*, respectivamente.

IV.2.1.2 Preparación de los sustratos proteicos

IV.2.1.2.1 Aislado proteico de soja (SOJ)

Se pesaron 5 g de harina de soja desgrasada activa (Bunge, Buenos Aires, Argentina), a los cuales se les adicionaron 50 ml de agua destilada para luego llevar a pH 8,0 con NaOH 2N. Se agitó la preparación durante 2 h a temperatura ambiente y luego se centrifugó a $12800 \times g$ durante 15 min a 20 °C. El precipitado se descartó y el sobrenadante fue llevado a pH 4,5 con HCl 2N. Se realizó un nuevo paso de centrifugación en iguales condiciones, descartando en este caso el sobrenadante. El precipitado fue suspendido en 10 ml de AD y llevado nuevamente a pH 8,0. La suspensión obtenida fue conservada a -20 °C hasta su uso (Ortiz & Wagner, 2002).

IV.2.1.2.2 Lactosuero bovino (LAC)

Se prepararon 100 ml de leche descremada ("San Regim", SanCor) al 12 % p/v en CaCl_2 10 mM (pH~6), la cual fue coagulada con 45 μl de quimosina (2080 IMCU/g) a 45 °C. Una vez lograda la coagulación de la leche (~30 min), se cortó la cuajada en pequeños trozos empleando una espátula, se colocó en tubos Falcon y se centrifugó durante 30 min a $16000 \times g$ y 10 °C. Los sobrenadantes fueron reunidos y almacenados a -20 °C hasta su uso (Bertucci *et al.*, 2015).

IV.2.1.2.3 Caseína bovina (CAS)

Se pesaron 1,25 g de caseína bovina (Sigma), los cuales se suspendieron en 100 ml de buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,4 o buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5 para los hidrolizados preparados

con *B. serra* o *B. hieronymi*, respectivamente. La suspensión obtenida fue homogeneizada, calentada a ebullición durante 20 min y por último filtrada por papel en caliente.

IV.2.1.3 Determinación de las condiciones óptimas de reacción

Para determinar las condiciones óptimas de reacción, los hidrolizados fueron incubados a diferentes temperaturas (45 y 55 °C), durante diferentes lapsos de tiempo (5, 10, 30, 60, 90 y 180 min). La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en un incubador orbital termostatzado (Gyromax, Amerex Instruments, USA) con agitación constante a 200 rpm. La reacción fue detenida por shock térmico (incubación a 100 °C) durante 5 min en el caso de los hidrolizados obtenidos con enzimas de *B. serra* (**sección II.3.2.2.2**) y durante 10 min en el caso de *B. hieronymi* (Bertucci *et al.*, 2015).

IV.2.1.4 Determinación de la concentración proteica por los métodos de Lowry, Kjeldahl y/o Hull

IV.2.1.4.1 Método de Lowry

Para medir la concentración de proteínas de los hidrolizados de soja y caseína se empleó el método de Lowry (Peterson, 1979), el cual se basa tanto en la reacción de Biuret, como en la reacción de Folin-Ciocalteu. Si bien los mecanismos de reacción no están bien dilucidados, se sabe que los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el cobre en condiciones alcalinas para producir Cu^+ , el cual reacciona con el reactivo de Folin, En este último paso, el fosfomolibdotungstato es reducido a azul de heteropolibdeno por la oxidación de los aminoácidos aromáticos catalizada por cobre. Las reacciones dan como resultado un color azul fuerte, que depende en parte del contenido de tirosina y triptófano, y se mide a 745-750 nm. El método es sensible hasta aproximadamente 0,01 mg de proteína/ml y es utilizado en soluciones con concentraciones en el rango de 0,01 a 1,0 mg/ml de proteína (Waterborg, 2009).

Este método presenta interferencias con los siguientes compuestos: fenoles, excepto nitrofenoles y otras sustancias reductoras (mercaptoetanol, ditiotreitól, etc), por reducción del reactivo de Folin; glicina, por disminuir la intensidad del color desarrollado; sustancias o buffers que acidifican el medio; y con agentes quelantes del cobre. La sensibilidad se da en el rango de 0,05-0,4 mg/ml.

Para llevarlo a cabo se emplearon los siguientes reactivos:

- Na_2CO_3 2 % en NaOH 0.1N: Solución A
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1 %
- Tartrato de Na y K 2 %
- Solución de Folin: Reactivo de Folin Ciocalteu diluido con agua destilada 1:1

En el momento de la determinación se mezclaron volúmenes iguales de la solución de CuSO_4 y de la del tartrato. A esta mezcla se la denominó solución B. Se añadió 1 ml de la solución B a 50 ml de la solución A, para obtener la solución A+B.

La muestra fue diluida para entrar en el rango de concentración de la curva de calibración, se colocó en tubo o microplaca el volumen correspondiente de muestra y se le adicionó la solución A+B. Luego de agitar, se dejó reposar 10 min. Pasado este tiempo se agregó el reactivo de Folin diluido. Se agitó, se dejó reposar 30 min y se leyó la absorbancia a 750 nm. Los volúmenes empleados para la técnica realizada en tubo y en microplaca se detallan en la **Tabla IV.2**.

Se realizó una curva de calibración empleando seroalbúmina bovina (1 mg/ml) como patrón. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla IV.2. Volúmenes de reacción para el método de Lowry

	Tubo	Microplaca
Muestra	0,2 ml	0,031ml
Reactivo A+B	1ml	0,154 ml
Solución de Folin (1:1)	0,1 ml	0,015 ml
Volumen final	1,3 ml	0,2 ml

IV.2.1.4.2 Método de Kjeldahl

En el caso de muestras obtenidas a partir de lactosuero, la determinación de concentración de proteínas se realizó mediante el método de microKjeldahl debido a que el método de Lowry posee interferencias con azúcares reductores como es el caso de la lactosa presente en dicho sustrato. El ensayo colorimétrico de Nkonge & Ballance (1982) está basado en la técnica de Kjeldahl clásica, donde en primer lugar se realiza la digestión de la muestra en medio ácido y, luego de un paso de destilación, se titula el nitrógeno liberado durante la hidrólisis como amonio.

Las determinaciones se realizaron por servicio a terceros en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, UNLP).

IV.2.1.4.3 Método de Hull

Alternativamente al método de Kjeldahl, se utilizó un ensayo basado en el método de Hull (1947) para determinar la concentración de proteínas en las muestras obtenidas a partir de lactosuero. Esta técnica se fundamenta en la reacción con grupos aromáticos de aminoácidos (Phe, Tyr y Trp). Posee interferencia con los fenoles, por lo que no se puede usar para extractos enzimáticos vegetales como, por ejemplo, para medir la concentración proteica del control de enzimas de hidrolizados.

Para el desarrollo del método se utilizaron dos reactivos:

Reactivo 1: se homogeneizaron 1 volumen de Folin y 2 volúmenes de agua, se cubrió con papel aluminio para mantener fuera del alcance de la luz hasta su uso.

Reactivo 2: se preparó Na_2CO_3 al 15 % y se homogeneizó con hexametáfosfato de sodio al 25 % en agua destilada.

El método puede realizarse tanto en tubo de ensayo como en placa multipocillo. El procedimiento y los volúmenes utilizados se detallan en la **Tabla IV.3**.

La concentración proteica fue cuantificada utilizando una curva de calibración de seroalbúmina bovina, de igual manera que se realiza en el método de Bradford (**Capítulo II, sección 2.4**). Para obtener valores de concentración proteica dentro del rango de la curva de calibración, las muestras fueron diluídas 1/10 con agua destilada.

Tabla IV.3. Ensayo de Hull.

	Método en tubo de ensayo	Método en placa multipocillo
Muestra	0,5 ml	110 ul
Reactivo 2	1 ml	70 ul
Tiempo de espera: 5 min		
Reactivo 1	0,3 ml	30 ul
Volumen final	1,8 ml	210 ul
Tiempo de espera: 5 min		
Lectura de la A_{650}		

IV.2.2 Seguimiento de los productos de hidrólisis

IV.2.2.1 Determinación del grado de hidrólisis

IV.2.2.1.1 Método del ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS)

Se empleó el método del ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS), basado en la reacción de este compuesto con los grupos amino primarios que quedan expuestos al hidrolizar los enlaces peptídicos (Adler-Nissen, 1979).

Se analizaron todos los hidrolizados obtenidos a partir de los tres sustratos mencionados y los extractos parcialmente purificados de *B. serra* y *B. hieronymi* (PER del 2.Bs-i, PER del Bh A y PER del Bh B), todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Las muestras (hidrolizados de diferentes tiempos y diferentes temperaturas) se diluyeron en buffer A (Na_2HPO_4 0,2125 M con SDS 1 %, llevado a pH 8,2 con HCl conc.) de manera que su concentración fuera del orden de 1 mg/ml. Se realizó una dilución 1 en 10 para los hidrolizados de caseína, 1 en 20 para lactosuero y 1 en 5 para soja. Se empleó una curva de calibración de leucina ya que presenta un grupo amino libre. Para ello se partió de una dilución 1:10 de un stock de leucina 45 mM, a partir de la cual se prepararon las soluciones diluidas correspondientes a los puntos de la curva de calibración que se detalla en la **Tabla IV.4**.

Tabla IV.4 Curva de calibración de leucina para el ensayo del TNBS

Concentración de leucina (mM)	Volumen de sc. de leucina 4,5 mM (μl)	Volumen de buffer A (μl)
0	0	160
0,225	8	152
0,45	16	144
0,9	32	128
1,125	40	120
1,5	53,6	106,4
2,25	80	80

Para llevar a cabo el ensayo se calentaron las muestras y los patrones de leucina a 75 °C durante 15 min en un baño seco, luego se colocaron alícuotas de 40 μl de la muestra tratada o de

patrón en tubos Khan de vidrio y se adicionaron 320 µl de reactivo TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfónico diluido 1 en 200 con buffer A). Los tubos se colocaron en un baño termostático a 50 °C y se incubaron durante 1 h. Posteriormente se adicionaron 640 µl de HCl 0,1 N en cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Todos los pasos se realizaron en oscuridad, empleando papel aluminio para cubrir los tubos. Una vez finalizado el proceso se midió la absorbancia a 340 nm en cubeta de cuarzo (NH₂t). Se empleó la siguiente fórmula para calcular el grado de hidrólisis (GH%):

$$GH\% = 100 \times (NH_{2t} - NH_{2t=0}) / (NH_{2\infty} - NH_{2t=0})$$

En donde:

$$NH_{2\infty} = \left(\frac{1}{PM_{promedio\ de\ aa}} \right) \times (1 + f_{lys}) \times conc.\ proteica \times 1000$$

PM_{promedio de aa}= 130 g/mol

f_{lys}= proporción de lisina en las proteínas, 1/16 para soja y 1/15 para caseína y lactosuero.

Concentración proteica= concentración de proteínas en la muestra, determinada por el método de Lowry empleando una curva de calibración de leucina o por los métodos de Kjeldahl o Hull en el caso de los hidrolizados de lactosuero, ya que la lactosa que contiene interfiere en el método de Lowry.

IV.2.2.1.2 Método OPA (O-ftaldehído)

Además de utilizar el método del TNBS, se realizó la determinación del grado de hidrólisis por el método desarrollado por Church *et al.* (1985). El ensayo está basado en la reacción del O-ftaldehído (OPA) con los grupos amino liberados durante la hidrólisis del sustrato proteico. Este método permite obtener resultados con una sensibilidad similar a la del método del TNBS con la ventaja de ser más rápido y sencillo.

Para llevarlo a cabo se colocaron 10 µl de muestra o patrón y 190 µl de solución de OPA (**Tabla IV.5**) en una placa multipocillo, obteniendo un volumen final de 200 µl, y se midió la absorbancia a 340 nm, previa agitación. Todas las medidas se realizaron por triplicado utilizando un lector de placas (Infinite Pro M200-TECAN).

Para determinar el grado de hidrólisis porcentual (GH%) se utilizó una curva de calibración de leucina, la cual fue preparada realizando diluciones seriadas (0-9 mM) a partir de una solución stock (45 mM, en A.D.)

El porcentaje de grado de hidrólisis fue calculado según la siguiente ecuación:

$$\text{GH\%} = (N_t - N_0) \times 100 / (N_\infty - N_0)$$

Donde, N: equivalentes de leucina a tiempo (t), a tiempo cero (0) y a tiempo infinito (∞), de la misma manera que para el método del TNBS.

Tabla IV.5. Solución de OPA

OPA	40 mg (disueltos en 1 ml de etanol)
Buffer borato 0,1 M - SDS 2 % p/v	25 ml
2-βmercaptoetanol	0,1 ml
A.D.	c.s.p. 50 ml

IV.2.2.2 Determinación de masas moleculares

IV.2.2.2.1 Electroforesis en geles de tricina (SDS-Tricina-PAGE)

Los perfiles proteicos y masas moleculares de todos los hidrolizados fueron determinados mediante electroforesis en geles con tricina, una técnica muy utilizada para separar proteínas y péptidos de bajo peso molecular ya que resuelve en el rango de 1 a 100 kDa, especialmente entre 5 y 20 kDa, sin la necesidad del uso de urea (Schägger & von Jagow, 1987).

Se analizaron todos los hidrolizados obtenidos a partir de los tres sustratos proteicos (CAS, LAC, SOJ) y los diferentes extractos enzimáticos (Bh A, Bh B y 2.Bs-i, precipitados con cuatro volúmenes de etanol y resuspendidos en buffer de extracción), en sus diferentes tiempos de reacción y diferentes temperaturas. La preparación de las muestras se realizó de igual manera que para el método sin tricina (**sección II.2.7**).

Tabla IV.6. Composición de los geles (volúmenes para 2 geles de 1,5 mm)

	Gel de Resolución 16 %T	Gel de Resolución 12 %T	Gel de Apilamiento
Acril-Bis 30:0,8	16 ml	8 ml	1,32 ml
Buffer del gel	10 ml	2,5 ml	2,48 ml
Temed	30 μ l	10 μ l	12 μ l
PSA 10 %	300 μ l	200 μ l	120 μ l
H ₂ O(d)	-	8,34 ml	6,2 ml

Se utilizó un sistema de dos geles, uno de apilamiento y uno de resolución, empleando diferentes %T según la procedencia de la muestra (12 %T para los hidrolizados de CAS y LAC, y 16 %T para los de SOJ). La composición tanto de los geles como del buffer del gel, se describen en las **Tablas IV.6 y IV.7.**

Tabla IV.7. Composición del buffer del gel

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

El desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo en una cuba Miniprotean III (Bio-Rad). Los buffers anódico y catódico (**Tabla IV.8**) se colocaron en los respectivos reservorios de manera que el buffer catódico cubra la parte superior del gel y que el buffer anódico alcance una altura suficiente como para permitir que todo el electrodo haga contacto con él. Una vez colocados los buffers, las muestras se aplicaron con pipeta (10 a 20 μ l).

La corrida electroforética se llevó a cabo en dos pasos sucesivos, una primera etapa de apilamiento "*stacking*" donde la intensidad de corriente fue de 30 V, y una segunda etapa de separación "*running*", a 100 V que se mantuvo constante hasta la finalización de la corrida, que se visualizó por la llegada del azul de bromofenol al borde inferior del gel.

Tabla IV.8. Composición de los buffers de corrida

	Anódico	Catódico
Tris	2,42 g	1,21 g
HCl 1M, c.s.p.	pH 8,9	-
Tricina	-	1,79 g
SDS	-	0,10 g
H ₂ O c.s.p.	100 ml	100 ml

Los geles fueron fijados durante 30 min con solución fijadora, teñidos con Coomassie Brilliant Blue G-250 durante 90 min y decolorados sucesivamente durante 15 min cada vez. Los valores de las masas moleculares fueron determinados por comparación con patrones proteicos multipéptidos y de bajo rango (Bio-Rad). La composición de las soluciones empleadas se detalla en la **Tabla IV.9**.

Tabla IV.9. Composición de las soluciones fijadora, colorante y decolorante.

	Sc. fijadora	Sc. colorante	Sc. decolorante
Metanol	400 ml	-	-
Ácido Acético	100 ml	100 ml	100 ml
Coomassie Blue G-250	-	0,25 g	-
H ₂ O c.s.p.	1000 ml	1000 ml	1

IV.2.2.2.2 Espectrometría de masas

Mediante espectrometría de masas se determinaron los valores de m/z de los péptidos presentes en el hidrolizado de lactosuero de 180 min obtenido con enzimas de *B. hieronymi*. El ensayo se realizó por servicio a terceros del Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masas (CEQUIBIEM, UBA).

Los valores de m/z identificados fueron analizados por medio de la herramienta bioinformática FindPept (www.expasy.org). El análisis efectuado por dicho software consiste en comparar y buscar coincidencias entre las posibles secuencias peptídicas obtenidas por digestión in silico de las proteínas del sustrato (tomadas de la base de datos UniProt) y los m/z experimentales.

IV.2.2.3 Determinación de actividades biológicas

Se realizó un *screening* de actividades biológicas, específicamente actividad antioxidante y actividad antihipertensiva (inhibitoria de la ECA). Los hidrolizados que presentaron mayor actividad biológica fueron seleccionados para continuar con la caracterización y fraccionamiento de los péptidos.

IV.2.3.1 Actividad antioxidante

Se midió la actividad antioxidante (AA) por el método del ABTS a los hidrolizados de todos los tiempos de hidrólisis obtenidos a partir de los tres sustratos.

El hidrolizado con características más promisorias fue seleccionado y caracterizado en función de su actividad antioxidante, utilizando los métodos del ABTS, ORAC y β -caroteno.

IV.2.3.1.1 ABTS

El método descrito por Re *et al.* (1999) permite cuantificar la capacidad antioxidante de una muestra en función a la capacidad de neutralizar al radical catiónico ABTS [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)].

Para preparar el reactivo se pesaron 0,029 g de ABTS (concentración final 7 mM), 0,005 g de persulfato de potasio, se suspendieron en 7,6 ml de AD y se homogeneizó. Se colocó en frasco color caramelo y se dejó a temperatura ambiente durante 16 h para garantizar la formación del radical catiónico ABTS \bullet +

Antes de ser utilizado, el reactivo fue diluido en buffer fosfatos: 0,005M, pH 7,4 hasta que la absorbancia a 734 nm fue de $0,7 \pm 0,02$. La reacción se llevó a cabo directamente sobre una placa multipocillo como se indica en la **Tabla IV.10**. El blanco (control negativo) consistió en reemplazar la muestra por el buffer fosfatos descrito anteriormente.

Alternativamente se utilizó una variante del método denominada "QUENCHER" (Serpen *et al.*, 2012). La mezcla de reacción consistió en 10 μ l de muestra más 1 ml de reactivo, se incubó durante 30 min a 25 °C y 232 rpm, luego los tubos se centrifugaron durante 15 min a 10.000 rpm, y se determinó la A_{734} nm de los sobrenadantes.

Se realizó una curva de calibración utilizando Trólox (0,05-0,85 mg/ml) como antioxidante de referencia. Todas las medidas se realizaron por triplicado o cuadruplicado.

Los resultados se expresaron como equivalentes de Trólox (mg/ml).

Tabla IV.10. Ensayo de ABTS: mezcla de reacción.

	Volumen (μ l)
Muestra/Patrón	2
Reactivo	200

Estabilización a 30 °C

Lectura de A_{734} nm luego de 10 min

IV.2.3.1.2 ORAC

Se utilizó el método ORAC (*oxygen radical absorbance capacity* o capacidad de absorción del radical oxígeno), modificado de Kim *et al.*, (2007) para determinar la capacidad antioxidante. La reacción comienza a 37 °C con la formación de los radicales que se generan por descomposición térmica de un azo-derivado, AAPH [2,2'-Azobis(2-metilpropionamida) dihidrocloruro]. En presencia de oxígeno, se generan radicales peroxilo reactivos, que pueden atacar tanto a moléculas sensor como la fluoresceína o reaccionar con antioxidantes. La competencia entre estas dos posibles reacciones constituye la base del ensayo ya que, en presencia de un antioxidante, la oxidación de la fluoresceína se retarda. A la reacción le sigue el registro de la fluorescencia a lo largo del tiempo y los resultados se calculan como el área total bajo las curvas de reacción para cada muestra de antioxidante menos el área en blanco de la reacción (sin antioxidante) para tener en cuenta el aumento del período de inducción (tiempo de retraso) y el grado total de inhibición, incluidas las reacciones secundarias, inducidas por los antioxidantes (Schaich, *et al.*, 2015).

Para llevar a cabo el ensayo, se preparó una mezcla de fluoresceína y AAPH. Se pesaron 0,4339 g de AAPH (concentración final 160 mM) y se suspendieron en 10 ml de buffer fosfatos 35 mM pH 7,8; asimismo se pesaron 0,0177 g de fluoresceína, se suspendieron en 1 ml del mismo buffer (53,3 mM) y antes de llevar a cabo el ensayo se llevó a una concentración final de trabajo de 53,3 nM.

Se procedió a realizar la mezcla de reacción directamente sobre la placa multipocillo utilizando los volúmenes que se detallan en la **Tabla IV.11**. El blanco de reacción consistió en reemplazar la muestra y el AAPH por buffer fosfatos. El ensayo se llevó a cabo a 37 °C en un lector de placas donde se tomaron medidas de fluorescencia (λ_{ex} : 485 nm y λ_{em} : 535 nm) durante 35 min. Se realizó una curva de calibración utilizando Trólox (0,19-6,25 mg/ml) como antioxidante de

referencia. La actividad antioxidante se expresó como equivalentes de Trólox (mg/ml). Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Tabla IV.11. Ensayo ORAC: mezcla de reacción.

	Volumen (μ l)
Fluoresceína	150
Muestra/Patrón	25
AAPH	25
Volumen final	200

IV.2.3.1.3 Inhibición del blanqueamiento del β -caroteno

Según Tepe *et. al* (2005), el método se fundamenta en la inhibición de la oxidación del β -caroteno en presencia de radicales peroxilo. En la mezcla de reacción se promueve la formación de radicales libres inducida por calor, que se forman por oxidación del ácido linoleico y producen el blanqueamiento del β -caroteno. La capacidad antioxidante de la muestra problema se evidencia mediante la inhibición de dicho blanqueamiento.

Para la preparación del reactivo se pesaron 1,5 mg de β -caroteno y se disolvieron en 5 ml de cloroformo. Luego se pesaron 80 mg de ácido linoleico (AL) y 800 mg de Tween 20 y se disolvieron con la solución de β -caroteno. Se emulsionó la mezcla, y se procedió a eliminar el cloroformo por evaporación (sobre baño de agua caliente, en campana extractora). Una vez evaporado el cloroformo, el producto secado fue disuelto en 200 ml de agua saturada con oxígeno.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo utilizando los volúmenes de muestra y reactivo que se muestran en la **Tabla IV.12**. Se realizó un control negativo, que consistió en reemplazar la muestra por AD, y un control positivo correspondiente al antioxidante de referencia BHT (1-50 mg/ml). En todos los casos se realizaron tres réplicas y los tubos se incubaron a 50 °C durante 30, 60, 90 y 120 min. La capacidad de las muestras para inhibir el blanqueamiento del β -caroteno se evidenció mediante el seguimiento de la absorbancia A_{470} , longitud de onda a la cual absorbe este compuesto.

Tabla IV.12. Ensayo de inhibición del blanqueamiento del β -caroteno: mezcla de reacción.

Reactivo (ml)	2,5
Muestra/Patrón (μ l)	100

IV.2.3.2 Actividad inhibitoria de la ECA

Se determinó la actividad antihipertensiva de todos los hidrolizados de 180 min por su capacidad de inhibir a la enzima convertidora de Angiotensina I (ECA) *in vitro*. Se utilizó la técnica detallada por Carmona *et al.* (2006), la cual se fundamenta en la determinación de la velocidad de aparición del producto de la hidrólisis del sustrato fluorogénico Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH.

El ensayo consistió en la incubación de la ECA con el sustrato fluorogénico (0,5 mg de Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH en 1 ml de DMSO) en presencia de las muestras correspondientes a los hidrolizados de 180 min y buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7,0 (NaCl 50 mM y ZnCl₂ 10 mM), como se detalla en la **Tabla IV.13**. La reacción se llevó a cabo en un lector de placas estabilizado a 37 °C, registrando el incremento de la fluorescencia (λ excitación: 320 nm; λ emisión: 420 nm) durante 60 min. Se realizó un control positivo empleando Captopril (1 mmol/l, en AD), y un control negativo (blanco de enzima) reemplazando la muestra o captopril por el buffer de reacción. Las determinaciones se realizaron por triplicado en todos los casos y el resultado se expresó como porcentaje de inhibición de la ECA I, considerando que el control negativo corresponde al 0 %.

Tabla IV.13. Ensayo de inhibición de la ECA

	Volumen (μ l)
Muestra/Captopril	25
Enzima	3
Sustrato	3
Buffer	269
Volumen final	300

IV.2.4 Purificación de los péptidos de interés

IV.2.4.1 Fraccionamiento con tubos Millipore

Se realizó un fraccionamiento del hidrolizado de lactosuero de 180 min obtenido con enzimas de *B. hieronymi* utilizando un tubo Millipore con tamaño de corte de 3 kDa ya que los péptidos inhibitorios de la ECA suelen poseer masas < 3 kDa. Para ello se centrifugaron las muestras a 6000 rpm en tubos Millipore. Se recuperó el filtrado y la fracción retenida por la membrana fue descartada.

IV.2.4.2 Separación cromatográfica

Con el objetivo de estudiar los perfiles peptídicos de los hidrolizados más promisorios se realizaron cromatografías líquidas utilizando un cromatógrafo Äkta purifier 10 (GE Healthcare).

IV.2.4.3 Exclusión molecular

Se utilizó una columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE), la cual fue previamente equilibrada con buffer fosfatos pH 6,0 0,01 M. Una vez inyectada la muestra (1 ml) se eluyó con el mismo buffer a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Las muestras fueron previamente centrifugadas para evitar la introducción de agregados en la columna. Se registró la intensidad (unidades arbitrarias) de las absorbancias a 280 y 215 nm correspondientes a la longitud de onda donde absorben el anillo aromático de los aminoácidos fenólicos y el enlace peptídico, respectivamente.

IV.2.4.4 Secuenciamiento de péptidos por fragmentación mediante espectrometría de masas (ESI-Orbitrap)

Las fracciones cromatográficas que presentaron valores de actividad antihipertensiva y antioxidante más elevadas fueron analizadas por espectrometría de masas. Las muestras fueron desaladas mediante zip Tip C18 (Merck) y se analizaron por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que permite la separación e identificación de los péptidos. La ionización de las muestras se realizó por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI).

Se utilizó un cromatógrafo marca Thermo Scientific, modelo EASY-nLC 1000, empleando una columna de fase reversa C18 (Thermo Scientific), mediante un gradiente con dos soluciones:

agua con 0,1 % de Ácido Fórmico y acetonitrilo con 0,1 de ácido fórmico. Todos los solventes y reactivos utilizados fueron de calidad LC-MS.

El cromatógrafo se utilizó acoplado a un ionizador por Electro Spray marca Thermo Scientific, modelo EASY-SPRAY y se utilizó un voltaje del spray de 3,5 kV.

Se utilizó un espectrómetro marca Thermo Scientific, modelo Q-Exactive. El equipo cuenta con una celda de HCD (*High Collision Dissociation*) y un analizador Orbitrap. La configuración del equipo permite que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que los mismos se separan por cromatografía, obteniendo Full MS y MSMS. Se utilizó un método en el cual el equipo realiza en cada ciclo un Full MS y luego hace MS/MS a los 12 picos de mejor señal ruido, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución del cromatógrafo.

Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa Proteome Discoverer (Thermo Scientific, versión 1.4), utilizando la base de datos correspondiente al estudio en cuestión.

Estos estudios fueron realizados por el servicio a terceros en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masas (CEQUIBIEM, UBA).

IV.2.5 Análisis estadístico de resultados

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado o cuadruplicado y los resultados fueron expresados como el promedio \pm el desvío estándar (DS). Los gráficos fueron realizados utilizando el programa Excel (versión 2105 para Microsoft 365 MSO 16.0.14026.20202), en los cuales las barras verticales corresponden a \pm DS. En casos donde fue necesario determinar diferencias significativas entre grupos de datos se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, evaluando la significancia de las diferencias determinadas ($p < 0,05$) mediante la aplicación de los test de Dunnett o Tukey dependiendo de si la comparación se realizaría entre un grupo de datos respecto de un grupo control, o entre distintos grupos de datos correspondientes a diferentes tratamientos de la muestra entre sí. El software empleado fue el GraphPad Prism, versión 8.0.2.

IV.3 Resultados y discusión

Se emplearon extractos de *B. hieronymi* y de *B. serra* parcialmente purificados con etanol para hidrolizar proteínas de LAC, CAS y SOJ. Para definir las condiciones de ensayo óptimas para la obtención de péptidos bioactivos, se ensayaron dos temperaturas de reacción: 45 y 55 °C, y diferentes tiempos de hidrólisis: 5, 10, 30, 60, 90 y 180 min.

IV.3.1 Caracterización de los hidrolizados obtenidos con enzimas de *B. serra*

El PER utilizado para hidrolizar los tres sustratos presentó una concentración proteica de $0,3 \pm 0,0$ mg/ml, una actividad caseinolítica de $1,0 \pm 0,1$ Ucas/ml y una actividad específica de $3,0 \pm 0,4$ Ucas/mg, siendo esta última 1,6 veces superior a la actividad específica del EC, debido a la etapa de precipitación con etanol, que constituyó un proceso de purificación parcial de las proteasas presentes en el EC. Las concentraciones de proteína de cada sustrato utilizado fueron $5,1 \pm 0,6$, $8,2 \pm 0,6$ y $9,4 \pm 0,2$ mg/ml, para SOJ, CAS y LAC, respectivamente. Todos los hidrolizados fueron preparados empleando una relación enzima:sustrato de 1:9 y los pH de reacción fueron 8,0, 6,4 y 6,5 para SOJ, CAS y LAC, respectivamente.

IV.3.1.1 Seguimiento de los productos de hidrólisis

Mediante el método del TNBS se determinó el grado de hidrólisis para cada sustrato. La **Figura IV.2** muestra la progresión del GH% con el tiempo de digestión, donde se puede apreciar un incremento rápido en los primeros tiempos de reacción y una pendiente menor a tiempos más extensos (> 30 min). Como se observa en la **Tabla IV.14**, para todos los sustratos los valores máximos de GH% fueron alcanzados cuando la hidrólisis se llevó a cabo a 55 °C luego de 180 min de hidrólisis. En el caso de hidrolizados obtenidos a 45 °C, los de CAS y LAC alcanzan el mayor GH% a los 90 min de digestión. Esto puede relacionarse con que, durante la hidrólisis, debido a la ruptura de los enlaces peptídicos, surgen fragmentos que pueden exponer cadenas laterales de aminoácidos los cuales, debido a su naturaleza química, interaccionan y provocan la formación de agregados, que son eliminados del tubo de reacción y por lo tanto no reaccionan con el TNBS. Esto también explicaría los valores bajos de GH% que suelen observarse en tiempos de hidrólisis intermedios breves (LAC 45 °C, **Figura IV.2**) situación que se revierte rápidamente al avanzar la reacción, o al final de la digestión (CAS 45 °C, **Figura IV.2**), si no se analiza el comportamiento a tiempos mayores. Estudios previos realizados sobre hidrolizados de proteínas de soja y lactosuero

en diferentes condiciones confirman la formación de estos agregados proteicos e incluso la formación de geles en el caso del lactosuero (Kuipers *et al.*, 2007; Spotti *et al.*, 2017).

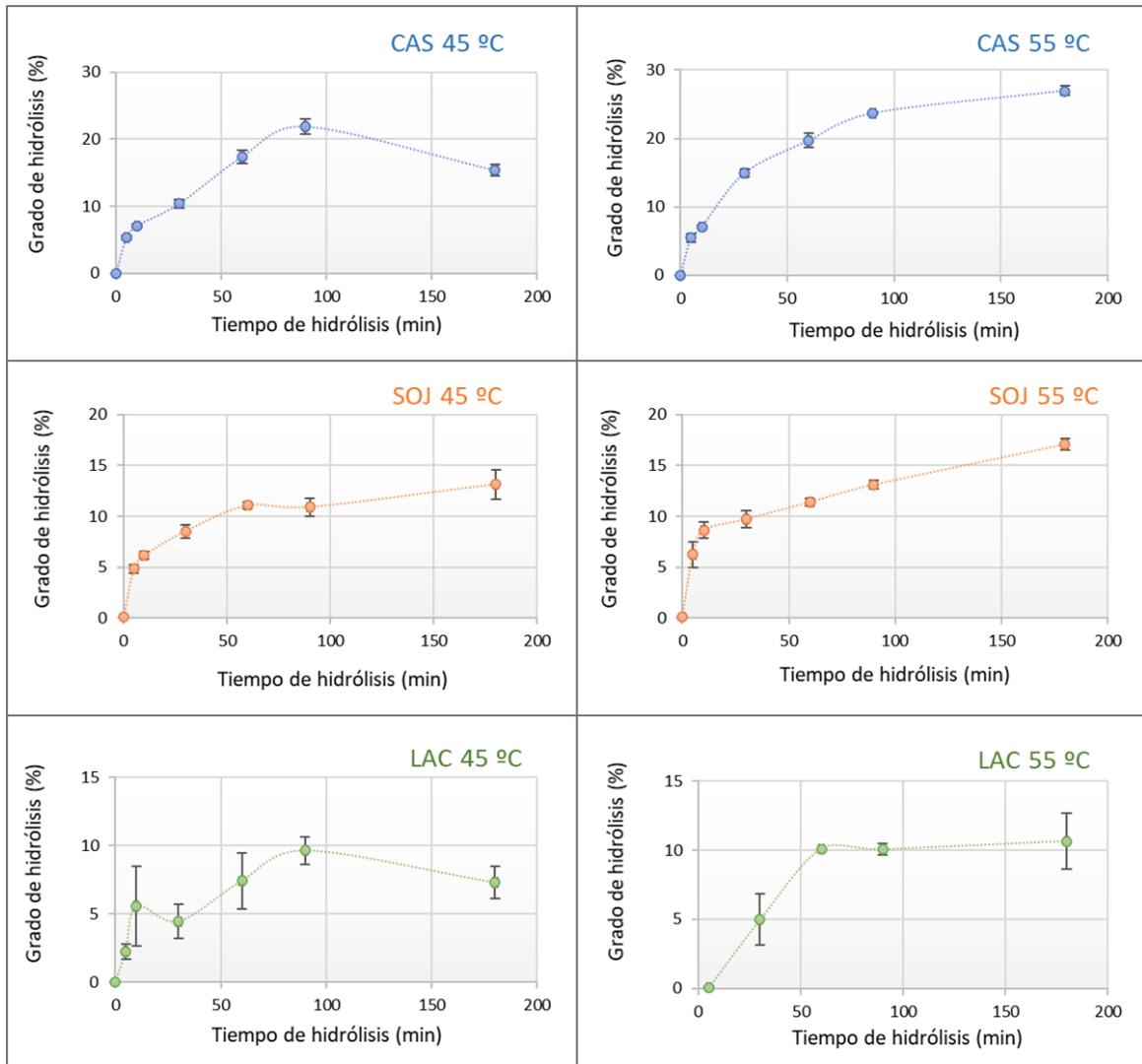


Figura IV.2. Grado de hidrólisis (TNBS) de los hidrolizados de SOJ, CAS y LAC obtenidos a 45 y 55 °C. Los valores de GH% (eje de las ordenadas) se calcularon utilizando una curva de calibración de leucina (0-2,25 mM). Los tiempos de reacción fueron 0, 5, 10, 30, 60, 90 y 180 min (eje de abscisas).

Tabla IV.14. Valores máximos de grado de hidrólisis (GH%) por el método TNBS.

	Caseína bovina	Aislado proteico de soja	Proteínas de lactosuero bovino
45 °C	22 ± 1	13 ± 1	10 ± 1
55 °C	27 ± 1	17 ± 1	12 ± 1

Alternativamente, se midió el grado de hidrólisis por el método del OPA. Los hidrolizados de SOJ y CAS obtenidos a 55 °C presentaron mayores GH% que los obtenidos a 45 °C, mientras que en el hidrolizado de LAC el resultado fue similar para las dos temperaturas ensayadas. En la **Tabla IV.15** se resumen los valores máximos de GH% obtenidos por el método OPA, los cuales corresponden a los hidrolizados de 180 min de CAS, los hidrolizados de 90 y 60 min de SOJ obtenidos a 45 y 55°C, respectivamente y los hidrolizados de LAC de 90 y 180 min de 45 y 55 °C, respectivamente.

Tabla IV.15. Valores máximos de grado de hidrólisis (GH%) por el método OPA.

	Caseína bovina	Aislado proteico de soja	Proteínas de lactosuero bovino
45 °C	17± 1	8 ± 1	9 ± 3
55 °C	25 ± 1	12 ± 1	8 ± 0

Al comparar los resultados alcanzados con ambos métodos para determinar el GH%, se puede notar que comparten dos tendencias principales: 1) la digestión de los sustratos es mayor cuando la hidrólisis se realiza a 55 °C comparada a cuando se hidroliza a 45 °C; 2) los hidrolizados de CAS muestran los GH% más altos (OPA: 25 ± 1 %; TNBS: 27 ± 1 %), seguidos por los de SOJ (OPA: 12 ± 1 %; TNBS: 17 ± 1 %) y por último los de LAC (OPA: 8 ± 0 %; TNBS: 12 ± 1 %). Mientras que el método del OPA es más sencillo de llevar a cabo, el del TNBS presenta varias complicaciones técnicas al agregar varios reactivos en ausencia de luz, introduciendo pequeños errores de pipeteo y por lo tanto resultados más imprecisos, lo que lleva a tener que repetir numerosas veces el ensayo. Nielsen *et al.*, (2001) establecieron que, si bien el método del TNBS tiene buena correlación con el proceso de hidrólisis, se trata de un procedimiento laborioso, afirmando además que incluye productos químicos peligrosos e inestables y destacando las ventajas del uso alternativo del método del OPA.

La progresión de la hidrólisis de los diferentes sustratos se visualizó mediante SDS-PAGE. En la **Figura IV.3** se puede observar que, en el caso de los hidrolizados de CAS, la β -caseína se hidrolizó más rápido que las α -caseínas (5 min), de manera similar a lo reportado por Wang *et al.* (2017), quienes hidrolizaron caseínas con bromelina y determinaron un mayor grado de hidrólisis para la β -caseína (alrededor del 35 %) que para la α -caseína (alrededor del 20 %) a los 180 min de reacción. Esto contrasta con lo que ocurre con las proteasas de *B. hieronymi*, las cuales degradan

más fácilmente las α -caseínas que las β -caseínas (Bruno *et al.*, 2010). Sólo una fracción muy pequeña de las otras caseínas permanece sin hidrolizar por las enzimas de *B. serra* hasta los 10 min de reacción tanto a 45 como a 55 °C. Se observa además la aparición de una banda ancha de 10,2 kDa junto con otras más delgadas de 7,9 y 6,5 kDa, que desaparecen a mayor tiempo de hidrólisis. También se identificó una banda de 9,0 kDa que se hizo visible entre 60 y 90 min de hidrólisis y desapareció casi por completo después de 180 min a ambas temperaturas. En el caso de los hidrolizados de SOJ, después de 5 min de digestión se observa la hidrólisis completa de la β -conglucina y la subunidad ácida de la glicina, tanto a 45 como a 55 °C, mientras que la subunidad básica de la glicina se degradó sólo parcialmente y aún permaneció a los 180 min. Finalmente, se determinó que, luego de tan solo 5 min de digestión de las proteínas de LAC, se degradó prácticamente toda la β -LG y al mismo tiempo se formaron dos bandas proteicas de 8,5 y 6,6 kDa, que se degradaron con el avance de la reacción, quedando únicamente detectable a los 180 min la banda de 6,6 kDa. Por el contrario, la α -LA se degradó muy poco y permaneció visible incluso después de 180 min, a diferencia de lo observado por Bruno *et al.* (2010), quienes determinaron que las enzimas de *B. hieronymi*, producen el efecto contrario sobre este mismo sustrato.

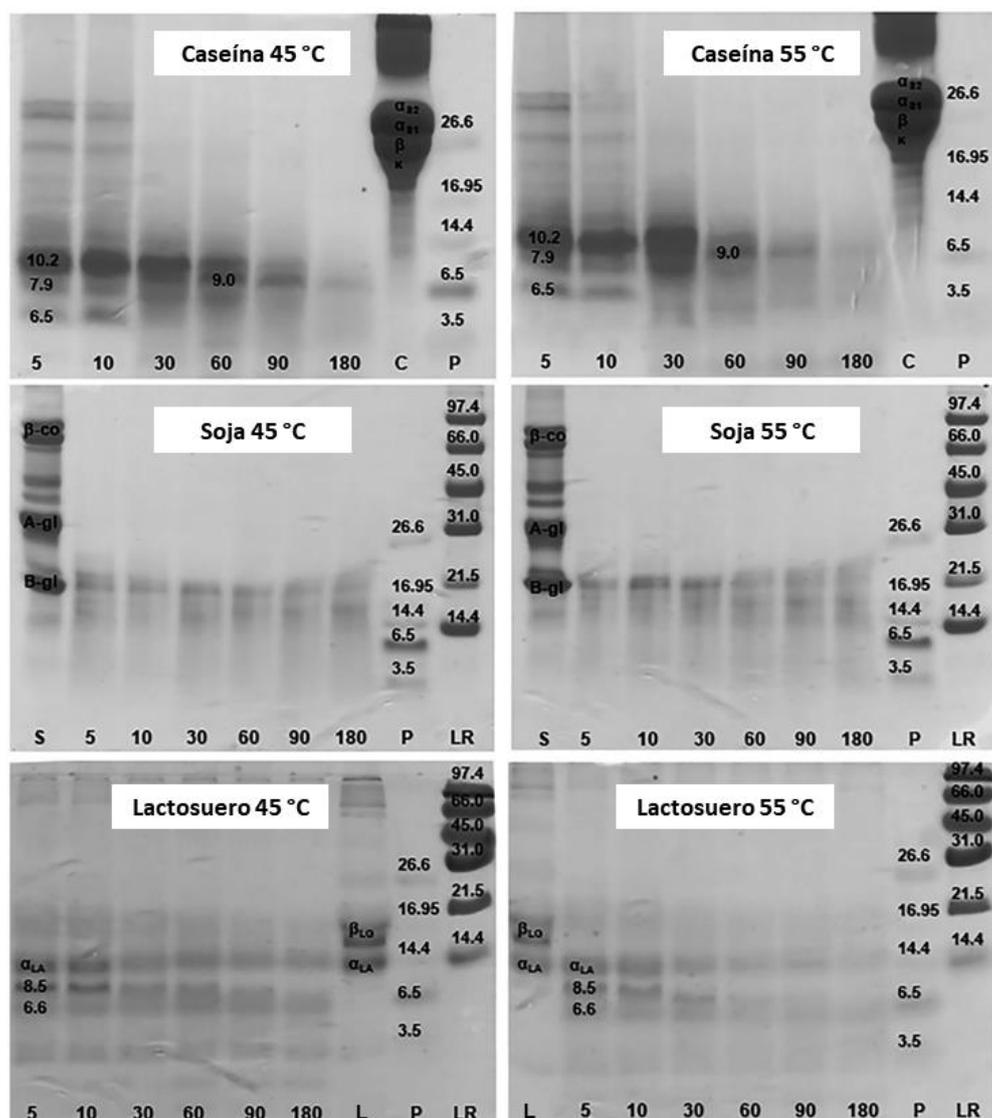


Figura IV.3. Electroforesis en gels con tricina de los hidrolizados obtenidos con *B. serra*. 5', 10', 30', 60', 90' y 180': tiempos de hidrólisis. P: patrón de peso molecular multipéptido. LR: patrón de peso molecular de bajo rango. C: control de sustrato de caseína. S: control de sustrato de soja. L: control de sustrato de lactosuero.

IV.3.1.2 Actividad biológica de los hidrolizados

IV.3.1.2.1 Actividad antioxidante

Utilizando el método original del ABTS, se determinó que el hidrolizado de CAS de 90 min obtenido a 45 °C fue el más activo ($0,60 \pm 0,01$ mg/ml Trólox); sin embargo, este hidrolizado fue el que mostró menor incremento de la actividad antioxidante con respecto al control de sustrato, ya que éste posee en sí mismo la capacidad de inhibir el radical catiónico ABTS y solamente presentó diferencias significativas ($p < 0,05$, test de Dunnett) con los hidrolizados de 60 y 90 min

tanto de 45 como de 55 °C. En cambio, los hidrolizados de todos los tiempos de reacción obtenidos a partir de LAC y SOJ presentaron mayor actividad antioxidante que sus respectivos controles de sustrato, siendo destacable que cuando se comparan los hidrolizados más activos con el control de sustrato, se observa un incremento de actividad de 3,14 y 3,61 veces para los hidrolizados de 45 y 55 °C, respectivamente. Los valores máximos obtenidos para los hidrolizados de LAC y de SOJ fueron: $0,50 \pm 0,01$ y $0,49 \pm 0,01$ mg/ml de Trólox, respectivamente, obtenidos en ambos casos a los 5 min de hidrólisis a 45 °C. Los resultados se pueden observar en los gráficos de la **Figura IV.4**.

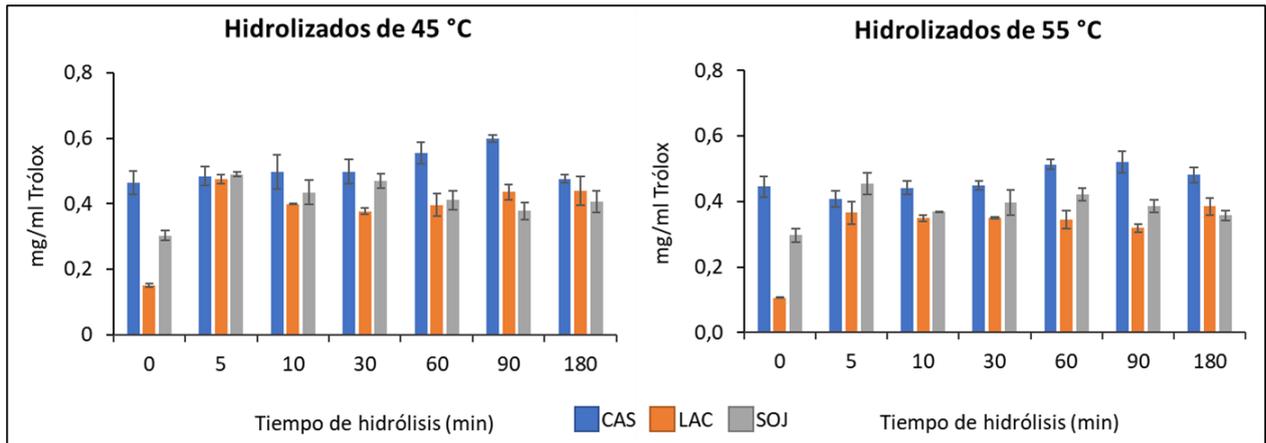


Figura IV.4. Actividad antioxidante (ABTS, original) de los hidrolizados obtenidos con *B. serra*. CAS: hidrolizados de caseína. LAC: hidrolizados de lactosuero. SOJ: hidrolizados de soja.

Los valores de actividad antioxidante obtenidos por el método “QUENCHER” resultaron ser más elevados que aquellos obtenidos por el método original. Esto podría deberse a la liberación de péptidos antioxidantes atrapados dentro de agregados proteicos de los hidrolizados, hecho favorecido por la agitación durante 30 min en presencia del reactivo. Además, se observó una mayor actividad antioxidante en hidrolizados de 55 °C que en los de 45 °C. Los valores máximos obtenidos fueron de $3,86 \pm 0,10$ (CAS, 180 min), $1,72 \pm 0,12$ (SOJ, 180 min), y $1,99 \pm 0,09$ (LAC, 180 min) mg/ml de Trólox (**Figura IV.5**). De manera similar a lo obtenido con el método original, los hidrolizados de lactosuero fueron los que presentaron mayor incremento de la actividad antioxidante con respecto al control de sustrato, es decir que su actividad se debe principalmente a la liberación de péptidos activos.

Estos resultados confirman que la variante QUENCHER del ABTS es la más adecuada para medir la actividad antioxidante de los hidrolizados ya que permite que las muestras interactúen de manera más eficiente con el reactivo, lo que se ve reflejado en valores más altos de actividad. Este método fue desarrollado para medir la actividad antioxidante en muestras alimenticias que

no son necesariamente solubles (Di Benedetto *et al.*, 2015), como sucede con algunos hidrolizados los cuales muestran agregados que muchas veces no llegan a solubilizarse. Por lo tanto, siguiendo esta metodología los péptidos que pueden quedar atrapados tienen más posibilidad de inhibir al radical ABTS, permitiendo alcanzar valores más elevados de actividad. En virtud de esto, se seleccionó esta variante del método para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras correspondientes a hidrolizados.

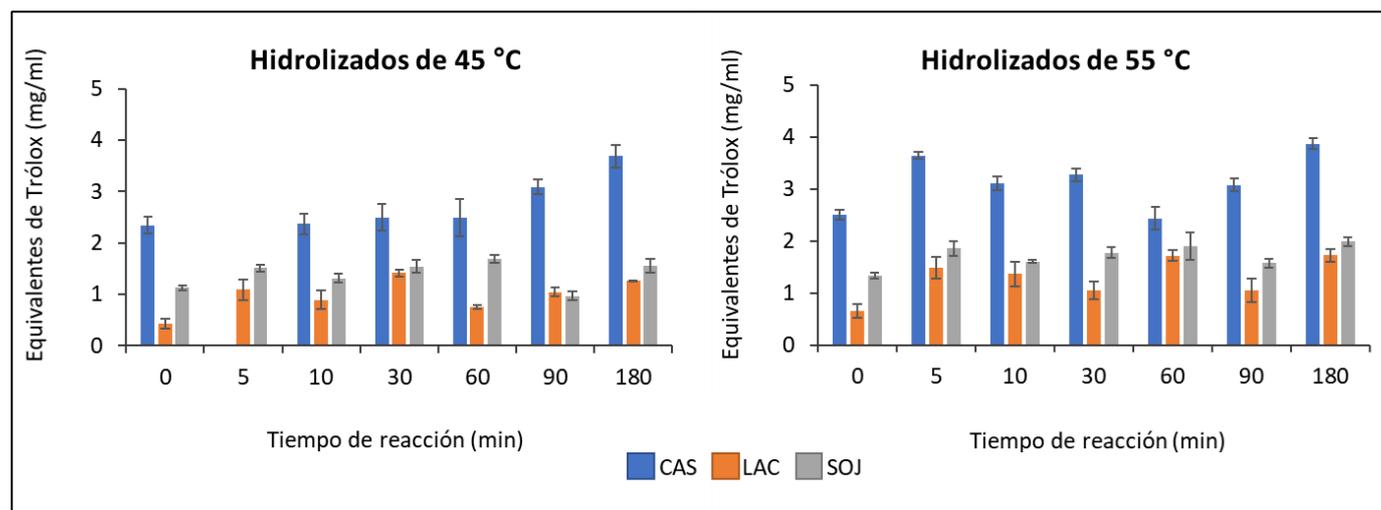


Figura IV.5. Actividad antioxidante (ABTS, *QUENCHER*) de los hidrolizados obtenidos con *B. serra*. CAS: hidrolizados de caseína. LAC: hidrolizados de lactosuero. SOJ: hidrolizados de soja.

IV.3.1.2.2 Actividad inhibitoria de la ECA

Se determinó la actividad inhibitoria de la ECA a todos los hidrolizados de 180 min empleando un método fluorométrico utilizando Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH como sustrato. Con respecto a los hidrolizados de SOJ, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el porcentaje de inhibición de la ECA del control con sustrato y los hidrolizados (test de Dunnett), por lo que se deduce que no hubo liberación de péptidos inhibitorios de la ECA durante la digestión del sustrato en las condiciones ensayadas. En cambio, sí se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el porcentaje de inhibición de la ECA de los hidrolizados de CAS y LAC respecto de sus BE y TO (**Tabla IV.16**), evidenciando la liberación de péptidos inhibitorios como resultado de las hidrólisis. Los valores máximos fueron alcanzados para los hidrolizados de 55 °C de CAS y LAC (57 y 67 %, respectivamente). Estos son resultados aceptables cuando la búsqueda está enfocada en la obtención de nuevos péptidos inhibitorios de la ECA que pueden liberarse de sustratos que representan desechos de la industria como es el suero dulce descartado en la manufactura de quesos. Sin embargo, los valores alcanzados son menores a los obtenidos por Villadóniga *et al.*

(2018), quienes hidrolizan suero ácido con proteasas de una especie de la misma familia botánica (*B. anthiakantha*, Bromeliaceae), alcanzando valores de inhibición de la ECA superiores a 80 y 90 % en las fracciones retenida y permeada del hidrolizado filtrado con 3 kDa.

En cuanto a las diferentes temperaturas ensayadas, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de inhibición, por lo tanto, sería innecesario llevar a cabo la hidrólisis a 55 °C.

Tabla IV.16. Actividad inhibitoria de la ECA de los hidrolizados de 180 min obtenidos con *B. serra*.

	Inhibición de la ECA (%)
EC de <i>B. serra</i> (BE)	34 ± 7
Control de sustrato de CAS (T0)	42 ± 4
Hidrolizado de CAS de 45 °C	54 ± 4
Hidrolizado de CAS de 55 °C	57 ± 4
Control de sustrato de LAC (T0)	41 ± 6
Hidrolizado de LAC de 45 °C	58 ± 7
Hidrolizado de LAC de 55 °C	67 ± 1

IV.3.2 Caracterización de los hidrolizados obtenidos con enzimas de *B. hieronymi*

Se utilizaron dos extractos parcialmente purificados con etanol para obtener hidrolizados de proteínas alimentarias. En primer lugar, se utilizó el PER Bh A para hidrolizar proteínas de lactosuero bovino en base a estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación en los que fue demostrada la liberación de péptidos bioactivos (Bertucci, 2012; Bertucci *et al.*, 2023). Por otra parte, se realizaron hidrolizados de caseína bovina, lactosuero bovino y aislado proteico de soja obtenidos a partir de un extracto más concentrado de frutos de la misma especie, el PER Bh B.

IV.3.2.1 Liberación de péptidos bioactivos utilizando el Bh A

Como se mencionó en el párrafo anterior, en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Bertucci, 2012) se habían obtenido hidrolizados de diferentes tiempos de reacción

a partir LAC y un extracto enzimático equivalente al PER de Bh A, línea de investigación que se tomó como punto de partida para continuar en el presente trabajo de tesis. Los primeros resultados obtenidos muestran que, de la misma manera que ocurre en los hidrolizados de *B. serra* (sección 3.1), la digestión del sustrato es progresiva a medida que avanza el tiempo de reacción (Figura IV.6). Tanto la α -LA como la β -LG (14,2 y 18,2 kDa, respectivamente) desaparecen gradualmente, mientras que las bandas correspondientes a las peptidasas permanecen sin degradar. En concordancia con lo observado en la electroforesis, el grado de hidrólisis aumenta con el tiempo de digestión, alcanzando un valor máximo de $15,2 \pm 0,7\%$ a los 180 min de hidrólisis. Los hidrolizados de 30, 90 y 180 min sin filtrar presentan $71,3 \pm 2,1$, $84,6 \pm 1,9$ y $87,5 \pm 0,0\%$ de actividad inhibitoria de la ECA, mostrando diferencias significativas entre los hidrolizados de diferentes tiempos de digestión y los controles de enzima y de sustrato ($p < 0,05$, test de Dunnett), así como entre el hidrolizado de 30 min y los de 90 y 180 min de digestión ($P < 0,05$, test de Tukey). El control de sustrato muestra alrededor de 21 % de actividad; esto se debe a la presencia de péptidos inhibitorios de la ECA liberados a partir de las proteínas lácteas por acción combinada de peptidasas nativas presentes en la leche como la plasmina y proteasas de microorganismos psicrótrofos producidas durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Nielsen, 2002; Ismail & Nielsen, 2010; Wölk *et al.*, 2020).

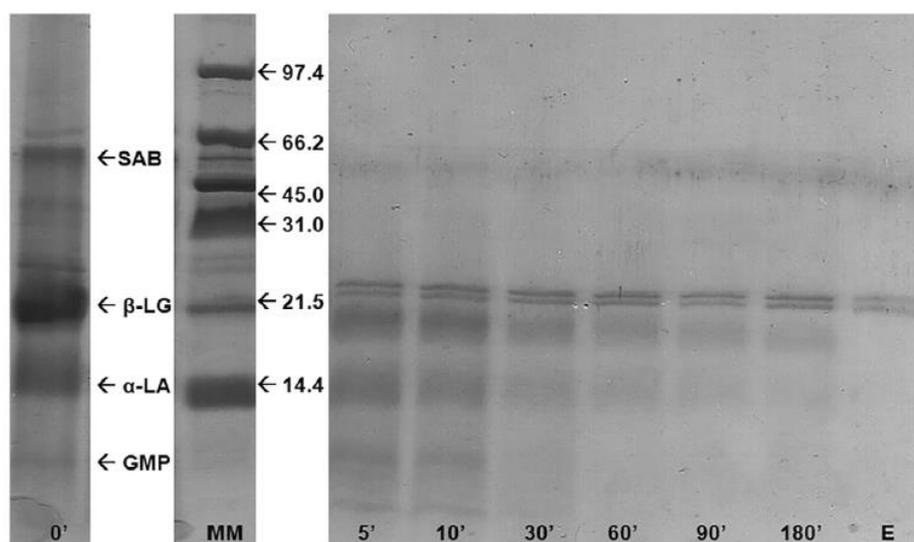


Figura IV.6. Electroforesis (SDS-PAGE con tricina) de los hidrolizados de LAC obtenidos con *B. hieronymi* (Bh A) (Bertucci *et al.*, 2023). **0'**: control de sustrato. **MM**: patrón de masa molecular. **5'**, **10'**, **30'**, **60'**, **90'** y **180'**: tiempos de hidrólisis. **E**: control de enzima. SAB: seroalbúmina bovina; β -LG: beta lactoglobulina; α -LA: alfa lactoalbúmina; GMP: glicomacropéptido.

Si se comparan los perfiles de masas en el rango > 500 Da obtenidos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), se identificaron 29 señales mayoritarias correspondientes a péptidos presentes en el hidrolizado de 90 min, mientras que para el hidrolizado de 180 min se obtuvieron 22 picos. Solamente tres masas moleculares coinciden con las obtenidas en el hidrolizado de 90 min cuyos valores son 509,219, 568,009 y 1654,614 Da. Entonces, podría considerarse que estos tres péptidos resisten la hidrólisis hasta los 180 min de digestión. Al contrastar los perfiles de HPLC-Fase reversa (**Figura IV.7**) obtenidos por Bertucci (2012) con los espectros de masas de los hidrolizados de 90 y 180 min (**Figura IV.8**) se puede observar que, a medida que avanza la hidrólisis se generan péptidos más pequeños y menos hidrofóbicos. Esta conclusión resulta similar a la reportada por Mohan *et al.* (2016), quienes detectaron valores de hidrofobicidad superficial 10 veces menores en péptidos pequeños (< 10 kDa) presentes en hidrolizados de proteínas de lactosuero.

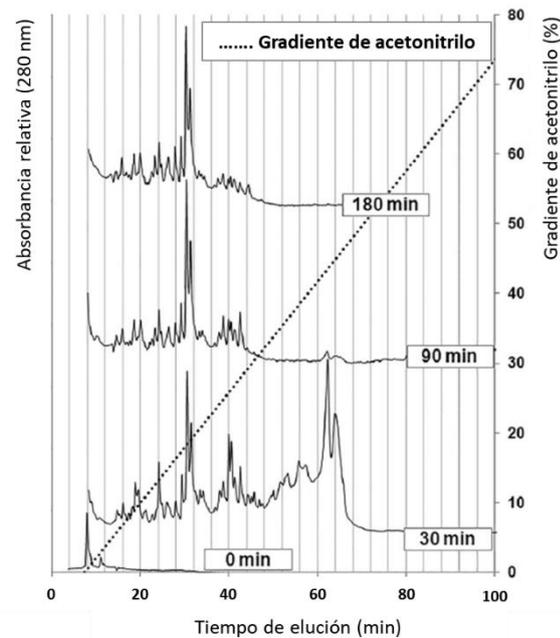


Figura IV.7. Perfiles peptídicos (< 3 kDa) obtenidos por HPLC-Fase reversa (columna Bondclone 10 C-18; 00H-2117-C0, Phenomenex). Velocidad de flujo: 1,0 ml/min. Gradiente lineal en 35 volúmenes de columna hasta 100 % de ácido trifluoroacético:acetónitrilo 0,25:99,5. Tomado de Bertucci (2012).

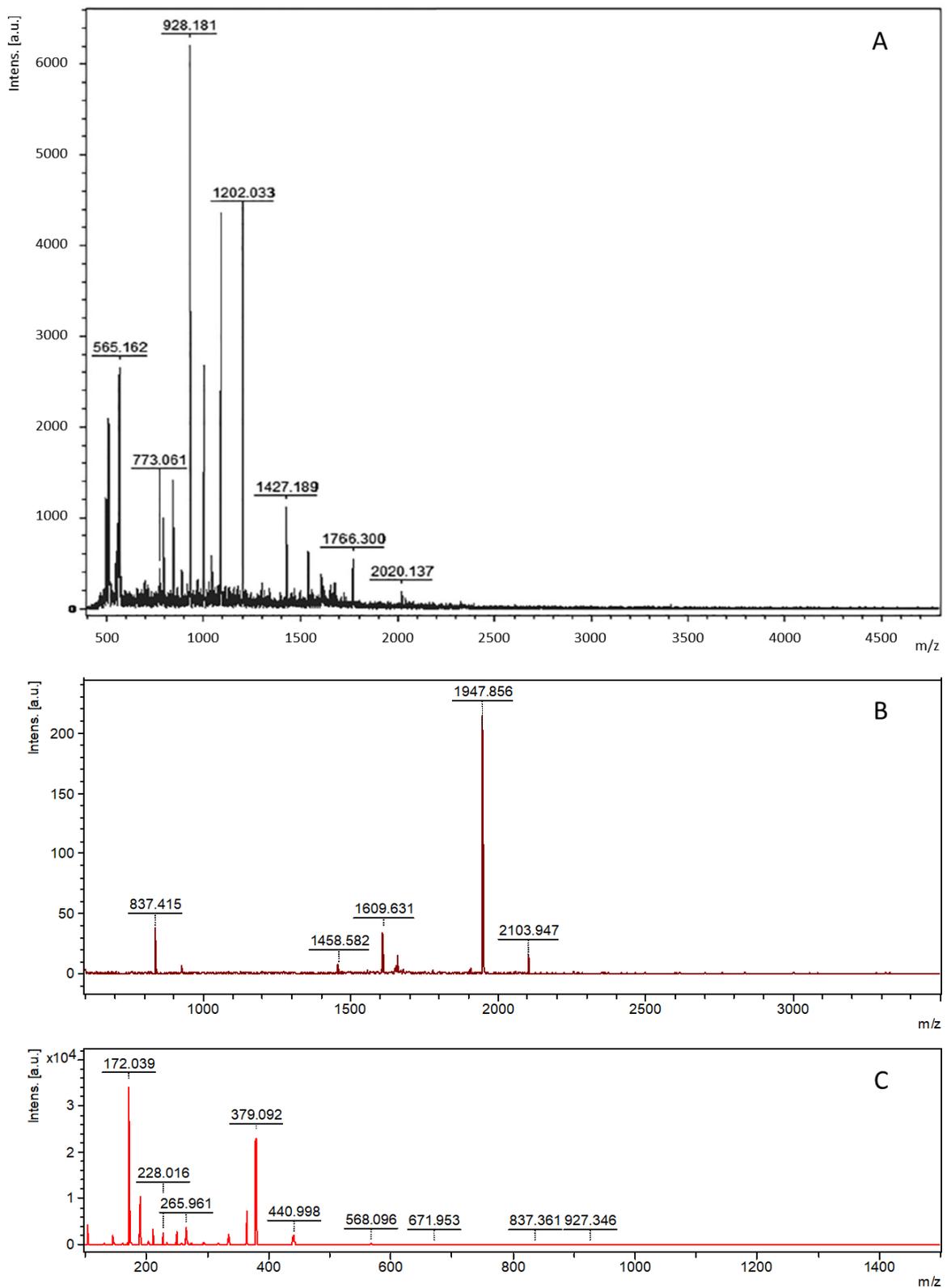


Figura IV.8. Espectros de masas correspondientes a los hidrolizados filtrados (< 3kDa). La intensidad es expresada en unidades arbitrarias (UA) en función de la relación masa/carga de los péptidos analizados. **A:** hidrolizado de 90 min, 300-4.500 m/z. **B:** hidrolizado de 180 min 200-3.500 m/z. **C:** hidrolizado de 180 min 100-1.500 m/z.

Numerosos autores han reportado que la mayoría de los péptidos inhibitorios de la ECA corresponden al rango < 3kDa (Hao *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021). Udenigwe & Aluko (2012) sugieren que los péptidos más cortos exhiben mayor bioactividad y biodisponibilidad comparados con los péptidos más largos. Por consiguiente, el hidrolizado de 180 min fue seleccionado para continuar con otros estudios desarrollados en el presente trabajo de tesis debido a su alto porcentaje de inhibición de la ECA y su elevado GH%, así como la presencia mayoritaria de péptidos cortos (< 3 kDa) corroborada por espectrometría de masas. Se recuperó un 83 % de actividad inhibitoria de la ECA en el hidrolizado filtrado con 3 kDa con respecto al hidrolizado sin filtrar, y su IC₅₀ fue de 0,17 mg/ml (intervalo de confianza, 95 %; R² 0,9). El ensayo se validó mediante la determinación de la IC₅₀ del captopril, que fue de 10,3 nM (intervalo de confianza, 95 %; R² 0,9), valor cercano en magnitud al calculado por Henda *et al.* (2013) (rango: 1,79-15,1 nM). El valor del hidrolizado en estudio (0,17 mg/ml) es menor —lo que indica mayor inhibición—, que aquel reportado por Adjonu *et al.* (2022) para péptidos < 3kDa liberados a partir de lactosuero por la acción hidrolítica de la acción combinada de quimotripsina y pepsina (0,565 y 0,38 mg/ml, respectivamente).

Con respecto a los datos de MALDI TOF correspondientes al hidrolizado de 180 min (< 3 kDa), se obtuvieron 50 valores de m/z, los cuales fueron analizados mediante la herramienta bioinformática FindPept, utilizando el parámetro de “corte inespecífico” para considerar todas las posibilidades de hidrólisis de enlaces peptídicos de las proteínas presentes en el LAC. El resultado del análisis comprende la deducción de las posibles secuencias de los péptidos presentes en el hidrolizado, así como la inferencia de la posición de las secuencias peptídicas dentro de la secuencia de la proteína madura (aminoácidos adyacentes). Utilizando dos bases de datos, se realizó la búsqueda de péptidos bioactivos. Las secuencias teóricas obtenidas mediante FindPept, fueron contrastadas con las bases de datos BIOPEP-UWM (<https://biochemia.uwm.edu.pl>) y BioPepBD (<https://bis.zju.edu.cn>), obteniéndose 15 péptidos reportados como inhibidores de la ECA. Las secuencias peptídicas, números de identificación (ID) y valores de IC₅₀ se detallan en la **Tabla IV.17.**

Tabla IV.17. Secuencias peptídicas teóricas obtenidas por corte inespecífico de las proteínas de lactosuero.

Masa molecular (Da)	Secuencia peptídica	Proteína de origen	BIOPEP-UWM ID	BioPepDB ID	IC ₅₀ (μM)	Referencias
174.913	GV	α-LA, SAB	-	00420	4600 4571 219	Cheung, H-S, <i>et al.</i> , 1980 Wu <i>et al.</i> , 2007 Wang <i>et al.</i> , 2011
174.913	VG	SAB	-	01364	980	Nakahara <i>et al.</i> , 2010
191.053	GD	β-LG, SAB	7620	00327	9200 9333 110	Cheung, H-S, <i>et al.</i> , 1980; BIOPEP-UWM Wu <i>et al.</i> , 2006 Wang <i>et al.</i> , 2011
204.117	KG	α-LA, β-LG, SAB	7604	00675	3200 309	Cheung, H-S, <i>et al.</i> , 1980; BIOPEP-UWM Wang <i>et al.</i> , 2011
204.117	GK	SAB	7611	-	5400	BIOPEP-UWM
274.327	VR	SAB, β-LG	7628	-	53	BIOPEP-UWM
294.072	FQ	α-LA, SAB	9076	00272	51	Wu <i>et al.</i> , 2006; BIOPEP-UWM
294.135	KF	α-LA, β-LG, SAB	7692	00670	58 116 930 28	Wu <i>et al.</i> , 2007 Terashima, 2011 Puchalska, 2015 BIOPEP-UWM
294.135	FK	β-LG	-	00247	-	BioPepDB
461.082	QKW	β-LG	-	01149	35*	Jing <i>et al.</i> , 2014
568.079	WYSL	β-LG	-	01542	90	Hernandez-Ledesma, <i>et al.</i> , 2007
568.079	ALPMH	β-LG	-	00052	521	Hernandez-Ledesma <i>et al.</i> , 2008
601.175	VRTPE	β-LG	-	01461	-	BioPepDB
837.344	ALPMHIR	β-LG	3261	00053	43	Mullally <i>et al.</i> , 1997; BIOPEP-UWM
927.331	YLYEIAR	SAB	7700	01585	16	BIOPEP-UWM

Diversos autores concuerdan en que los péptidos inhibitorios de la ECA generalmente comparten ciertas características que están relacionadas con su interacción con el sitio catalítico de la ECA. Por ejemplo, los péptidos que contienen Phe, Trp, Tyr, Arg, Lys o Pro en el extremo C-terminal, y Gly, Val, Leu Ile o Ala en el N-terminal, poseen mayor actividad inhibitoria de la ECA debido a que estos aminoácidos son capaces de intensificar la unión con el sitio activo de esta enzima (Zhang *et al.*, 2020; Hao *et al.*, 2021; Gui *et al.*, 2022). Por otra parte, también se ha demostrado que los péptidos que presentan Tyr, Pro o Trp en el tripéptido C-terminal, muestran alta actividad inhibitoria de la ECA (Worsztynowicz *et al.*, 2020). Estos tres parámetros fueron

utilizados para analizar las secuencias teóricas obtenidas por bioinformática. Se encontraron 49 secuencias con aminoácidos alifáticos en el N-terminal, 23 péptidos con Phe, Lys o Arg en el C-terminal y 34 tripéptidos C-terminales con Tyr, Trp o Pro, valores que se representan mediante un diagrama de Venn (**Figura IV.9**). Numerosos péptidos exhiben simultáneamente dos de estas características, siendo los principales candidatos para ser evaluados como inhibitorios de la ECA: AEPE, SAPLR, VRTPE, LLQKW y IDALNENK derivados de β -LG, y VEGP, ALTP, ILNR, IARR, AIPEN, IPENLPPL y LRLAKEY derivados de SAB.

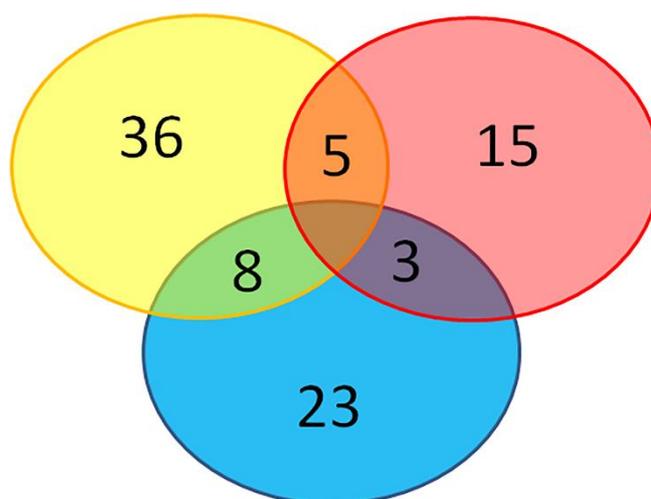


Figura IV.9. Diagrama de Venn. El círculo amarillo representa las secuencias peptídicas con aminoácidos alifáticos en el N-terminal (49), el círculo rojo las que contienen Phe, Lys o Arg en el C-terminal (23) y el círculo azul las secuencias que contienen tripéptidos C-terminales con Tyr, Trp o Pro (34). Las intersecciones (naranja, violeta y verde) corresponden a péptidos que presentan dos de estas características en simultáneo. Los datos utilizados para realizar este análisis fueron publicados y pueden ser consultados a través del siguiente link: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0307.12943>.

IV.3.2.2 Liberación de péptidos bioactivos utilizando el Bh B

Debido a la elevada actividad proteolítica ($10,5 \pm 0,3$ Ucas/ml) del Bh B con respecto al Bh A, se decidió utilizar dicho extracto para hidrolizar CAS, LAC y SOJ, bajo la hipótesis de que al presentar mayor cantidad de Ucas por ml se obtendrá una hidrólisis más elevada, lo cual puede ser contrastado con los resultados obtenidos en la **sección IV.3.2.1**.

IV.3.2.2.1 Seguimiento de los productos de hidrólisis

Se determinó el grado de hidrólisis a los diferentes tiempos de reacción por el método del TNBS (**Figura IV.10**). El hidrolizado de CAS de 55°C de 180 min presentó el mayor GH%, seguido por los hidrolizados de 180 min de SOJ de 45 °C y de LAC de 55 °C, con valores de 49 ± 3 , 26 ± 2 y 15 ± 2 %, respectivamente (**Tabla IV.18**). Aunque los hidrolizados de LAC son los que presentan menores valores de GH%, puede observarse en el gel de electroforesis (**Figura IV.11**) que la degradación de las proteínas mayoritarias del sustrato (β -LG y la α -LA) son consumidas completamente luego de 5 min de hidrólisis a 45 y 55 °C. Esto no ocurrió tan drásticamente cuando se hidrolizó LAC con Bh A a 45 °C (extracto con menor actividad que Bh B, **Figura IV.6**), aunque los valores de GH% obtenidos con el Bh B son inesperadamente menores que aquellos presentados por los hidrolizados preparados con el Bh A. Esta falta de concordancia entre las dos técnicas se puede explicar desde el punto de vista metodológico, ya que estos hidrolizados presentaron una gran cantidad de agregados que no se pudieron resuspender y por lo tanto interfirieron en la determinación del GH%. Por lo tanto, en base a la comparación de los perfiles electroforéticos se considera que Bh B es el extracto más adecuado para producir hidrolizados de LAC con elevada proporción de péptidos pequeños.

Tabla IV.18. Valores máximos de grado de hidrólisis (GH%) por el método TNBS.

	Caseína bovina	Aislado proteico de soja	Proteínas de lactosuero bovino
45 °C	32 ± 2	26 ± 2	6 ± 2
55 °C	49 ± 3	19 ± 0	15 ± 2

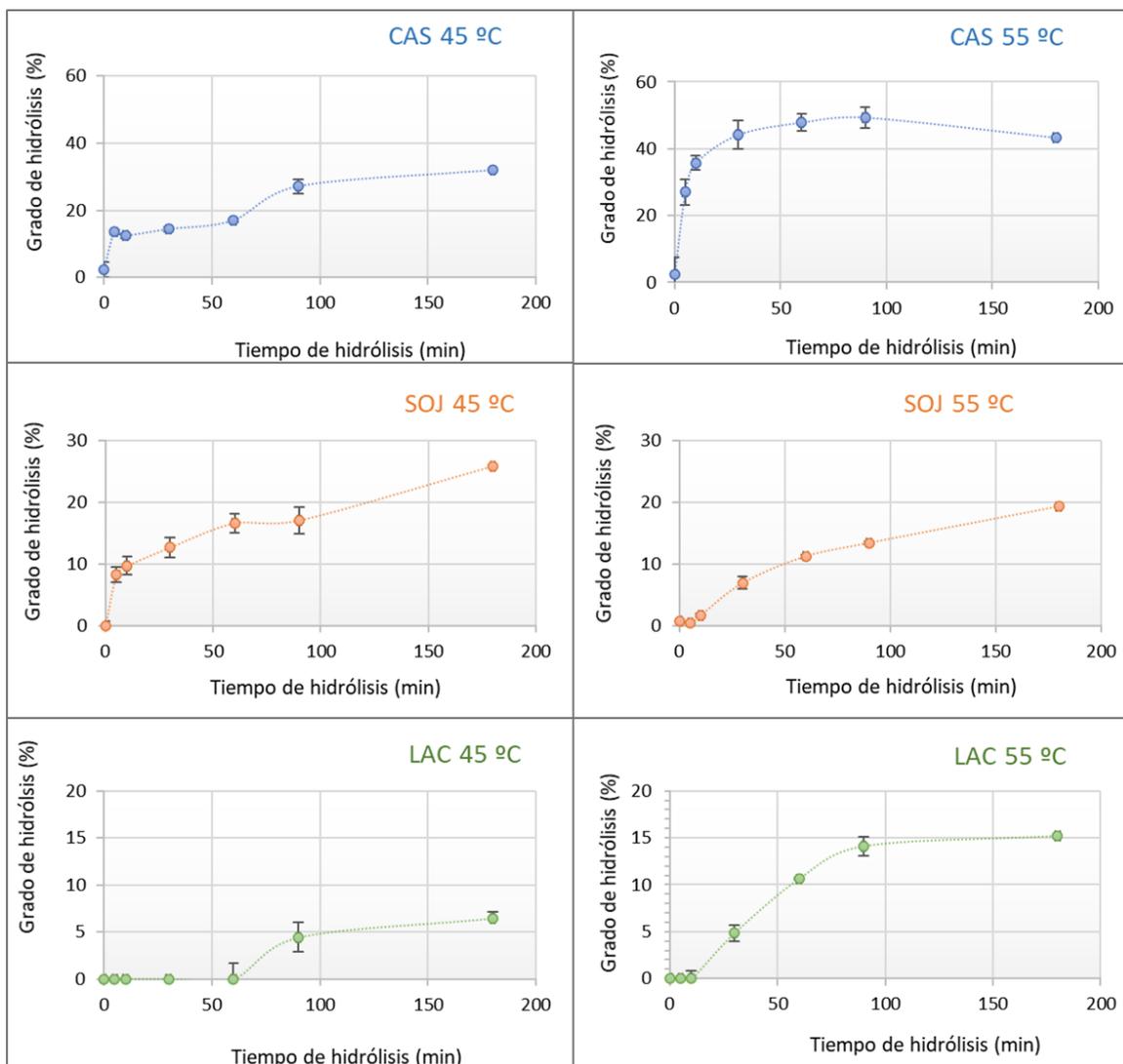


Figura IV.10. Grado de hidrólisis (TNBS) de los hidrolizados de SOJ, CAS y LAC obtenidos a 45 y 55 °C. Los valores de GH% (eje de las ordenadas) se calcularon utilizando una curva de calibración de leucina (0-2,25 mM). Los tiempos de reacción fueron 0, 5, 10, 30, 60, 90 y 180 min (eje de abscisas).

Como se observa en los geles de la **Figura IV.11**, por SDS-PAGE se evidencia la degradación de las proteínas principales de los tres sustratos luego de los 5 min de hidrólisis. En el caso de los hidrolizados de CAS se observó la desaparición de todas las proteínas mayoritarias, surgiendo como producto dos bandas de alrededor de 14 y 6 kDa. La banda más pesada se mantuvo hasta los 10 min de reacción sólo en el hidrolizado de 45°C. A partir de los 30 min se observa la aparición de una banda <3,5 kDa a ambas temperaturas de hidrólisis y es persistente aún a los 180 min de reacción. La banda de alrededor de 6 kDa se degradó casi por completo a los 180 min de hidrólisis.

Las proteínas mayoritarias de SOJ, a los 5 min de hidrólisis solamente persiste una banda correspondiente al sustrato sin hidrolizar (subunidad básica de la glicinina), que se degrada casi

completamente luego de 180 min de hidrólisis a 45 y 55 °C. Durante el desarrollo de la hidrólisis entre 5 y 180 min, se identificaron dos bandas persistentes, de bajo peso molecular, correspondientes a productos de la digestión enzimática.

Por otro lado, en los hidrolizados de LAC se observa la degradación cuantitativa de ambas proteínas mayoritarias (β -LG y α -LA) a los 5 min de hidrólisis tanto a 45 como a 55 °C. A los 5 min de hidrólisis a 45 °C aparecen tres bandas de pesos moleculares < 14 kDa que disminuyen su intensidad gradualmente a medida que progresa la hidrólisis, a diferencia de la digestión a 55 °C, donde se observa mayor degradación de dichas bandas. Por otra parte, en el hidrolizado de 55 °C se identificaron dos bandas persistentes menores a 3 kDa a partir de los 5 min de hidrólisis que no se observan cuando la hidrólisis se realiza a 45 °C.

Si se comparan los resultados obtenidos para los hidrolizados obtenidos con *B. serra* y *B. hieronymi* se puede observar que, para el sustrato CAS, en ambos casos la β -caseína es hidrolizada completamente en tan solo 5 min, mientras que las otras caseínas son digeridas en su totalidad por las enzimas de *B. serra*, luego de 30 min de hidrólisis, y luego de 5 min con las de *B. hieronymi*. En cuanto a las proteínas de SOJ, con las enzimas de ambas especies se obtiene la hidrólisis completa de la β -conglucina y la subunidad ácida de la glicina, mientras que la subunidad básica de la glicina se degrada sólo parcialmente permaneciendo aún a los 180 min de hidrólisis, aunque de manera muy escasa en los hidrolizados obtenidos con *Bh B*. Por último, cuando se hidroliza el sustrato LAC, la β -LG y la α -LA son degradadas cuantitativamente por el *Bh B* luego de 5 min a ambas temperaturas, mientras que las enzimas de *B. serra* sólo logran hidrolizar la β -LG luego de 180 min a 55 °C y prácticamente no digieren a la α -LA.

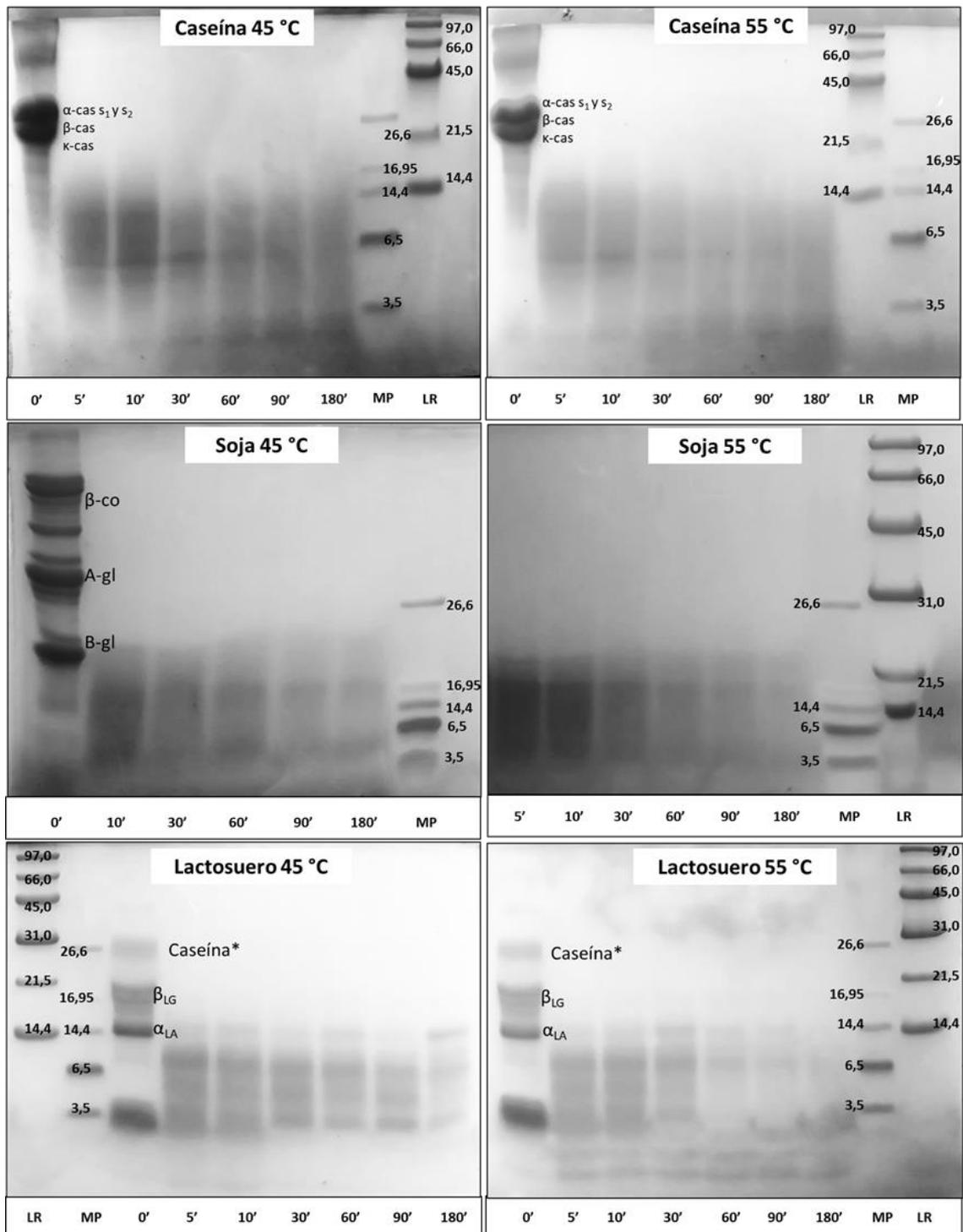


Figura IV.11. Electroforesis en gels con tricina de los hidrolizados obtenidos con *B. hieronymi* (Bh B). 5', 10', 30', 60', 90' y 180': tiempos de hidrólisis. MP: patrón de peso molecular multipéptidico. LR: patrón de peso molecular de bajo rango. C: control de sustrato, caseína. S: control de sustrato, soja. L: control de sustrato, lactosuero.

Como conclusión general se puede observar que, si bien los sustratos son hidrolizados rápidamente por el Bh B a ambas temperaturas, lo que indicaría una elevada inespecificidad de corte por parte de este sistema enzimático, surgen bandas con cierta estabilidad que persisten

durante un lapso de tiempo para luego ser hidrolizadas. Esto podría estar relacionado con la presencia de al menos ciertos enlaces expuestos en las bandas persistentes que resultan ser menos escindibles por estas peptidasas. Un comportamiento similar pero más acentuado pudo detectarse para las de peptidasas serínicas de *M. pomifera* cuando se utilizan para hidrolizar caseína, soja, lactosuero y clara de huevo (Bertucci *et al.*, 2015; Corrons *et al.*, 2017; Reyes Jara *et al.*, 2018, 2021).

IV.3.2.2 Actividad biológica de los hidrolizados

Por el método del ABTS “QUENCHER”, los valores más elevados fueron obtenidos para los hidrolizados de CAS de 30 min de 45 y 55 °C ($9,47 \pm 0,86$ y $10,50 \pm 0,06$ mg/ml Trólox, respectivamente), sin embargo, la mayor parte de esta actividad se debe a componentes presentes en el control de sustrato, aumentando sólo 1,4 y 1,2 veces la actividad respecto del control de sustrato a 45 y 55 °C, respectivamente. El hidrolizado de SOJ de 45°C de 180 min fue seleccionado cómo el más promisorio para continuar con los ensayos de caracterización ya que resultó ser 3,5 veces mayor que el valor obtenido para control de sustrato, lo que sugiere que la actividad antioxidante aumenta especialmente debido a la liberación de péptidos antioxidantes por hidrólisis (Figura IV.12). Si se comparan estos valores de actividad antioxidante (método del ABTS) con los reportados por Meza-Espinoza *et al.* (2018) para hidrolizados de soja obtenidos con proteasas de *B. pinguin* y *B. karatas*, se puede observar que mientras que en el presente trabajo la actividad fue 3,4 y 3,3 veces más elevada para los hidrolizados de 30 y 60 min de hidrólisis respecto del sustrato sin hidrolizar, con el extracto de *B. pinguin* se obtuvo un incremento de 1,6 y 1,9 veces (35 y 60 min de hidrólisis) y con *B. karatas* de 1,5 y 1,7 veces (35 y 60 min de digestión).

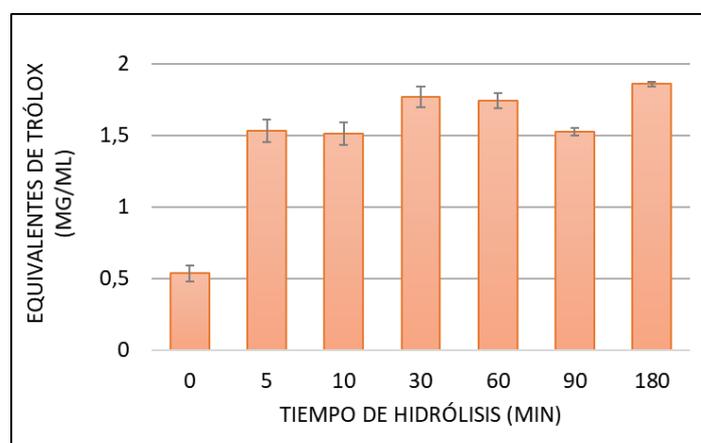


Figura IV.12. Actividad antioxidante de los hidrolizados de SOJ obtenidos con enzimas de *B. hieronymi* a 45 °C. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Se determinó la actividad inhibitoria de la ECA a todos los hidrolizados de 180 min ya que se espera que, a mayor tiempo de hidrólisis, los fragmentos de proteína liberados sean más pequeños, pudiendo surgir péptidos inhibitorios (Hao *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021). El control de enzima mostró un 26 % de inhibición, y aunque se trata de un valor inusualmente elevado, existen diferencias significativas con algunos hidrolizados. Cuando se repitió esta determinación con otro lote de control de enzima preparado en las mismas condiciones el valor arrojado fue no detectable, al igual que en ensayos anteriores (valor residual del 6 % en Bertucci *et al.*, 2023). Por su parte, los sustratos CAS y SOJ mostraron altos valores de actividad inhibitoria de la ECA, incluso hasta mayores que los obtenidos para los hidrolizados, y por lo tanto son descartados para pruebas posteriores. En el caso del sustrato LAC, sí se pudo observar el incremento de la actividad inhibitoria de la ECA con respecto al control de sustrato, obteniéndose el mayor porcentaje de inhibición de la ECA en el hidrolizado de LAC de 45 °C. Esta muestra presentó la mayor actividad inhibitoria de la ECA (85 %), además de presentar una diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Dunnett) con sus respectivos controles (**Tabla IV.19**). Por lo tanto, esta muestra fue seleccionada para continuar con los estudios.

Tabla IV.19. Actividad inhibitoria de la ECA de los hidrolizados de 180 min obtenidos con *B. hieronymi* (Bh B)

	Inhibición de la ECA (%)
EC de <i>B. hieronymi</i> (BE)	26 ± 2
Control de sustrato de LAC (T0)	13 ± 5
Hidrolizado de LAC de 45 °C	85 ± 10
Hidrolizado de LAC de 55 °C	67 ± 11

IV.3.3 Hidrolizados seleccionados

Se seleccionaron dos hidrolizados correspondientes a las mayores actividades biológicas obtenidas, uno con actividad antioxidante: hidrolizado de SOJ de 45 °C, y otro con actividad inhibitoria de la ECA: hidrolizado de LAC de 45 °C, ambos de 180 min de hidrólisis, obtenidos con Bh B. Se prepararon lotes de 100 ml de ambos para continuar con la caracterización.

Al hidrolizado de SOJ de 45 °C se le determinó la actividad antioxidante por el método ORAC y el ensayo de inhibición del blanqueamiento del β -caroteno, además del método anteriormente utilizado, ABTS.

Mediante el método de inhibición del blanqueamiento del β -caroteno se determinó que tanto el control de enzima como el hidrolizado inhiben dicho proceso en un 50 % pero no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$, test de Tukey) entre ambos tratamientos (**Figura IV.13**). Los resultados numéricos obtenidos para el blanco de sustrato no fueron confiables debido a que se observó opacidad en el tubo de ensayo al final de la reacción, hecho que no permitió un registro correcto de la absorbancia de la muestra. Sin embargo, a simple vista se pudo notar la decoloración en el tubo, por lo que se puede interpretar que no hubo inhibición de la decoloración del β -caroteno.

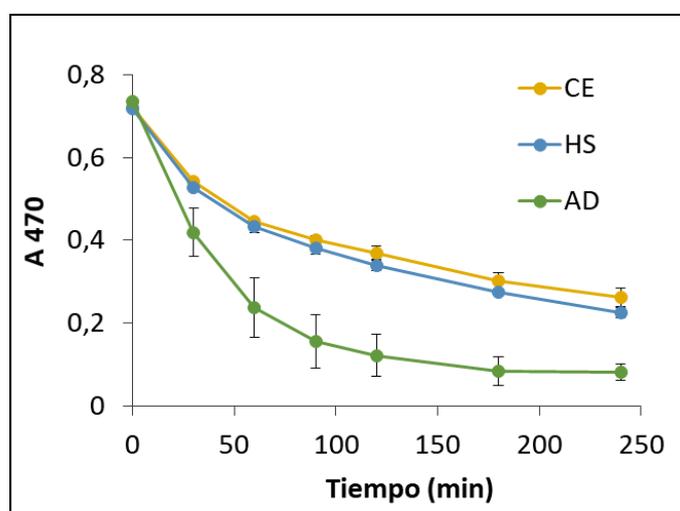


Figura IV.13. Inhibición del blanqueamiento del β -caroteno. CE: control de enzima. HS: hidrolizado de soja. AD: agua destilada.

Por otra parte, los resultados obtenidos por los métodos del ABTS y ORAC (**Figura IV.14**) fueron bastante similares en cuanto a la tendencia observada, aunque los valores expresados en Equivalentes de Trolox fueron muy superiores con el método ORAC. Con ambos métodos se observa una baja actividad antioxidante en el control de enzima, y valores de actividad antioxidante mayores en el hidrolizado cuando se compara con el control de sustrato. Los resultados obtenidos sugieren que el método ORAC es más sensible para determinar esta actividad en las muestras seleccionadas y que el método de inhibición del blanqueamiento del β -caroteno carece de utilidad para el estudio de estas muestras.

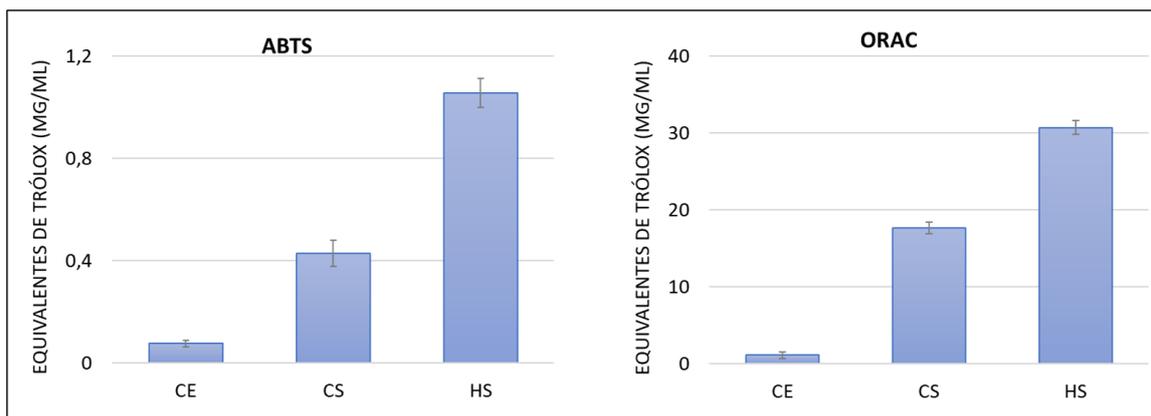


Figura IV.14. Capacidad antioxidante según los métodos ABTS y ORAC (inhibición de radicales). CE: control de enzima. CS: control de sustrato. HS: hidrolizado de soja.

IV.3.3.1 Fraccionamiento de los hidrolizados seleccionados

Con el objetivo de estudiar perfiles peptídicos de los hidrolizados, se realizaron cromatografías de exclusión molecular, utilizando una columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE). Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los hidrolizados seleccionados y de sus controles. En el caso de los hidrolizados y controles de lactosuero, las muestras se analizaron sin filtrar y filtradas con 3 kDa. Las fracciones retenidas fueron detectadas siguiendo su A_{215} y A_{280} , longitudes de onda a la cual absorben el enlace peptídico y los aminoácidos aromáticos, respectivamente.

IV.3.3.1.1 Hidrolizado seleccionado por su AA

En la **Figura IV.15** se detallan los perfiles de absorbancia a 280 y 215 nm correspondientes al control de sustrato (líneas continuas) y al hidrolizado seleccionado de soja (líneas punteadas). Se pueden identificar dos picos principales a los 16 y 34 min de retención, siendo el primero considerablemente más intenso que el segundo. En los perfiles obtenidos para el hidrolizado se observa la desaparición casi por completo del pico mayoritario presente en el control de sustrato y el aumento de la intensidad principalmente de la A_{215} entre los 20 y 40 min de retención. Esto se puede relacionar con lo observado en los geles de electroforesis donde se aprecia la degradación casi total de las proteínas principales presentes en el aislado proteico de soja.

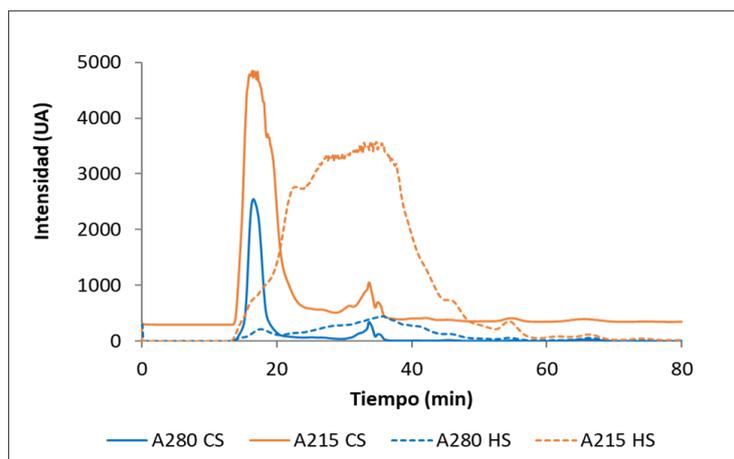


Figura IV.15. Perfiles cromatográficos (Superdex peptide, GE) del hidrolizado de soja seleccionado (HS, líneas punteadas) y su respectivo control de sustrato (CS, líneas continuas). Los colores celeste y naranja corresponden a la A₂₈₀ y A₂₁₅, respectivamente.

Para determinar la capacidad antioxidante de las fracciones cromatográficas, se colectaron alícuotas de 3 ml entre los 15 y 120 min de retención, se liofilizaron y resuspendieron en un volumen correspondiente al 10 % respecto al volumen de partida. Se midió la actividad antioxidante por los métodos ABTS y ORAC. Los resultados fueron coherentes con lo observado en la **sección IV.3.3** con respecto a la sensibilidad del método ORAC, ya que arrojó valores de AA mucho más elevados comparado con los obtenidos por ABTS. Sin embargo, con ambos métodos se detectó que las fracciones RT=27-33 min y RT=33-39 min son las más activas, por lo que se seleccionaron para continuar con estudios por espectrometría de masas. En la **Tabla IV.20** se resumen los resultados expresados en Equivalentes de Trólox (mg/ml) correspondientes a las fracciones en las que se detectó AA.

Tabla IV.20. Actividad antioxidante de las fracciones cromatográficas (mg/ml de Trólox). Se resaltan en negrita los valores máximos.

RT (min)	ABTS	ORAC
15-21	0,15 ± 0,01	3,12 ± 0,63
21-27	0,17 ± 0,01	2,90 ± 0,11
27-33	0,34 ± 0,01	3,93 ± 0,49
33-39	0,25 ± 0,01	4,92 ± 0,32
39-45	0,18 ± 0,02	3,50 ± 0,43
45-51	0,11 ± 0,01	2,49 ± 0,05
51-57	0,04 ± 0,01	0,96 ± 0,45

Por espectrometría de masas se lograron identificar y secuenciar por fragmentación (ESI-Orbitrap) 27 péptidos correspondientes a la fracción más activa del hidrolizado de soja seleccionado (RT=27-39 min). Si bien esta muestra fue analizada por su actividad antioxidante, se encontró un péptido reportado en la base de datos BiopepDB como antihipertensivo (EDENNPfYLR; Kodera & Nio, 2006). Se encontró un péptido que está contenido en una secuencia de un péptido reportado como antioxidante en la base de datos BIOPEP-UWM (LQSGDALRVPSGTTY; Chen *et al.*, 1995). Para complementar el análisis se calculó el porcentaje de residuos de aminoácidos antioxidantes, considerando que los aminoácidos Thr, Met, Cys, Phe, Tyr, His, Gly, Trp, Ala, Val, Leu, and Lys (T, M, C, F, Y, H, G, W, A, V, L, y K, respectivamente) son los responsables de la capacidad antioxidante de los péptidos que los contienen (Reyes Jara *et. al*, 2018). Se encontraron 9 péptidos con porcentajes de aminoácidos antioxidantes igual o mayor al 50 %, resaltados con negrita en la **Tabla IV.21**.

Tabla IV.21. Péptidos secuenciados por ESI-Orbitrap y su porcentaje de aminoácidos antioxidantes. MH+ [Da]: masa molecular del ion monocargado. aac: aminoácidos. AA: actividad antioxidante.

Proteína precursora (UniProt)	Secuencia aminoacídica	MH+ [Da]	Carga	m/z [Da]	N° aa	N° aac AA	% de aac AA
β-conglicinina subunidad 2 (G. max) F7J077	SSNS FQTLFENQNGRIR	1997,97878	3	666,66443	17	5	29
	SSNS FQTLFENQNGRIRLLQR	2508,30659	4	627,83221	21	7	33
	TI SEDEPF N LR	1407,67505	2	704,34076	12	3	25
	EDENNP F YLR	1296,58551	2	648,79706	10	3	30
	EQIR Q LSR	1029,57997	2	515,29559	8	1	13
	K TISEDEPF N LR	1535,77001	3	512,59576	13	4	31
	V REDENNP F YLR	1551,75503	3	517,92328	12	4	33
Proteína no caracterizada (G. max) AOA0R0KK84	NNNP F S F LVPPQESQR	1873,91914	2	937,46222	16	4	25
	NNNP F S F LVPPQESQRR	2030,02025	3	677,34558	17	4	24
	SQSDN F E Y V S FK	1450,6485	2	725,82849	12	5	42

	EAFGVNMQIVR	1263,65142	2	632,32959	11	5	45
Glicina G4 (<i>G. max</i>) P02858	NGIYSPHWNLNANSVIYVTR	2318,16764	3	773,39423	20	10	50
	ISTLNSLTLPALR	1398,83149	2	699,91895	13	7	54
	AIPSEVLAHSYNLR	1569,83837	3	523,95123	14	7	50
Inhibidor de tripsina tipo Kunitz (<i>G.</i> <i>max</i>) Q39898	IERVSDDEFNNYK	1628,75509	3	543,59009	13	3	23
	IGENKDAMDGWFR	1538,70564	3	513,5741	13	6	46
	IGENKDAMDGWFR	1554,70055	3	518,90497	13	6	46
	IGENKDAMDGWFRLEK	1936,93341	4	484,98868	16	7	44
Proteína no caracterizada (<i>G. max</i>) C6SWW4	LAARDTVDGWFNIER	1762,88711	3	588,30048	15	8	53
	LAARDTVDGWFNIERSR	2105,08866	4	527,02753	18	9	50
β -conglucina subunidad (<i>G. max</i>) P11827	QQQEEQPLEVR	1383,68628	2	692,3465	11	2	18
	TISSDKPFNLR	1406,72742	3	469,58099	12	4	33
	KTISSDKPFNLR	1534,82238	3	512,27924	13	5	38
β -conglucina subunidad α_1 (<i>G. max</i>) P0D016	TISSDKPFNLR	1406,72742	3	469,58099	12	4	33
	KTISSDKPFNLR	1534,82238	3	512,27924	13	5	38
	LQSGDALR	859,46321	2	430,23572	8	4	50
Proteína no caracterizada (<i>G. max</i>) I1KYW3	NGFIYYVLP AIRGN GGGIER	2166,14545	3	722,72125	20	11	55
	NGFIYYVLP AIR	1425,7889	3	475,93472	12	7	58
Glicina G3 (<i>G. max</i>) P11828	NNNPF SFLVPPKESQR	1873,95552	3	625,32355	16	5	31
	SQSDNFEYVSFK	1450,6485	2	725,82849	12	5	42

Lipoxigenasa (<i>G. max</i>) B3TDK6	GSAEYEELR	1053,48473	2	527,24609	9	3	33
	LPTDILSK	886,52441	2	443,76538	8	4	50
	YREEELHNL	1358,68114	3	453,56522	10	4	40
Proteína no caracterizada (<i>G. max</i>) I1JF86	LFNQNEGSIFKISR	1780,93406	3	594,31726	15	5	33
	LERLFNQNEGSIFK	1822,94462	3	608,31891	15	6	40

IV.3.3.1.2 Hidrolizado con actividad inhibitoria de la ECA

El hidrolizado de LAC obtenido a 45 °C con enzimas de *B. hieronymi*, seleccionado por su actividad inhibitoria de la ECA, fue ultrafiltrado empleando tubos Millipore con tamaño de corte de 3 kDa, debido a que los péptidos antihipertensivos suelen encontrarse en ese rango de masas. Se corroboró la actividad inhibitoria de la ECA de la muestra filtrada, la cual fue de $74 \pm 1\%$.

Como se observa en la **Figura IV.16**, los perfiles cromatográficos obtenidos (A_{280} y A_{215}) correspondientes al control de sustrato muestran dos picos principales a tiempos de retención (RT) alrededor de 20 y 40 min. Siguiendo la A_{215} también se pueden identificar otros picos de menor intensidad a RT entre 31-34 min. Cuando se compara con los perfiles obtenidos para el hidrolizado, se puede observar la saturación de la señal a 215 nm entre los 20 y 40 min de retención, lo que evidencia la aparición de péptidos como producto de la hidrólisis. También se puede observar la aparición de tres picos menos intensos pero definidos a RTs de 45, 51 y 58 min. Por otra parte, los perfiles de A_{280} evidencian la desaparición del pico observado a RT:20 min en el control de sustrato, y el aumento de la intensidad en la A_{280} entre los 20 y 40 min de retención, cuando se compara con el perfil obtenido para dicho control, además de la aparición de un pico a RT: 45 min.

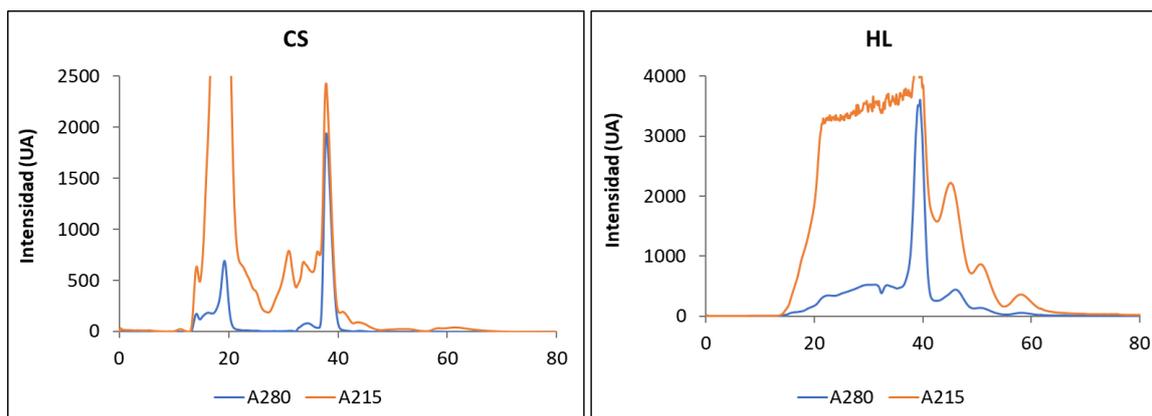


Figura IV.16. Perfiles cromatográficos (Superdex peptide, GE) del hidrolizado de lactosuero seleccionado (HL) y su respectivo control de sustrato (CS).

Con el objetivo de identificar las fracciones con mayor actividad inhibitoria de la ECA, se colectaron alícuotas de 1,5 ml entre 25-56 min de retención, siguiendo la A₂₁₅. Las fracciones se liofilizaron y concentraron 10 veces para luego ensayar la actividad inhibitoria de la ECA. Los resultados obtenidos muestran que todas las fracciones colectadas inhiben en un 70 % a la ECA, tomando como referencia al blanco de enzima (100 % actividad o 0 % de inhibición), y se seleccionó la fracción que inhibe en un mayor porcentaje a la ECA (82 % inh) para continuar con los estudios por espectrometría de masas.

Mediante estudios de espectrometría de masas se logró identificar y secuenciar por fragmentación (ESI-Orbitrap) siete péptidos, de los cuales cuatro provienen de la autoproteólisis de la Hieronymaína II (D2U6V5) y tres son producto de la degradación de la β -lactoglobulina (P02755) (**Tabla IV.22**). De los péptidos derivados del sustrato, sólo uno se encuentra reportado en la base de datos BIOPEP-UWM como inhibitorio de la ECA, cuya secuencia es ELKPTPEGDLEIL (Udechukwu *et al.*, 2021). Según la bibliografía, su función inhibitoria está directamente relacionada con la capacidad quelante. La enzima convertidora de angiotensina I es una enzima que utiliza Zinc(II) como cofactor, por lo tanto, en presencia de dichos péptidos se produce la inhibición de la misma (De Olivera *et al.*, 2021; Cushman & Ondetti, 1999). Los otros dos péptidos secuenciados fueron **ELKPTPEGDLEILLQ**, el cual contiene en su secuencia al péptido antihipertensivo reportado por Udechukwu *et al.* (2021), y ELKPTPE, que podría derivar de la degradación de algunos de los anteriores. Según Kochańczyk *et al.* (2015), los dominios proteicos que unen Zn(II) se caracterizan por la coordinación de este ion con el nitrógeno de la histidina (H), el azufre de la cisteína (C) y el oxígeno del aspartato (D) o del glutamato (E). Los tres péptidos secuenciados, provenientes de la fracción (exclusión molecular) del hidrolizado de lactosuero,

contienen al menos dos de estos aminoácidos lo que puede relacionarse con su elevada actividad inhibitoria de la ECA.

Tabla IV.22. Péptidos secuenciados por ESI-Orbitrap.

Proteína precursora	Secuencia aminoacídica	MH+ [Da]	Carga	m/z [Da]
β -lactoglobulina P02755	ELKPTPE	813,43526	2	407,2215
	ELKPTPEGDLEIL	1453,77845	2	727,3927
	ELKPTPEGDLEILLQ	1694,92109	2	847,9646

IV.4 Conclusiones

En el desarrollo de este capítulo se prepararon hidrolizados de aislado proteico de soja, lactosuero y caseína, utilizando enzimas de *B. serra* y de *B. hieronymi*. En todos los casos se obtuvo mayor hidrólisis a 55 °C que a 45 °C, evidenciado mediante ELF, con una mayor preferencia por el sustrato caseína. Se utilizaron dos métodos para medir el grado de hidrólisis, resultando más conveniente el ensayo del OPA por su practicidad y seguridad de los reactivos en comparación con el método del TNBS. De todas maneras, en el caso de los hidrolizados de LAC, es necesario corroborar mediante ELF, ya que las muestras presentan agregados lo que dificulta su correcta medición utilizando métodos espectrofotométricos.

En cuanto a los hidrolizados obtenidos con enzimas de *B. serra*, el de LAC a 55 °C fue el que presentó la mayor actividad inhibitoria de la ECA respecto de su control de sustrato (67 ± 1 y 41 ± 6 %, respectivamente). Los hidrolizados de CAS presentaron la actividad antioxidante más elevada, aunque el hidrolizado de LAC obtenido a 55 °C fue el que mostró mayor diferencia respecto a su control de sustrato, por lo que se considera que en este último hubo una mayor liberación de péptidos antioxidantes debido a la hidrólisis.

En el caso de los hidrolizados obtenidos con *B. hieronymi*, la actividad antioxidante fue mayor en los hidrolizados de CAS de 30 min ($9,5 \pm 0,86$ y $10,5 \pm 0,06$ mg/ml Trólox para 45 y 55 °C, respectivamente) aunque debido a que el sustrato en sí mismo presentó elevada actividad, se decidió continuar los estudios con el hidrolizado de SOJ obtenido luego de 180 min de hidrólisis a 45 °C ya que, fue el que presentó una diferencia mayor con respecto al control de sustrato y un valor elevado de equivalentes de Trólox. La actividad inhibitoria de la ECA fue máxima para el hidrolizado de lactosuero de 45 °C por lo que fue seleccionado para continuar el análisis.

Los hidrolizados de SOJ y LAC de 180 min obtenidos con el PER Bh B a 45 °C se fraccionaron mediante cromatografía de exclusión molecular y las fracciones más activas fueron analizadas mediante espectrometría de masas. Se logró secuenciar 27 péptidos obtenidos a partir de SOJ de los cuales ninguno ha sido reportado previamente como antioxidante, sin embargo, se analizó la composición aminoacídica de las secuencias peptídicas, lo que permitió determinar que nueve péptidos presentan más del 50 % de aminoácidos con carácter antioxidante. Por otra parte, se secuenciaron siete péptidos obtenidos a partir de LAC, de los cuales sólo uno ha sido reportado previamente como inhibitorio de la ECA, y se determinó la secuencia de un péptido que difiere únicamente en un aminoácido con dicho péptido, lo que justifica la elevada inhibición de la ECA

de la muestra analizada. Por lo tanto, se identificaron secuencias peptídicas promisoras, lo que constituye un punto de partida en el estudio de nuevos péptidos bioactivos.

IV.5 Bibliografía

Adjonu R, Doran G S, Torley P, Sampson G O and Agboola S O (2022). Whey protein peptides have dual functions: Bioactivity and emulsifiers in oil-in-water nanoemulsion. *Food* 11 1812.

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 27(6), 1256-1262.

Alves de Souza, S. M., Hernández-Ledesma, B., & de Souza, T. L. F. (2022). Lunasin as a Promising Plant-Derived Peptide for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9548.

Asledottir, T., Le, T. T., Petrat-Melin, B., Devold, T. G., Larsen, L. B., & Vegarud, G. E. (2017). Identification of bioactive peptides and quantification of β -casomorphin-7 from bovine β -casein A1, A2 and I after ex vivo gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 71, 98-106.

Athira, S., Mann, B., Sharma, R., Pothuraju, R., & Bajaj, R. K. (2021). Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: An alternative approach for chemical iron fortification. *Food Research International*, 141, 110133.

Bajali Raja, R., Arunachalam, K. D., & Arunachalam, A. M. (2010). Protective Effect of Casein Phosphopeptides derived from fermented milk on the mortality rate and weight loss of Albino mice infected with *Escherichia coli*. *International Journal of engineering science and technology*, 2(3), 247-252.

Bertucci, J. I. (2012). *Búsqueda de péptidos bioactivos en hidrolizados de lactosuero bovino obtenidos empleando fitopeptidasas* (Tesina de grado, Universidad Nacional de La Plata).

Bertucci, J. I., Liggieri, C. S., Colombo, M. L., Cavalli, S. E. V., & Bruno, M. A. (2015). Application of peptidases from *Maclura pomifera* fruit for the production of active biopeptides from whey protein. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 157-163.

Bertucci, J. I., Salese, L., Liggieri, C. S., Garrote, G. L., Bruno, M. A. (2023). Preparation of whey protein hydrolysates with ACE-inhibitory activity using cysteine peptidases from *Bromelia hieronymi* Mez. (Bromeliaceae). *International Journal of Dairy Technology*. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12943>.

Birkemo, G. A., O'Sullivan, O., Ross, R. P., & Hill, C. (2009). Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 233-240.

Bruno, M. A., Lazza, C. M., Errasti, M. E., López, L. M., Caffini, N. O., & 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.

Calvo, M., (2009), "Bioquímica de los alimentos". <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/lactosuero.html> 21/05/2012.

Carmona, A. K., Schwager, S. L., Juliano, M. A., Juliano, L., & Sturrock, E. D. (2006). A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nature protocols*, 1(4), 1971-1976.

Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.

Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients* 2018, Vol. 10, Page 1738, 10(11), 1738. <https://doi.org/10.3390/NU10111738>.

Chen, H. M., Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from Soybean. beta.-Conglycinin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(3), 574-578.

Cheung, H. S. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 255, 401-407.

Church, F. C., Porter, D. H., Catignani, G. L., & Swaisgood, H. E. (1985). An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical biochemistry*, 146(2), 343-348.

Correa, F. F., Vieira, M. C., Yamamoto, D. R., Speridião, P. D. G. L., & Morais, M. B. D. (2010). Open challenge for the diagnosis of cow's milk protein allergy. *Jornal de Pediatria*, 86, 163-163.

Corredig, M., Nair, P. K., Li, Y., Eshpari, H., & Zhao, Z. (2019). Invited review: Understanding the behavior of caseins in milk concentrates. *Journal of Dairy Science*, 102(6), 4772-4782. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15943>.

Corrons, M. A., Liggieri, C. S., Trejo, S. A., & Bruno, M. A. (2017). ACE-inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclura pomifera* latex. *Food research international*, 93, 8-15.

Cushman, D. W., & Ondetti, M. A. (1999). Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature Medicine*, 5(10), 1110-1112. doi:10.1038/13423

D'Auria, E., Salvatore, S., Acunzo, M., Peroni, D., Pendezza, E., Di Profio, E., ... & Verduci, E. (2021). Hydrolysed formulas in the management of cow's milk allergy: new insights, pitfalls and tips. *Nutrients*, 13(8), 2762.

Daliri, E. B. M., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive Peptides. *Foods* 2017, Vol. 6, Page 32, 6(5), 32. <https://doi.org/10.3390/FOODS6050032>

De Oliveira, T. V., Guimarães, A. P., Bressan, G. C., Maia, E. R., Coimbra, J. S. D. R., Polêto, M. D., & De Oliveira, E. B. (2021). Structural and molecular bases of angiotensin-converting enzyme inhibition by bovine casein-derived peptides: an in silico molecular dynamics approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(4), 1386-1403.

Di Benedetto, N. A., Alfarano, M., Laus, M. N., Caporizzi, R., Soccio, M., Robbe, C., ... & Pastore, D. (2015). Antioxidant capacity of durum wheat large flour particles may be evaluated by QUENCHER ABTS assay by adopting a proper calculation mode. *Cereal Research Communications*, 43(4), 682-691.

Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Mota, M. V., Tavares, P., Pereira, A., Goncalves, M. P., ... & Teixeira, J. A. (2007). Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 17(5), 481-487.

Gil Zamora M., (2007), "Industrialización de Proteínas del Lactosuero". Ingeniería de Alimentos, Revista ReCiTeIA v.8, nº 1, 2007. Universidad del Valle, Cali – Colombia. <http://revistareciteia.es.tl/>.

Gui, M., Gao, L., Rao, L., Li, P., Zhang, Y., Han, J. W., & Li, J. (2022). Bioactive peptides identified from enzymatic hydrolysates of sturgeon skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(5), 1948-1957.

Guzmán-Rodríguez, F., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Alatorre-Santamaría, S., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2019). Iron binding and antithrombotic peptides released during the fermentation of milk by *Lactobacillus casei* shirota. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(3), 1161-1165.

Hag, M. R. U., Kapila, R., & Saliganti, V. (2014). Consumption of β -casomorphins-7/5 induce inflammatory immune response in mice gut through Th2 pathway. *Journal of functional foods*, 8, 150-160.

Hao, X., Yang, W., Zhu, Q., Zhang, G., Zhang, X., Liu, L., ... & Jiang, X. (2021). Proteolysis and ACE-inhibitory peptide profile of Cheddar cheese: Effect of digestion treatment and different probiotics. *Lwt*, 145, 111295.

Henda Y B, Labidi A, Arnaudin I, Bridiau N, Delatouche R, Maugard T, Piot J M, Sannier F, Thíéry V and Bordenave-Juchereau S (2013). Measuring angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity by micro plate assays: Comparison using marine cryptides and tentative threshold determinations with captopril and losartan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 10685–10690.

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., & Bartolomé, B. (2007). ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f (19– 25). Interactions with ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3392-3397.

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., & Amigo, L. (2008). β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino acids*, 35, 257-265.

Hull, M. E. (1947). Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci*, 30, 881.

Ikonen, T., & Ojala, M. (1995). Effect of milk protein genotypes on milk renneting properties assuming alternative models. *IDF Bulletin*, 304, 16-17.

Ismail, B. & Nielsen, S. S. (2010). Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 93 4999–5009.

Jiehui, Z., Liuliu, M., Haihong, X., Yang, G., Yingkai, J., Lun, Z., ... & Shaohui, Z. (2014). Immunomodulating effects of casein-derived peptides QEPVL and QEPV on lymphocytes in vitro and in vivo. *Food & function*, 5(9), 2061-2069.

Jing, P., Qian, B., He, Y., Zhao, X., Zhang, J., Zhao, D., ... & Deng, Y. (2014). Screening milk-derived antihypertensive peptides using quantitative structure activity relationship (QSAR)

modelling and in vitro/in vivo studies on their bioactivity. *International dairy journal*, 35(1), 95-101.

Kim, G. N., Jang, H. D., & Kim, C. I. (2007). Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using Alcalase. *Food Chemistry*, 104(4), 1359-1365.

Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1309-1323.

Kochańczyk, T., Drozd, A., & Krężel, A. (2015). Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins—insights into zinc regulation. *Metallomics*, 7(2), 244-257.

Kodera, T., & Nio, N. (2006). Identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates by a soybean protease and the antihypertensive effects of hydrolysates in 4 spontaneously hypertensive model rats. *Journal of food science*, 71(3), C164-C173.

Korish, A. A., Gader, A. G. M. A., & Alhaider, A. A. (2020). Comparison of the hypoglycemic and antithrombotic (anticoagulant) actions of whole bovine and camel milk in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Journal of dairy science*, 103(1), 30-41.

Kuipers, B. J., Alting, A. C., & Gruppen, H. (2007). Comparison of the aggregation behavior of soy and bovine whey protein hydrolysates. *Biotechnology advances*, 25(6), 606-610.

Maes, W., Van Camp, J., Vermeirssen, V., Hemeryck, M., Ketelslegers, J. M., Schrezenmeir, J., ... & Huyghebaert, A. (2004). Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory peptides*, 118(1-2), 105-109.

Matsui, T., Tamaya, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumoto, K., & Kawasaki, T. (2002). Val-Tyr As A Natural Antihypertensive Dipeptide Can Be Absorbed Into The Human Circulatory Blood System. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29(3), 204-208. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1681.2002.03628.X>

Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suarez, J. C., & Yada, R. Y. (2017). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(13), 2147-2163.

Meza-Espinoza, L., Sayago-Ayerdi, S., García-Magaña, M., Tovar-Pérez, E, ...Vallejo-Córdoba, B. (2018). Antioxidant capacity of egg, milk and soy protein hydrolysates and biopeptides produced by Bromelia pin|n and Bromelia karatas-derived proteases. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 122-130.

Miao, J., Liao, W., Pan, Z., Wang, Q., Duan, S., Xiao, S., ... & Cao, Y. (2019). Isolation and identification of iron-chelating peptides from casein hydrolysates. *Food & function*, 10(5), 2372-2381.

Mohan, A., McClements, D. J., & Udenigwe, C. C. (2016). Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. *Food Chemistry*, 213, 143-148.

Mullally, M. M., Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS letters*, 402(2-3), 99-101.

Nakahara, T., Sano, A., Yamaguchi, H., Sugimoto, K., Chikata, H., Kinoshita, E., & Uchida, R. (2010). Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 821-827.

Nguyen, D. D., Johnson, S. K., Buseti, F., & Solah, V. A. (2015). Formation and degradation of beta-casomorphins in dairy processing. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(14), 1955-1967.

Nguyen, D. D., Solah, V. A., Johnson, S. K., Nguyen, H. A., Nguyen, T. L. D., Tran, T. L. H., ... & Buseti, F. (2019). Identification and quantification of beta-casomorphin peptides naturally yielded in raw milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *LWT*, 111, 465-469.

Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of food science*, 66(5), 642-646.

Nielsen, S. S. (2002). Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 6628–6634.

Nkonge, C., & Ballance, G. M. (1982). A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(3), 416-420.

Nurminen, M. L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., ... & Vapaatalo, H. (2000). α -Lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 66(16), 1535-1543.

Ortiz, S. E. M., & Wagner, J. R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food research international*, 35(6), 511-518.

Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical biochemistry*, 100(2), 201-220.

Puchalska, P., Marina Alegre, M. L., & Garcia Lopez, M. C. (2015). Isolation and characterization of peptides with antihypertensive activity in foodstuffs. *Critical reviews in food Science and Nutrition*, 55(4), 521-551.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Reyes Jara, A. M., Corrons, M. A., Salese, L., Liggieri, C. S., & Bruno, M. A. (2021). Peptidases from *Maclura Pomifera* for preparation of food protein hydrolysates: Purification by

single-step chromatography and characterization of Pomiferin I. *Applied biochemistry and biotechnology*, 193, 619-636.

Reyes Jara, A. M., Liggieri, C. S., & Bruno, M. A. (2018). Preparation of soy protein hydrolysates with antioxidant activity by using peptidases from latex of *Maclura pomifera* fruits. *Food chemistry*, 264, 326-333.

Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food quality and safety*, 1(1), 29-46.

Sánchez-Vega, R., & Sepúlveda-Ahumada, D. R. (2020). Proteínas y péptidos lácteos en Valenzuela Báez, R. (Ed.) *Lácteos: nutrición y salud*. Autoedición.

Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.

Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functional foods*, 14, 111-125.

Serpen, A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012). Solvent effects on total antioxidant capacity of foods measured by direct QUENCHER procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 52-57.

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC international*, 91(4), 914-931.

Sienkiewicz-Szłapka, E., Jarmołowska, B., Krawczuk, S., Kostyra, E., Kostyra, H., & Iwan, M. (2009). Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *International Dairy Journal*, 19(4), 258-263.

Spotti, M. J., Tarhan, Ö., Schaffter, S., Corvalan, C., & Campanella, O. H. (2017). Whey protein gelation induced by enzymatic hydrolysis and heat treatment: Comparison of creep and recovery behavior. *Food Hydrocolloids*, 63, 696-704.

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.

Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., & Sokmen, A. (2005). In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food chemistry*, 92(1), 89-92.

Terashima, M., Oe, M., Ogura, K., & Matsumura, S. (2011). Inhibition strength of short peptides derived from an ACE inhibitory peptide. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(20), 11234-11237.

Treweek, T. M. (2012). Alpha-casein as a molecular chaperone. *Milk protein*, 85-119.

Udechukwu, M.C., Dang, C. & Udenigwe, C.C. Identification of zinc-binding peptides in ADAM17-inhibiting whey protein hydrolysates using IMAC-Zn²⁺ coupled with shotgun

peptidomics. *Food Prod Process and Nutr* 3, 5 (2021). <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00048-4>.

Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of food science*, 77(1), R11-R24.

Villadóniga, C., Macció, L. & Cantera, A.M.B. (2018). Acid whey proteolysis to produce angiotensin-I converting enzyme inhibitory hydrolyzate. *Environmental Sustainability* 1, 267–278. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0027-x>

Wang, T. Y., Hsieh, C. H., Hung, C. C., Jao, C. L., Lin, P. Y., Hsieh, Y. L., & Hsu, K. C. (2017). A study to evaluate the potential of an *in silico* approach for predicting dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity in vitro of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 234, 431-438.

Wang, X., Wang, J., Lin, Y., Ding, Y., Wang, Y., Cheng, X., & Lin, Z. (2011). QSAR study on angiotensin-converting enzyme inhibitor oligopeptides based on a novel set of sequence information descriptors. *Journal of molecular modeling*, 17, 1599-1606.

Waterborg, J. H. (2009). The Lowry method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, 7-10.

Wölk, M., Milkovska-Stamenova, S. & Hoffmann, R. (2020). Comprehensive profiling of the native and modified peptidomes of raw bovine milk and processed milk products. *Food*, 9 1841.

Worsztynowicz, P., Białas, W., & Grajek, W. (2020). Integrated approach for obtaining bioactive peptides from whey proteins hydrolysed using a new proteolytic lactic acid bacteria. *Food chemistry*, 312, 126035.

Wu, J., & Aluko, R. E. (2007). Quantitative structure-activity relationship study of bitter di- and tri-peptides including relationship with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 13(1), 63-69.

Wu, J., Aluko, R. E., & Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure– activity relationship study of di- and tripeptides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3), 732-738.

Xu, Q., Hong, H., Wu, J., & Yan, X. (2019). Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 399-411.

Yoshikawa, M. (2015). Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. *Peptides*, 72, 208-225. 174

Zhang, P., Chang, C., Liu, H., Li, B., Yan, Q., & Jiang, Z. (2020). Identification of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate by the protease of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Functional Foods*, 65, 103751.

Zheng, L., Regenstein, J. M., Zhou, L., & Wang, Z. (2022). Soy protein isolates: A review of their composition, aggregation, and gelation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 1940–1957. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12925>.

Capítulo V

ENCAPSULAMIENTO DE PÉPTIDOS

En este capítulo se aborda el objetivo N° 5, en lo que respecta al encapsulamiento de péptidos bioactivos contenidos en los hidrolizados obtenidos a partir de proteínas alimentarias y enzimas de bromelias autóctonas.

V.1 Introducción

V.1.1 Almidones naturales

Los almidones son homopolisacáridos cuya unidad monómero es la glucosa. Son sintetizados en diferentes tipos de tejidos vegetales, constituyendo la principal reserva energética en el reino Plantae. Estructuralmente, los almidones son macromoléculas complejas que contienen dos tipos de polímeros de glucosa: la amilosa y la amilopectina. Dentro de las células, se organizan en gránulos de gran tamaño, que generalmente se almacenan en órganos especializados, por ejemplo, en tubérculos como la papa y en semillas como es el caso del trigo. Las variaciones en el tamaño de los gránulos ($\sim 1\text{--}100\ \mu\text{m}$ de diámetro), la forma (circular, lenticular, poligonal), la distribución de tamaño, entre otras características, son típicos de cada especie y por lo tanto reflejan su origen botánico (Nelson & Cox, 2008; Tester *et al.*, 2004).

V.1.1.1 Gelatinización y retrogradación del almidón

El almidón generalmente se presenta en gránulos rígidos, insolubles en agua. Parte de la amilopectina está formando regiones microcristalinas que le dan considerable rigidez al gránulo. Si los gránulos de almidón se calientan en exceso de agua se produce un fenómeno denominado **gelatinización**. Esto implica hinchamiento de los gránulos (absorben varias veces su peso de agua), fusión de los microcristales y lixiviación por parte de la amilosa. Los gránulos hinchados permanecen intactos cuando se enfrían, a menos que el sistema se agite vigorosamente. Las suspensiones diluidas de almidón gelatinizado gelifican de modo parecido a la amilosa, es decir, la amilosa lixiviada forma una red en la que quedan atrapados los gránulos hinchados (Fennema, 1992; Ratnayake & Jackson, 2008).

Una disolución de almidón gelatinizado concentrada (de 5 a 15 %, según el tipo de almidón) forma un gel de un tipo muy distinto al formado por las disoluciones diluidas. Los gránulos se hinchan hasta que el agua llena virtualmente todo su volumen, deformándose unos a otros en el proceso. Los gránulos hinchados, especialmente en el caso del almidón de papa, se entrelazan y entre ellos se dispone una capa fina de una disolución de amilosa gelificada que constituye una especie de pegamento intergranular (Fennema, 1992).

Durante el almacenamiento de los geles de almidón concentrado, los gránulos sufren una importante reorganización. Se trata de una cristalización parcial que tiene lugar más deprisa cuanto más baja sea la temperatura, siempre que no sobrepase a la de congelación. En estas condiciones, aumenta el número (y en especial la fuerza) de las zonas de unión microcristalinas, volviendo a los gránulos y al gel más rígidos. A este proceso se lo denomina **retrogradación** (Fennema, 1992).

V.1.1.2 Estructura química

La amilosa está conformada por cadenas lineales de residuos de D-glucosa que se encuentran unidos por enlaces α (1 \rightarrow 4) (**Figura V.1 a**). Cada cadena de polímero contiene miles de residuos de D-glucosa. Por su parte, la amilopectina también está formada por residuos de glucosa unidos por enlaces α (1 \rightarrow 4), pero se encuentra altamente ramificada, a diferencia de la amilosa. Estas ramificaciones aparecen cada 24-30 residuos y se unen a las cadenas lineales mediante enlaces α (1 \rightarrow 6) (**Figura V.1 b**) (Nelson & Cox., 2008; Sadava *et al.*, 2010).

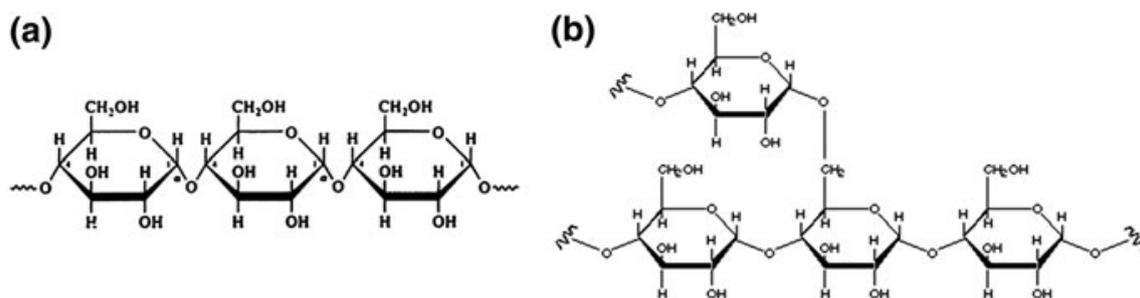


Figura V.1. Estructura química de la amilosa **(a)** y de la amilopectina **(b)**. Tomado de Vazquez, *et al.* (2012).

V.1.2 Complejos de inclusión con almidones

El proceso de encapsulamiento consiste en incorporar moléculas tales como ácidos grasos, péptidos, *flavors*, fármacos, entre otras, dentro de una microcápsula que puede estar constituida por diversas matrices (Nedovic *et al.*, 2011).

Desde hace décadas se han utilizado técnicas de encapsulamiento con la finalidad de estabilizar y proteger moléculas sensibles a la degradación, pudiendo emplearse para tales fines polímeros como los almidones ricos en amilosa y almidones resistentes. El almidón comercial Hylon VII (70 % de amilosa) se considera dentro de la gama de almidones denominados

resistentes (Agama-Acevedo *et al.*, 2018). Numerosos artículos destacan su capacidad de protección frente a procesos de degradación por su habilidad para formar complejos de inclusión y para modular la liberación de los componentes encapsulados, empleándose para diseñar sistemas de liberación controlada (Rodríguez & Bernik, 2014).

Si se pretende encapsular moléculas que luego serán suministradas por vía oral se debe tener en cuenta un mecanismo de protección frente al ambiente degradativo del tracto gastrointestinal. En el caso de los péptidos bioactivos, es necesario tener en cuenta este factor, ya que de otra manera el ingreso de estos al torrente sanguíneo, sin sufrir modificaciones estructurales, se vería podría ver afectado (Wang & Selomulya, 2020; Mohan *et al.*, 2015).

V.1.3 Almidones resistentes (RS)

El almidón es una de las principales fuentes de energía en la alimentación humana, y su digestibilidad depende de la actividad enzimática que ocurre en el tracto digestivo. Dependiendo de cómo sucede este proceso el almidón se ha clasificado en almidón de digestión rápida (RDS, *rapidly digestible starch*), almidón de digestión lenta (SDS*, *slowly digestible starch*) y almidón resistente (RS, *resistant starch*). El RDS se puede digerir y absorber por completo en el tracto gastrointestinal superior, el SDS* se digiere lentamente en el intestino delgado ocasionando una liberación lenta y prolongada de glucosa, mientras que el RS es la fracción que escapa a la digestión del tracto gastrointestinal superior y es fermentado de manera similar a la fibra dietética en el intestino grueso por la microflora (Liu *et al.*, 2019). Por su parte, los RSs pueden ser clasificados en 5 tipos, independientemente de que sean naturales o modificados. El RS-1 corresponde al almidón físicamente inaccesible, atrapado en una matriz celular que impide su hinchamiento y dispersión; el RS-2 corresponde a gránulos de almidón nativos resistentes, no sometidos a ningún proceso; el RS-3 refiere a almidón retrogradado, que se puede formar en alimentos cocidos y almacenados, donde se ha iniciado el fenómeno de la retrogradación; el RS-4 constituye almidón modificado por métodos físicos o químicos; y el RS-5 se trata de complejos de almidón y lípidos. Aunque el RS5 se asoció principalmente al complejo amilosa-lípido tipo V, siendo este ampliamente reconocido y aceptado como un tipo de RS, más recientemente han surgido nuevos saberes sobre otros complejos basados en almidón y otros compuestos tales como glicerol, aminoácidos, péptidos, proteínas, polifenoles, y diferentes polisacáridos, entre otros, que se ha considerado que contribuyen al contenido de RS (Silva-Cristóbal *et al.*, 2007; Wang, *et al.*, 2020).

Los complejos de inclusión pueden ser obtenidos mediante autoensamblado, esto quiere decir que los polímeros que formarán la cápsula y las moléculas huésped o ligandos se reorganizan entre sí mediante interacciones no covalentes e interacciones hidrofóbicas dando como resultado los complejos hospedante-huésped. Se ha demostrado que los complejos de almidón autoensamblados desarrollan estructuras más compactas y estables que las pastas de almidón no autoensambladas, lo que da como resultado una degradación enzimática restringida y, por lo tanto, capaz de resistir la digestión gastrointestinal (Gutiérrez & Tovar, 2021).

V.1.4 Complejo de inclusión almidón-iodo

La solución de Lugol fue desarrollada en 1829 por el físico francés Jean Guillaume August Lugol, en principio como una cura para la tuberculosis. Se trata de una solución de iodo elemental e ioduro de potasio en agua destilada. A través de los años se le ha dado diferentes usos en diversas áreas de investigación (Moussavou *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2011; Petruzzi *et al.*, 2010). Una de las aplicaciones del reactivo de iodo corresponde a la identificación y caracterización de almidones. Esto se debe a la formación de complejos que ocurre entre las cadenas de polisacárido y el iodo. Si bien ha pasado más de un siglo desde su primera descripción, la reacción del iodo con el almidón aún sigue siendo estudiada para mejorarla como herramienta diagnóstica por su excepcional utilidad en diferentes campos (Zafer *et al.*, 2021; Gaenssle *et al.*, 2020).

V.2 Materiales y métodos

Con la finalidad de obtener protocolos de encapsulamiento de distintos compuestos de naturaleza peptídica de interés biomédico, se procedió a encapsular tanto las proteasas en estudio, así como también los péptidos provenientes de hidrolizados, aunque la finalidad concreta de este trabajo de tesis se centrará en la segunda opción. Se prevé que el desarrollo de ambas metodologías permita plantear distinto tipo de desafíos y dificultades metodológicas que aporten al conocimiento de las interacciones entre el material encapsulante y los compuestos a incluir en el mismo.

V.2.1 Encapsulamiento de proteasas

Con el objetivo de poner a punto un método de encapsulamiento de compuestos de naturaleza peptídica en almidón, se realizó un procedimiento utilizando inicialmente una solución de proteasas.

V.2.1.1 Obtención del ligando

Se preparó un extracto crudo (Bh B) a partir de frutos de *B. hieronymi*, como se describe en el **Capítulo II**. Dicho extracto conteniendo enzimas proteolíticas fue utilizado como ligando en el proceso de encapsulación que se detalla en los siguientes párrafos. En los ensayos realizados, el Bh B fue utilizado sin diluir y diluido 1 en 10 con buffer de extracción.

V.2.1.2 Material encapsulante

Se utilizó almidón de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, “yuca”, “mandioca”, “tapioca”), en formato de perlas, de la marca “SAGO”, SUNRIGHT SUN CORPORATION (Taiwán). Las perlas de tapioca son un alimento novedoso, conocido popularmente por su utilización en bebidas tipo “bubble tea” y diversos postres. Cuenta con la ventaja de que es un producto con buena aceptación por parte de la mayoría consumidores, incluyendo a aquellos que llevan a cabo una dieta libre de glúten, razones por las que sería sencillo incorporarlo en la alimentación si se lo emplea como encapsulante de compuestos funcionales. Por lo tanto, el desafío sería lograr un buen rendimiento en el proceso de encapsulación utilizando este material (Falade & Akingbala, 2010).

V.2.1.3 Protocolo de encapsulamiento

Se diseñó un experimento para encapsular proteasas presentes en el extracto Bh B utilizando como material encapsulante perlas de mandioca. En primer lugar, se realizó una prueba de absorción para seleccionar el volumen mínimo necesario para embeber completamente las esferas de almidón de mandioca (EM). Se colocaron 6 unidades de EM en un tubo de ensayo de base plana y se adicionaron diferentes volúmenes de Bh B (0,5, 0,7, 1,0, 2,0 y 5,0 ml). Se mantuvieron en contacto durante 3 h, con agitación constante, en cámara fría para evitar la auto-proteólisis. Se realizó un control negativo reemplazando el Bh B por buffer de extracción y un control de autodigestión sometiendo al Bh B a las mismas condiciones de ensayo (3 h, 4 °C, agitación). Una vez transcurridas las 3 h, se descartó la solución remanente que no fue incorporada a las EM y luego éstas fueron lavadas con agua destilada para remover la proteína que no pudo ser absorbida por el almidón.

V.2.1.4 Evaluación del rendimiento

Se midió la actividad caseinolítica como se detalla en el **Capítulo II**, sobre las muestras obtenidas según el inciso anterior. En el caso del control de autodigestión se determinó mediante el protocolo original, mientras que en la muestra problema y el control negativo la actividad se determinó directamente sobre las esferas tratadas con Bh B o buffer, respectivamente. Se determinó la A_{280} en un lector de placas (Infinite Pro M200-TECAN).

V.2.2. Encapsulamiento de péptidos bioactivos

V.2.2.1 Obtención del ligando

Se utilizó el hidrolizado obtenido a partir de LAC de 180 min de hidrólisis con el extracto Bh A, tal como se detalla en el **Capítulo IV**, el cual ha sido estudiado previamente por su actividad inhibitoria de la ECA (Bertucci, 2012; *et al.*, 2023).

El hidrolizado fue centrifugado por 1 min a 12.000 xg , obteniéndose un precipitado en el cual se esperó que queden retenidas las proteínas y péptidos más pesados, y un sobrenadante donde se recuperaron los péptidos más pequeños. El precipitado fue descartado y se continuó trabajando con el sobrenadante ya que en esta fracción se encuentran los péptidos inhibitorios de la ECA, denominado a partir de ahora “ligando”.

V.2.2.2 Elección del material encapsulante

Se utilizó almidón natural de mandioca, denominado a partir de ahora como “AM”. La elección de este encapsulante se debe a que se trata de una materia prima de fácil acceso, de bajo costo y proveniente de producciones regionales. Además, se trata de un ingrediente sin gluten (Falade & Akingbala, 2010), lo que posibilita su utilización en productos sin TACC.

Se empleó almidón de mandioca de tres fuentes diferentes, adquiridos en comercios locales: marca “Femag”, proveniente de Otto Graef, Colonia San Alberto, Capióvi, Misiones, Argentina; marca “Dicomere”, de Almidonera Diesel, Puerto Rico, Misiones, Argentina; y marca “Dimax”, de Dimax Alimentos, Los Boulevares, Córdoba, Argentina.

V.2.2.3 Protocolo de encapsulamiento

Se ensayaron diferentes técnicas de encapsulamiento, con el objetivo de obtener un complejo entre el almidón y los biopéptidos. Se generaron diferentes tipos de RS para garantizar un ambiente protegido que mantenga la estabilidad de las moléculas bioactivas y evitar la degradación gastrointestinal ya que, para ejercer su función, deben llegar intactas al torrente sanguíneo.

V.2.2.3.1 Retrogradación del almidón

Se prepararon suspensiones de AM en agua destilada en diferentes porcentajes (3, 5, y 10 %, p/v), se calentaron a diferentes temperaturas (60-100 °C) durante diferentes períodos (0,5-3 h) con agitación constante. Se mantuvo a 6 °C *overnight*, condiciones en las cuales sucede la retrogradación del almidón. La solución de péptidos a encapsular se agregó luego de la gelatinización del almidón y antes de la retrogradación, en diferentes proporciones. Se realizaron estudios preliminares de liberación de los péptidos utilizando una celda de Franz (**Figura V.2**) con una membrana de tamaño de corte igual a 12 kDa, con agitación magnética. En primer lugar, se llevó a cabo una prueba para verificar que el ligando atravesara la membrana sin obstruirla. Se colocó en el reservorio superior 2 ml de solución de ligando y se llenó el reservorio inferior con agua destilada (17,5 ml). El sistema se mantuvo con agitación magnética mientras se colectaron alícuotas de 0,1 ml a diferentes tiempos, que luego fueron llevadas a un volumen final de 1 ml para determinar por triplicado su A_{280} utilizando un lector de placas.

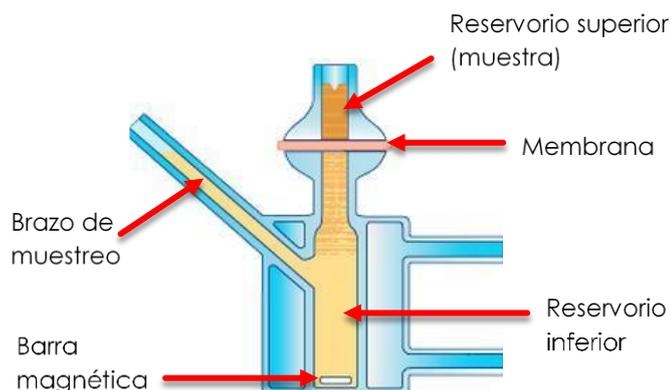


Figura V.2. Esquema de una Celda de Franz.

V.2.2.3.2 Annealing

Con el objetivo de mejorar las capacidades encapsulantes del almidón, se realizó un tratamiento hidrotérmico denominado “*annealing*”. Este proceso consiste en calentar el almidón en exceso de agua a temperaturas superiores a la transición vítrea (transición de las regiones amorfas del estado vítreo al estado viscoso) y por debajo de la temperatura de gelatinización. El punto de gelatinización del almidón de tapioca ha sido reportado alrededor de los 63 °C (Vamadevan *et al.*, 2013).

Se preparó una suspensión de AM al 6 % (p/v) en agua destilada, en un frasco de vidrio con cierre hermético, y se colocó en un baño termostatzado hasta llegar a los 55 °C, con agitación magnética moderada. Se mantuvo a temperatura constante durante 3 h, con agitación, obteniéndose de esta manera almidón de mandioca sometido a tratamiento hidrotérmico (AM-HT). Se incorporó el ligando o agua destilada en el caso del control negativo, en proporción 1:1 con respecto al AM-HT. Se dejó interaccionar durante 15 min y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente, sin interrumpir la agitación. Por último, se dejó asentar a 6 °C *overnight*, obteniéndose una separación en dos fases a las que llamaremos “fase inferior” (FI) y “fase superior” (FS).

V.2.2.4 Caracterización del AM-HT mediante la formación de complejos con iodo

Para el desarrollo de las técnicas que se describen a continuación, se preparó una solución estándar del reactivo iodo/ioduro de potasio 0,2 % I₂ – 2 % KI en agua destilada ($\approx 2 \times 10^{-3}$ M KI / $5,2 \times 10^{-5}$ M I₂). El reactivo posee un exceso de ioduro con respecto al iodo, con una relación

ioduro:iodo de 39:1, por lo que la constante de equilibrio de formación de triioduro es alrededor de 7,102 a 25 °C (Morrison *et al.*, 1971; Hayakawa & Nakamura, 1977; Naorem *et al.*, 2013).

Se evaluó la formación de complejos de tipo V (almidón-iodo), los cuales se espera obtener a partir de la interacción entre el AM-HT y los péptidos bioactivos contenidos en el hidrolizado. Se realizaron dos experimentos de acomplejamiento con ioduro: **a)** titulación del AM-HT con reactivo de ioduro y viceversa, es decir, titulación del reactivo de iodo con AM-HT, y **b)** obtención de complejos iodo-almidón mediante el procedimiento de encapsulamiento detallado en la **sección V.2.2.3.2**. En todos los casos, se obtuvo la típica coloración azul (longitud de onda máxima de absorción, $\lambda_{\text{máx-abs}}$, entre 560 y 640 nm). Se registraron los espectros entre 200-900 nm utilizando un espectrofotómetro T60UV-Visible (PG Instruments).

Para el experimento “**a**”, se preparó el almidón tratado térmicamente como se detalla en la **sección V.2.2.3.2**, agregando agua en lugar de hidrolizado (igual al control negativo). Luego del enfriamiento *overnight* a 4 °C, se dejó estabilizar hasta llegar a temperatura ambiente, se separaron las fases, descartando la interfase y se registraron el peso y el volumen de cada una. Luego, se procedió a equiparar las fases para obtener igual densidad en ambas muestras, utilizando agua destilada para diluir la fase correspondiente. Para la determinación de la formación de complejos con iodo, se colocaron 2,5 ml de cada suspensión descrita anteriormente (FI o FS), o de solución de iodo en una cubeta de cuarzo y se titularon con alícuotas de 2,5 μ l de reactivo de Lugol o de suspensión de almidón, respectivamente. Tanto la FI, como la FS, una vez equiparadas las densidades, se diluyeron al 20 % para evitar saturar el detector del espectrofotómetro.

Para el procedimiento “**b**”, se siguió el protocolo según la **sección V.2.2.3.2**, con el objetivo de encapsular el reactivo de Lugol, en lugar del hidrolizado (a modo de control positivo). Luego del enfriamiento *overnight* a 4 °C, se dejó estabilizar la temperatura hasta llegar a temperatura ambiente, se separaron las fases y cada una se diluyó hasta alcanzar la dilución adecuada para poder medir sus espectros en el rango de 400-900 nm sin saturar el detector del equipo. Como el objetivo era identificar los máximos de absorción, no fue necesario equiparar fases para obtener muestras con una concentración aproximada como se realizó en el experimento “**a**”.

V.2.2.5 Identificación de la formación del complejo de inclusión mediante difracción de rayos X

La dispersión de rayos X a bajos ángulos o SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) es una técnica utilizada para el estudio de estructuras en un rango de tamaño de aproximadamente 1

nm a varios cientos de nm. Cuando la radiación de rayos X impacta una muestra, parte de ésta es dispersada. Al igual que cualquier proceso de *scattering*, SAXS establece una relación de reciprocidad entre los tamaños típicos de la estructura que se estudia y los ángulos de dispersión de la radiación que se hace incidir sobre ella. Existe una relación inversa entre el tamaño o la dimensión del objeto y el ángulo de dispersión asociado. En un experimento de dispersión a bajo ángulo se mide la intensidad dispersada frente al vector de dispersión, q , que se define como: $q = (4\pi/\lambda) \times \text{sen}\theta$, donde θ es la mitad del ángulo a través del cual se dispersa la radiación y λ es la longitud de onda de la radiación incidente (**Figura V.3**) (Blazek & Gilbert, 2011).

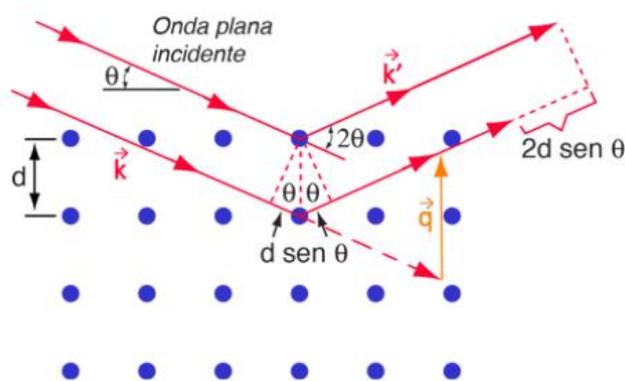


Figura V.3. Esquema de difracción (Tomado de Garrido Regife, 2020).

Las muestras se prepararon según el protocolo detallado en la **sección V.2.2.3.2**. Se obtuvo una muestra correspondiente al encapsulado de los péptidos, así como el control con agua destilada. Luego de reposar *overnight* a 6 °C, la FI y la FS fueron separadas descartando la interfase, se colocaron en placas de Petri y se secaron en estufa durante 24 h a 50 °C.

Los experimentos de dispersión de rayos X fueron realizados usando un equipo modelo XEUS 1.0 (XENOCSS, Francia), con un detector Pilatus100K (DECTRIS, Suiza) y una fuente de rayos X de Cu K α 1,2 ($\lambda = 1.5419 \text{ \AA}$), en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA-CONICET-UNLP). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, en configuración de transmisión, con una distancia muestra-detector fija de 97,68 mm, utilizando aluminio (Al) o poliamida (Kapton) como soporte.

V.3 Resultados y discusión

V.3.1 Caracterización de los ligandos

Se prepararon dos extractos proteolíticos a partir de frutos inmaduros de *B. hieronymi*, denominados Bh B y PER-Bh A, como se explica en el **Capítulo II**. El Bh B mostró una actividad caseinolítica de $10,5 \pm 0,3$ Ucas/ml y una concentración proteica de $2,135 \pm 0,052$ mg/ml y fue utilizado como ligando para la obtención de proteasas encapsuladas en perlas de tapioca. El PER-Bh A fue utilizado en la obtención de un hidrolizado de proteínas de lactosuero bovino tal como se indica en el **Capítulo IV**. El hidrolizado, previamente centrifugado para descartar agregados proteicos, inhibió la actividad enzimática de la ECA en un $93,2 \pm 1,4$ %, valor ligeramente más alto que el obtenido por Bertucci (2012; *et al.*, 2023).

V.3.2 Encapsulamiento de proteasas de *B. hieronymi*

Al realizar la prueba de absorción antes de llevar a cabo este experimento, se determinó que, de todas las proporciones ensayadas, con 0,7 ml de solución de ligando se logra la hidratación de las perlas, sin desperdiciar volumen de extracto. Por lo tanto, el encapsulamiento se llevó a cabo por interacción entre 6 esferas de mandioca (~8 g) y 0,7 ml de extracto enzimático o buffer.

Se ensayaron dos concentraciones de ligando correspondientes al extracto crudo: sin diluir y dilución 1 en 10. Se decidió continuar con esta última, ya que las medidas de A_{280} realizadas para determinar la actividad caseinolítica entraron en la zona lineal, a diferencia de lo ocurrido para las muestras obtenidas con el extracto sin diluir.

Luego de encapsular el Bh B en las perlas de tapioca, se logró recuperar un 42 % (**Tabla V.2**) de la actividad proteolítica original, determinada en las mismas condiciones que las aplicadas para dicho EC, el cual presentaba una actividad de $10,5 \pm 0,3$ Ucas/ml. Este rendimiento es comparable con el obtenido por Thu & Krasaekoopt (2016), quienes recuperaron un 28,2 % de la actividad enzimática al encapsular flavourzima de *Aspergillus oryzae* en un copolímero de maltodextrina y alginato. A pesar de que se obtuvo un buen rendimiento, desde el punto de vista metodológico se generaron dificultades relacionadas con la estabilidad de la matriz encapsulante. En lapsos cortos de tiempo, las esferas impregnadas con el Bh B adoptaron una consistencia blanda, lo que ocasionó que parte del material se

dispersara perdiendo de esta manera su forma original. Por esta razón no se utilizaron las perlas de mandioca para encapsular los péptidos bioactivos, y se decidió buscar una matriz más apropiada para este fin.

Tabla 2. Actividad caseinolítica (AC). Porcentaje de actividad enzimática de **EC 1/10**: extracto crudo diluido 10 veces, y de **EC 1/10 + Y**: extracto crudo diluido 10 veces retenido en esferas de yuca.

	Actividad (Ucas/ml)	AC (%)
EC 1/10	17,5 ± 0,7	100 ± 4
EC 1/10 + Y	7,3 ± 0,3	42 ± 2

V.3.3 Encapsulamiento de péptidos bioactivos

V.3.3.1 Encapsulamiento mediante gelatinización y retrogradación del AM

Se ensayó el protocolo utilizando diferentes porcentajes de almidón en agua (p/v) y diferentes períodos de incubación. Al trabajar a temperaturas cercanas o superiores a la temperatura de gelatinización, el producto obtenido fue un gel. Para medir la liberación de los péptidos se utilizó una celda de Franz. En primer lugar, se testeó si el ligando atravesaba correctamente la membrana, sin obstruir los poros. Los resultados muestran diferencia significativa ($p < 0,05$, test de Dunnett) entre la muestra a tiempo cero (control: agua destilada) y el resto de las muestras, pero no así entre los diferentes tiempos ($p > 0,05$, test de Tukey), lo que sugiere que el ligando atraviesa la membrana y llega al equilibrio en menos de 1 min.

Cuando se midió la liberación de péptidos encapsulados, se registraron cambios despreciables en la A_{280} (0,02 UA en el punto máximo) a través del tiempo en el reservorio inferior (**Figura V.4**), por lo que se puede inferir que el gel retuvo los péptidos, ya que el experimento anterior corroboró que los mismos atraviesan la membrana ($A_{280} \approx 0,2$ UA). Esto podría corroborarse elaborando un protocolo de digestión del almidón con la enzima amilasa para verificar si los péptidos efectivamente quedan retenidos en esta matriz. Dicho protocolo conlleva desafíos que escapan de la finalidad de este trabajo de tesis y por lo tanto quedan propuestos como trabajo a futuro.

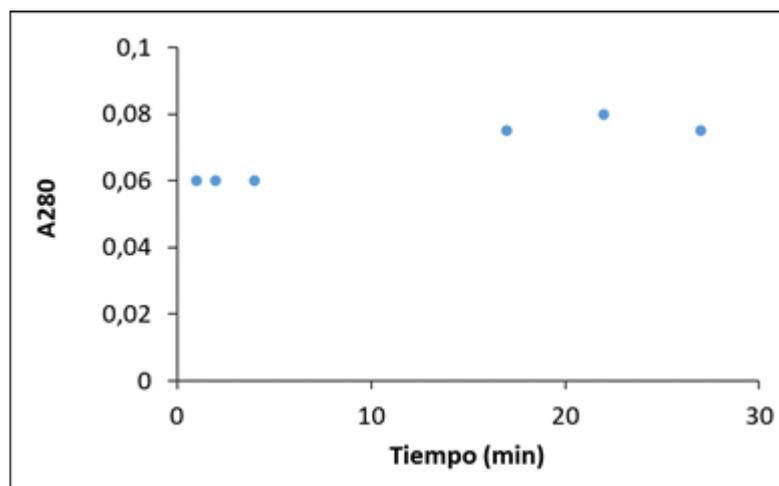


Figura V.4. Variación de la A_{280} en función del tiempo de toma de muestra del ensayo de liberación de los péptidos encapsulados utilizando una celda de Franz.

V.3.4 Estudio del AM-HT

La técnica de *annealing* induce la transición del almidón desde el estado vítreo al estado viscoso, favoreciendo la reorganización de las cadenas de glucanos. Los cambios estructurales y físicos inducidos en los almidones mediante esta técnica son relevantes en la obtención de matrices de encapsulación debido a que se produce un aumento de la solubilidad en agua, se favorece la disociación de las estructuras de doble hélice, aumenta la movilidad de las cadenas y se logra una mayor proporción de cadenas largas con respecto a las ramificaciones (Fonseca *et al.*, 2021; Chakraborty *et al.*, 2021).

En este apartado, se describe el estudio de la capacidad de encapsulamiento del almidón natural de tapioca luego del tratamiento hidrotérmico (AM-HT) y se desarrolla un método sencillo para promover la reorganización de las cadenas de polisacáridos y permitir el acomplejamiento con el ligando.

V.3.4.1 Obtención y descripción de las características de la muestra

Para la caracterización del material encapsulante, se preparó la muestra control. Luego de la etapa de separación de fases se pudo observar a simple vista que la FS presenta una menor concentración de polisacárido, y esto fue corroborado mediante el análisis de los pesos secos de las muestras obtenidas, siendo 105 mg/ml y 39,7 mg/ml, las concentraciones de la FI y la FS, respectivamente.

Luego de ser separadas y, una vez a temperatura ambiente, cada fase fue homogeneizada. La apariencia de la FS permaneció sin cambios a diferencia de la FI que presentó un aspecto viscoso con partículas suspendidas claramente visibles que se asientan cuando se detiene la agitación.

V.3.4.2 Descripción del reactivo de iodo

En el reactivo de iodo/ioduro se establece el siguiente equilibrio: $I^- + I_2 \leftrightarrow [I_3]^-$

Según diferentes autores, los máximos de absorción correspondientes a estas especies químicas se encuentran a 203 nm para el I_2 , 193 nm y 226 nm para el I^- , y 288 nm y 350 nm para el $[I_3]^-$. En la **Figura V.5** se pueden observar los espectros de absorción de dos concentraciones de reactivo y se pueden identificar algunos de estos máximos. A longitudes de onda más bajas, se pueden apreciar dos picos intensos y diferenciados en el espectro de absorción de la muestra menos concentrada (C1) mientras que, a una concentración más alta (C2) no se pueden distinguir ya que la señal satura el detector. Dichas $\lambda_{m\acute{a}x-abs}$ coinciden con lo anteriormente descrito. Por otro lado, se observan dos picos menos intensos cerca de 288 nm y 350 nm, como indica la bibliografía para los máximos de absorción del $[I_3]^-$. Aunque en trabajos previos también se reportan señales débiles a 350 nm y 460 nm para el I_2 y 460 para el $[I_3]^-$, no es posible diferenciarlas en los espectros obtenidos, por encontrarse enmascaradas en otras señales o por ser demasiado débiles (Wei *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 1971; Awtrey & Connick, 1951).

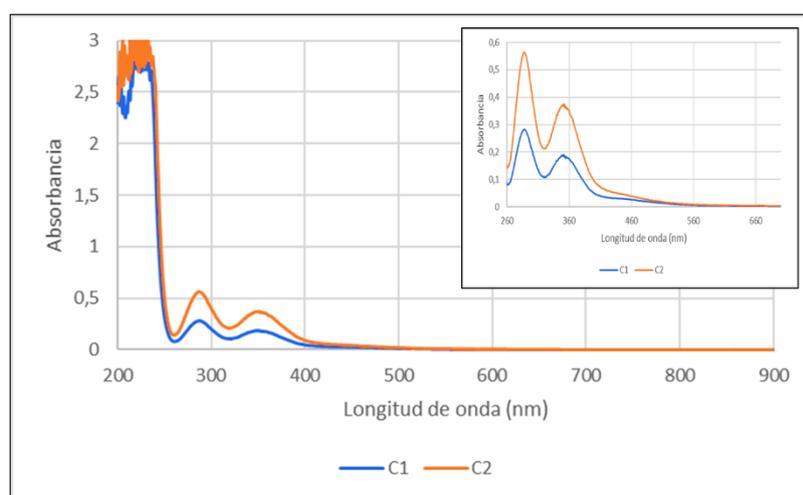


Figura V.5. Espectro de absorción de concentraciones crecientes (C1 y C2) de reactivo de Lugol. *In set*: detalle del espectro en el rango de 600-260 nm.

V.3.4.3 Complejos de inclusión iodo-almidón

Debido a que los complejos establecidos entre el iodo y el almidón han sido ampliamente estudiados, luego de revisar la bibliografía, se pueden hacer las siguientes inferencias:

I- Cuanto más extensas son las cadenas de oligo/polisacárido, más elevada es la longitud de onda de máxima absorción de los complejos.

II- La absorptividad de los complejos aumenta con la longitud de las cadenas de oligo/polisacárido o, equivalentemente, con la $\lambda_{\text{máx-abs}}$ obtenida.

Estas afirmaciones requieren que los experimentos se realicen con la misma proporción del reactivo iodo-yoduro en concentraciones equivalentes de los almidones particulares estudiados o comparados.

Como se indicó en la sección de materiales y métodos, se realizaron dos experimentos, **a** y **b**, ilustrados en la **Figura V.6** con la misma nomenclatura.

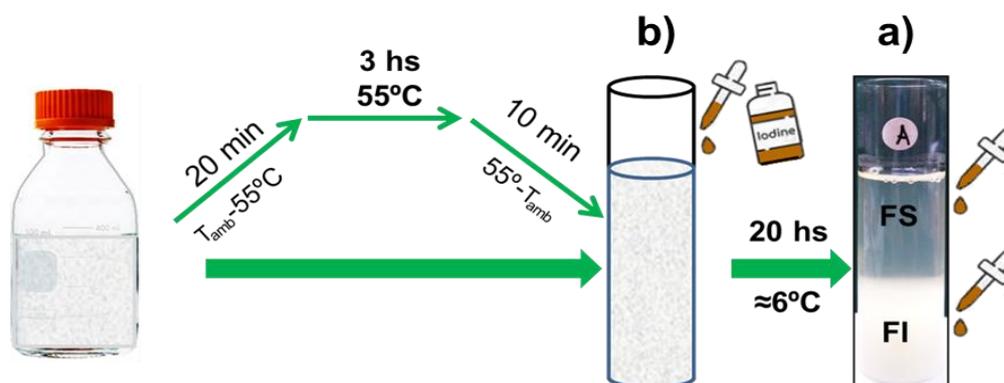


Figura V.6. Diagrama del proceso de *annealing* y caracterización del almidón por acomplejamiento con yoduro. FS: fase superior. FI: fase inferior. a) Titulación de la FI y FS con Lugol. b) Agregado de Lugol inmediatamente luego del *annealing*.

Con respecto al experimento **a**, cuando se agregó el reactivo de iodo a la FS y a la FI, se observó una diferencia significativa de 15 nm en la longitud de onda de máxima absorción en los espectros de cada una de ellas (**Figura V.7**). Los complejos de inclusión de iodo obtenidos con la FI tienen una $\lambda_{\text{máx-abs}}=610$ nm, que es más corta que la obtenida para los complejos de la FS, $\lambda_{\text{máx-abs}}=625$ nm, lo que indica una mayor proporción de cadenas de polisacáridos más cortas en la FI. Esto sugiere que la FS tiene mayor capacidad de encapsulamiento. Además, la FI ha

demostrado ser una suspensión heterogénea con partículas visibles a simple vista, que decantan, lo que dificulta su estudio por espectrofotometría debido a la turbidez de las muestras y la dispersión en los datos obtenidos. Por lo tanto, la fase acuosa del AM-HT (FS) parece ser más atractiva como agente encapsulante ya que permite obtener suspensiones de almidón con capacidades de encapsulación mejoradas en comparación con el almidón nativo y presenta menos inconvenientes para su estudio.

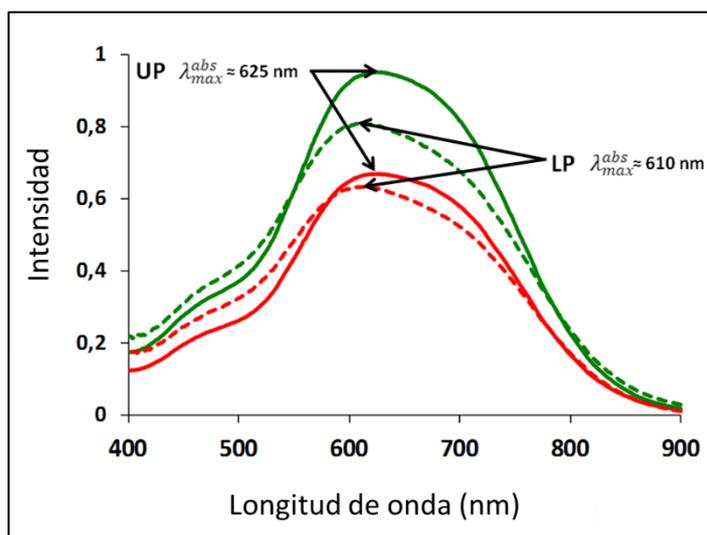


Figura V.7 Espectros de absorción de la fase superior (FS, líneas continuas) y de la fase inferior (FI, líneas punteadas) de las suspensiones de AM-HT tituladas con reactivo de yodo en concentraciones crecientes (C1, color rojo; C2, color verde)

V.3.4.4 Evaluación de la capacidad encapsulante del AM-HT

El proceso de *annealing*, según el protocolo esquematizado en la **Figura V.6**, permitió obtener la fase más adecuada (FS) para realizar el encapsulamiento, según las características espectrales de los complejos de inclusión almidón-yodo obtenidos. Mediante el mismo método se compararon dos muestras de harina de yuca de diferente procedencia. El objetivo fue evaluar la variabilidad del almidón en función del terruño y las condiciones ambientales, que pueden influir en su composición molecular y, por lo tanto, en su capacidad de encapsulación.

Se realizó el proceso de *annealing* con las dos muestras de almidón de mandioca de diferente procedencia. Las fases superiores obtenidas para cada harina se denominaron FS1 (Femag) y FS2 (Dicomere). Luego de equiparar las concentraciones de las muestras, se estabilizaron a 25 °C y se titularon en paralelo agregando alícuotas sucesivas y equivalentes de reactivo de yodo.

En la **Figura V.8** se puede observar que, al aumentar la concentración de reactivo de iodo en la cubeta, se incrementa la intensidad a la longitud de onda de máxima absorción de los complejos, hasta que se alcanza la saturación. Una vez que ésta se logra, un pequeño aumento en la concentración de iodo no produciría un cambio significativo por encima de 550 nm, ya que no se pueden formar más complejos. La comparación de las **Figuras V.8 A y V.8 B** muestra claramente que con el agregado de la misma cantidad de iodo en ambas muestras se alcanza la saturación, mostrando que la FS1 presenta una absorptividad mayor que FS2, por lo tanto, se podría inferir que la primera presenta complejos de mayor longitud, lo que podría relacionarse con una mayor capacidad de encapsulación de este almidón. Además, se observa que la longitud de onda de máxima absorción de la FS1 (≈ 650 nm) es más larga que la observada para la FS2 (≈ 625 nm), entonces se puede inferir que las cadenas de glucanos de la FS1 son más largas que la FS2, lo cual también contribuye a la mayor capacidad complejante. Estos resultados apuntan a que la titulación de suspensiones de almidón con reactivo de iodo podría ser de utilidad para comparar la capacidad de encapsulación de almidones de diferentes fuentes.

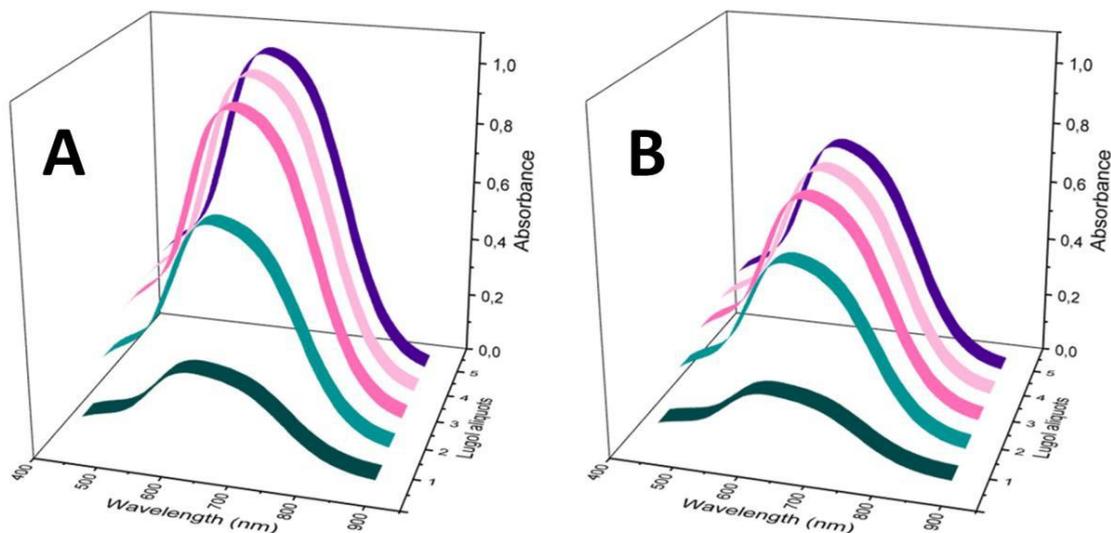


Figura V.8. Espectros de absorción obtenidos por adición sucesiva de alícuotas equivalentes de reactivo de iodo a las suspensiones FS1 (A) y FS2 (B) obtenidas mediante *annealing* de dos almidones de mandioca provenientes de diferentes regiones geográficas. Abscisas: longitud de onda (nm). Ordenadas: absorbancia (UA). Eje Z: alícuotas de Lugol.

V.2.4.4.1 Caracterización del AM-HT mediante encapsulamiento de yoduro

Luego de realizar el experimento **b** (encapsulado de reactivo de iodo en lugar de los péptidos), la longitud de onda de máxima absorción observada en la FS fue de 615 nm,

mientras que para la FI fue de 602 nm (**Figura V.9**). En concordancia con los resultados obtenidos en la caracterización de las FS y FI mediante titulación con yodo, la longitud de onda de máxima absorción es más corta en la FI y más larga en la FS. Como se mencionó anteriormente, esto puede relacionarse con la extensión de las cadenas que forman los complejos de inclusión, por lo que este estudio es una prueba adicional de que la FS contiene complejos más largos, que son de interés para el fin de este trabajo.

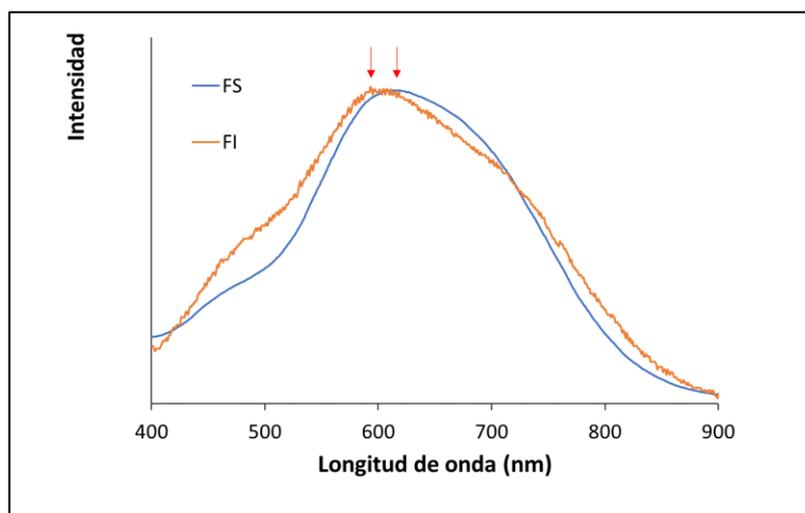


Figura V.9. Espectros de absorción de la fase superior (FS) e inferior (FI) obtenida encapsulando al reactivo de yodo inmediatamente después del *annealing* del AM. Las muestras fueron diluidas hasta lograr un máximo de absorción no mayor a 1,2 UA.

V.3.4.5 Evaluación del encapsulamiento de péptidos utilizando AM-HT

Se siguió el protocolo detallado en la **sección V.2.2.3.2**. Sin interrumpir la agitación ni el tratamiento térmico a 55 °C, se agregó el ligando en una proporción 1:1 (v/v) respecto a la solución de AM, se mantuvo durante 15 min y se enfrió hasta llegar a temperatura ambiente, con agitación constante. Se dejó asentar a 6 °C, *overnight*, observándose la separación en FI y FS, como se observa en la **Figura V.10**. La FI presentó una consistencia viscosa, heterogénea, de color blanquecino-amarillento en el caso la muestra problema y de color blanco en el control, mientras que las fases superiores resultaron ser fluidas, más homogéneas y con cierta opacidad al mirar a tras luz simple vista.

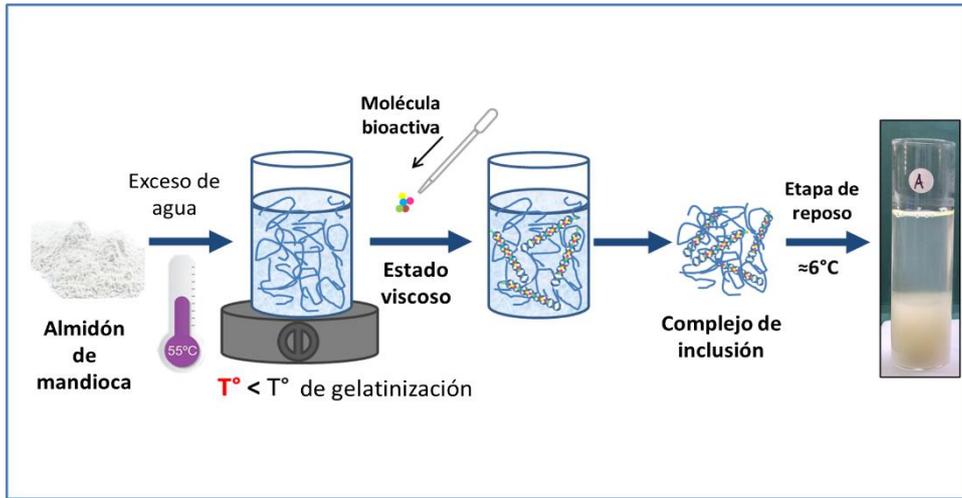


Figura V.10. Esquema de la reorganización en la estructura del almidón mediante el tratamiento de *annealing* y encapsulamiento.

V.3.4.5.1 Identificación de la formación del complejo de inclusión mediante SAXS

Se realizaron dos experimentos: en el primero la muestra fue obtenida como se explica en la sección de metodología y en el segundo se realizó el mismo procedimiento, pero a una temperatura más elevada, lo que resultó en la gelatinización parcial del almidón y posterior retrogradación durante el reposo a 6 °C. En ambos casos, las FS y FI obtenidas fueron separadas, secadas y analizadas por difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS), obteniéndose los difractogramas que se muestran en la **Figura V.11**.

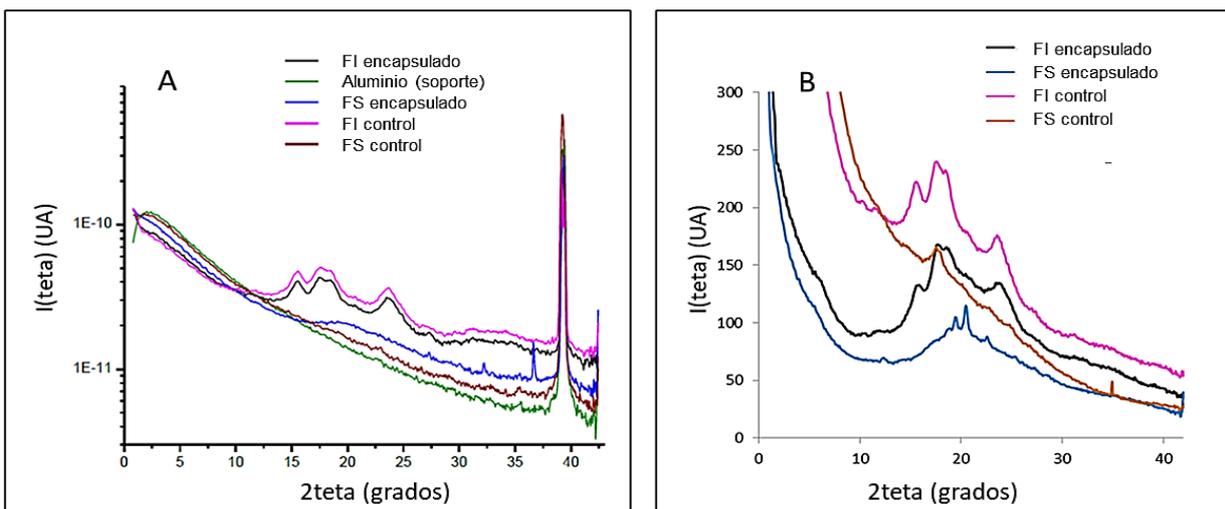


Figura V.11. Difractogramas obtenidos por SAXS. **A:** perfil de RX de las FS y FI obtenidas mediante el procedimiento de *annealing* sin gelatinización del almidón. **B:** perfil de RX de las FS y FI obtenidas mediante el procedimiento de *annealing* con gelatinización y retrogradación parciales del almidón. 1: FS-control; 2: FI-control; 3: FS-muestra; 4: FS-muestra; Al: soporte (Aluminio).

Según diferentes autores, el almidón nativo o sometido a *annealing* muestra picos a 2θ alrededor de 15° , 17° , 18° y 23° , típicos de los patrones tipo-A (Shariffa *et al.*, 2017). Este patrón se observa en los perfiles 2 y 4 (**Figura V.11 A y B**) correspondientes a la FI del control (AM+agua) y de la muestra (AM+hidrolizado), respectivamente. Esto quiere decir que en la FI pareciera no haber modificaciones detectables en la estructura del almidón tanto para la muestra como para el control. Cuando observamos los perfiles 1 y 3, correspondientes a las FSs, se distinguen perfiles que no corresponden a los patrones típicos del almidón. En el caso de las muestras que gelatinizaron parcialmente, se identifica una señal alrededor de 17° (2θ) en la FS del control, que podría corresponderse a la señal característica de los almidones ricos en amilosa (Liu *et al.*, 2009; Kibar *et al.*, 2010; Situ *et al.*, 2014). Si bien la amilosa corresponde a la fracción menos soluble del almidón, su presencia en la FS puede deberse a que, al no estar ramificada como sí sucede con la amilopectina, es más probable que pueda atravesar la cubierta del gránulo de almidón cuando se encuentra en agua caliente (Green, 1975). Por otra parte, el perfil 3, correspondiente a la FS de la muestra problema, en el caso del almidón parcialmente gelatinizado, presenta un pico mayoritario alrededor de los 21° , uno de menor intensidad a $19,5^\circ$ y dos señales menos intensas a 12° y 22° (2θ). Estos picos podrían asociarse a complejos entre la amilosa o cadenas largas de amilopectina con los diferentes péptidos que, según su composición aminoacídica presentarán diferentes estructuras y, por lo tanto, diferentes patrones de difracción de rayos X. En el caso del tratamiento a 55°C (**Figura V.11 A**), no se observó el pico a 17° (2θ) en la FS del control. Tampoco aparecen los picos a 21 , $19,5$, 12 y 22° (2θ) que se observan en la FS de la muestra problema cuando hay gelatinización y retrogradación parcial del almidón, en cambio, se observa una señal poco definida alrededor de 19 - 20° .

V.4 Conclusiones

En el desarrollo de este capítulo se intentó encapsular tanto proteasas como péptidos bioactivos utilizando almidón como agente encapsulante. El protocolo de encapsulamiento de peptidasas en esferas de tapioca resultó interesante por el rendimiento alcanzado (>40% AC), sin embargo, la matriz no fue estable a lo largo del proceso por lo que no cumpliría con el objetivo para el cual fue diseñado.

Por otra parte, se estudió el AM como posible agente encapsulante. El procedimiento descrito en este trabajo muestra que las condiciones elegidas, es decir, calentar una suspensión de AM al 6 % a 55 °C con agitación durante 3 h, lleva al polisacárido a su estado viscoso. En este estado el almidón tiene sus cadenas desplegadas, preparadas para recibir una molécula y formar complejos de inclusión. La pausa posterior a temperaturas más bajas en torno a los 6 °C decanta espontáneamente dos fases de densidad bien diferenciadas. El análisis de los espectros de absorción permitió inferir que la redistribución de glucanos lleva las cadenas más largas a la FS. Ésta mostró una mayor capacidad de encapsulación que la FI, como lo demuestra la titulación con reactivo de yodo. También permitió comparar cultivos de dos fincas, determinar y evaluar su capacidad de encapsulación. Esto permitirá seguir buscando mejoras en el procedimiento que optimicen la obtención de complejos de yodo, es decir, complejos de inclusión "*guest-host*".

La mayoría de los complejos de inclusión *guest-host* de almidón autoensamblados (clasificados estructuralmente como tipo V) muestran una mayor resistencia a la hidrólisis enzimática (Zhang *et al.*, 2016). Por lo tanto, podrían calificarse como representantes del grupo RS5, una clase de almidón resistente cuya definición se está ampliando. Por tanto, considerando que el iodo-almidón es un complejo de inclusión tipo V autoensamblado, el procedimiento aquí descrito constituye una combinación *annealing*/acomplejamiento, cuyo principal logro es la obtención de un complejo tipo V, contribuyendo de esta manera a la ampliación de la definición

de los almidones resistentes RS5, como lo plantean Gutiérrez & Tovar (2021). Estos son los pasos fundamentales para optimizar un método para lograr RS5 con otras moléculas bioactivas.

Los resultados apuntan a que el tratamiento de *annealing* con gelatinización y retrogradación parcial del almidón es más efectivo para encapsular péptidos en complejos tipo-V. Estos estudios son preliminares, por lo que se necesita continuar realizando otros análisis que complementen estos resultados para poder hacer conclusiones más concretas.

V.5 Bibliografía

Agama-Acevedo, E., Pacheco-Vargas, G., Bello-Pérez, L. A., & Alvarez-Ramirez, J. (2018). Effect of drying method and hydrothermal treatment of pregelatinized Hylon VII starch on resistant starch content. *Food Hydrocolloids*, 77, 817-824.

Awtrey, A. D., & Connick, R. E. (1951). The absorption spectra of I₂, I₃⁻, I⁻, IO₃⁻, S₄O₆⁼ and S₂O₃⁼. Heat of the reaction I₃⁼ I₂ + I⁻. *Journal of the American Chemical Society*, 73(4), 1842-1843.

Bertucci, J. I. (2012). *Búsqueda de péptidos bioactivos en hidrolizados de lactosuero bovino obtenidos empleando fitopeptidasas* (Tesina de grado, Universidad Nacional de La Plata).

Bertucci, J. I., Salese, L., Liggieri, C. S., Garrote, G., & Bruno, M. A. (2023). Preparation of whey protein hydrolysates with ACE-inhibitory activity using cysteine peptidases from *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *International Journal of Dairy Technology*. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12943>

Blazek, J., & Gilbert, E. P. (2011). Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. *Carbohydrate Polymers*, 85(2), 281-293.

Chakraborty, I., Govindaraju, I., Rongpipi, S., Mahato, K. K., & Mazumder, N. (2021). Effects of hydrothermal treatments on physicochemical properties and in vitro digestion of starch. *Food Biophysics*, 16, 544-554.

Falade, K. O., & Akingbala, J. O. (2010). Utilization of cassava for food. *Food Reviews International*, 27(1), 51-83.

Fennema, O. R. (1992). *Química de los alimentos* (No. 664.07 F335q). Zaragoza, ES: Acribia.

Fonseca, L. M., El Halal, S. L. M., Dias, A. R. G., & da Rosa Zavareze, E. (2021). Physical modification of starch by heat-moisture treatment and annealing and their applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, 274, 118665.

Gaenssle, A. L. O., van der Maarel, M. J. E. C., & Jurak, E. (2020). Reliability factor for identification of amylolytic enzyme activity in the optimized starch-iodine assay. *Analytical Biochemistry*, 597. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113696>

Garrido Regife, L. (2020). *Estudio estructural de materiales nanoestructurados mediante SAXS* (Trabajo final de grado, Universidad de Sevilla).

Green, M. M., Blankenhorn, G., & Hart, H. (1975). Which starch fraction is water-soluble, amylose or amylopectin?. *Journal of Chemical Education*, 52(11), 729.

Gutiérrez, T. J., & Tovar, J. (2021). Update of the concept of type 5 resistant starch (RS5): Self-assembled starch V-type complexes. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 109, pp. 711–724). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.078>

Hayakawa, K., & Nakamura, S. (1977). The determination of the formation constants of the triiodide ion in water–alcohol mixed solvents at various temperatures. *Bulletin of the chemical society of Japan*, 50(3), 566-569.

Kibar, E. A. A., Gönenç, İ., & Us, F. (2010). Gelatinization of waxy, normal and high amylose corn starches. *GIDA-Journal of Food*, 35(4), 237-244.

Li, A. X., Guo, L. Z., Fu, Q., & Lu, W. D. (2011). A simple and rapid plate assay for screening of inulindegrading microorganisms using Lugol's iodine solution. *African Journal of Biotechnology*, 10(46), 9518-9521.

Liu, H., Yu, L., Simon, G., Zhang, X., Dean, K., & Chen, L. (2009). Effect of annealing and pressure on microstructure of cornstarches with different amylose/amylopectin ratios. *Carbohydrate Research*, 344(3), 350-354. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.11.014>

Liu, K., Chi, C., Huang, X., Li, X., & Chen, L. (2019). Synergistic effect of hydrothermal treatment and lauric acid complexation under different pressure on starch assembly and digestion behaviors. *Food chemistry*, 278, 560-567.

Mohan, A., Rajendran, S. R., He, Q. S., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: A review. *Rsc Advances*, 5(97), 79270-79278.

Morrison, M., Bayse, G. S., & Michaels, A. W. (1971). Determination of spectral properties of aqueous I₂ and I₃⁻ and the equilibrium constant. *Analytical Biochemistry*, 42(1), 195-201. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90026-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90026-1)

Moussavou, P. B., Koumakpayi, I. H., Nkili-Meyong, A. A., Labouba, I., Bisvigou, U., Chansi, J. K., ... & Berthet, N. (2016). Molecular analysis of human Papillomavirus detected among women positive for cervical lesions by visual inspection with acetic acid/Lugol's iodine (VIA/VILI) in Libreville, Gabon. *Infectious agents and cancer*, 11, 1-9.

Naorem, H., & Devi, S. D. (2013). Spectrophotometric determination of the formation constant of triiodide ions in aqueous-organic solvent or polymer mixed media both in absence and presence of a surfactant. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 101, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.058>

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia food science*, 1, 1806-1815.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Principios de bioquímica de Lehninger*. (5ª ed.). Ediciones Omega.

Petruzzi, M., Lucchese, A., Baldoni, E., Grassi, F. R., & Serpico, R. (2010). Use of Lugol's iodine in oral cancer diagnosis: an overview. *Oral oncology*, 46(11), 811-813.

Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2008). Starch gelatinization. *Advances in food and nutrition research*, 55, 221-268.

Rodríguez, S. D., & Bernik, D. L. (2014). Flavor release by enzymatic hydrolysis of starch samples containing vanillin-amylose inclusion complexes. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 635-640.

Sadava, D., Hellers, C., Orians, G., Purves, W & Hillis, D. (2010). *Vida: la ciencia de la biología*. Octava edición. Editorial Panamericana. Págs. 50-54.

Shariffa, Y. N., Uthumporn, U., Karim, A. A., & Zaibunnisa, A. H. (2017). Hydrolysis of native and annealed tapioca and sweet potato starches at subgelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *International Food Research Journal*, 24(5).

Silva-Cristobal, L., Osorio-Díaz, P., & Bello-Pérez, L. A. (2007). Digestibilidad del almidón en haba (*Vicia faba* L.). *Agrociencia*, 41(8), 845-852.

Situ, W., Chen, L., Wang, X., & Li, X. (2014). Resistant starch film-coated microparticles for an oral colon-specific polypeptide delivery system and its release behaviors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(16), 3599–3609. <https://doi.org/10.1021/jf500472b>

Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of cereal science*, 39(2), 151-165.

Thu, T. T. M., & Krasaekoopt, W. (2016). Encapsulation of protease from *Aspergillus oryzae* and lipase from *Thermomyces lanuginosus* using alginate and different copolymer types. *Agriculture and Natural Resources*, 50(3), 155-161.

Vamadevan, V., Bertoft, E., Soldatov, D. v., & Seetharaman, K. (2013). Impact on molecular organization of amylopectin in starch granules upon annealing. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1045–1055. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.006>

Vazquez, A., Cyras, V. P., Alvarez, V. A., & Moran, J. I. (2012). Starch/clay nano-biocomposites. In *Environmental silicate nano-biocomposites* (pp. 287-321). Springer, London.

Wang, S., Chao, C., Cai, J., Niu, B., Copeland, L., & Wang, S. (2020). Starch–lipid and starch–lipid–protein complexes: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(3), 1056–1079. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12550>

Wang, Y., & Selomulya, C. (2020). Spray drying strategy for encapsulation of bioactive peptide powders for food applications. *Advanced Powder Technology*, 31(1), 409-415.

Wei, Y. J., Liu, C. G., & Mo, L. P. (2005). Ultraviolet absorption spectra of iodine, iodide ion and triiodide ion. *Guang pu xue yu guang pu fen xi= Guang pu*, 25(1), 86-88.

Zafer, J. B., Dede, S., & Karakuş, E. (2021). α -Amylase assay with starch–iodine–sodium fluorescein-based fluorometric method in human serum samples. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 51(6), 599–606. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1843177>.

Zhang L., Gheng H., Zheng C., Feng D., Man S., Dai Y., Yu P. (2016) Structural and release properties of amylose inclusion complexes with ibuprofen. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 31:101-107.

Capítulo VI

CONCLUSIONES GENERALES

VI.1 Conclusiones generales

La utilización de enzimas vegetales para obtención de nuevos productos o procesos se incluye en el área de la biotecnología y abarca tanto investigación básica como aplicada. La biocatálisis ha sido ampliamente estudiada en los últimos años debido a la necesidad de encontrar catalizadores más amigables con el ambiente en comparación con los sintéticos tradicionalmente utilizados. Las fuentes de obtención de las enzimas son muy diversas, pudiendo extraerse a partir de tejidos animales y vegetales como así también a partir de hongos y bacterias. Una de las principales aplicaciones de las enzimas es la utilización en la industria alimentaria, como por ejemplo en los procesos de elaboración de quesos y otros productos lácteos, en bebidas como jugos de frutas y también en panificados. Por su parte, las peptidasas han sido estudiadas para su aplicación en tratamiento de residuos y en la producción de biopéptidos a partir de proteínas alimentarias (del Moral, *et al.*, 2015).

En este trabajo se obtuvieron diferentes extractos con actividad proteolítica a partir de frutos, ejes y hojas de tres especies de bromelias nativas de Argentina. De todos los extractos obtenidos, el más activo fue un extracto de frutos inmaduros de *B. hieronymi*, el cual fue preparado con el doble de cantidad de fruto que el utilizado por Bertucci *et al.* (2023), siendo el extracto más adecuado como fuente de peptidasas para uso industrial. Se pudo corroborar la presencia de las peptidasas características del sistema proteolítico de *B. hieronymi* mediante IEF y se identificaron por primera vez los puntos isoeléctricos de las proteínas mayoritarias presentes en los frutos de *B. serra* y en las hojas de *D. urbanianum*. Se determinaron las condiciones óptimas para medir la actividad caseinolítica de las proteasas presentes en los frutos de *B. serra*, pudiendo corroborar resultados previos y aportando nueva información sobre las características de las enzimas estudiadas. Se logró purificar parcialmente la peptidasa de pI menor a 3,5 de *B. serra* y se determinó su huella peptídica mediante espectrometría de masas, cuyo análisis arrojó coincidencias con secuencias aminoacídicas de varias peptidasas de bromeliáceas.

Por otra parte, se utilizaron extractos de *B. serra* y *B. hieronymi* parcialmente purificados con etanol para hidrolizar proteínas alimentarias (aislado proteico de soja, caseína y lactosuero bovinos) demostrando que ambas preparaciones enzimáticas son capaces de liberar péptidos inhibitorios de la ECA y antioxidantes a partir de dichos sustratos en las condiciones ensayadas. Los hidrolizados de 180 min obtenidos con enzimas de *B. hieronymi* a partir de aislado proteico de soja y proteínas de lactosuero a 45 °C, fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante y antihipertensiva, respectivamente. Por espectrometría de masas obtuvieron los perfiles

peptídicos, y se lograron secuenciar 34 péptidos contenidos en las fracciones cromatográficas más activas obtenidas por exclusión molecular. Si bien algunos péptidos secuenciados ya han sido reportados previamente por su actividad biológica, muchos otros aún no han sido estudiados hasta el momento y el análisis de los resultados permitió identificar los más promisorios, por lo que se considera relevante continuar la investigación focalizando en éstos.

Por último, se diseñó un protocolo sencillo y económico para encapsular biopéptidos utilizando almidón de mandioca sometido a un tratamiento hidrotérmico como agente encapsulante. Los estudios mediante rayos X indican que el tratamiento aplicado no modifica la estructura primaria del almidón nativo, pero sí se observan diferencias entre la muestra encapsulada y el control. Si bien este estudio es preliminar, constituye un aporte al estudio del complejo almidón-péptido el cual puede clasificarse como tipo V, y hasta el momento ha sido escasamente estudiado (Wang *et al.*, 2020). Se considera relevante seguir avanzando en este campo ya que este tipo de complejos se está evaluando como un nuevo tipo de almidón resistente RS5, siendo promisorio como acomplejante de biomoléculas para su uso en administraciones orales, ya que debido a sus características estructurales es resistente a la degradación gastrointestinal, lo que protege la actividad biológica de las moléculas activas.

VI.2 Bibliografía

Bertucci, J. I., Salese, L., Liggieri, C. S., Garrote, G., & Bruno, M. A. (2023). Preparation of whey protein hydrolysates with ACE-inhibitory activity using cysteine peptidases from *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *International Journal of Dairy Technology*. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12943>

Moral, S., Ramírez-Coutiño, L. P., & García-Gómez, M. D. J. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 87-102.

Wang, S., Chao, C., Cai, J., Niu, B., Copeland, L., & Wang, S. (2020). Starch–lipid and starch–lipid–protein complexes: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(3), 1056–1079. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12550>

Anexo I

CARICAIN (UniProt P10056)

10 20 30 40 50 60
MAMIPSISKL LFVAICLFVH MSVSFGDFSĪ VGYSQDDLTS TERLIQLFNS WMLNHNK**FYE**

70 80 90 100 110 120
NVDEKLYRFE **IFK**DNLNYID ETNKKNSYW LGLNEFADLS NDEFNEKYVG SLIDATIEQS

130 140 150 160 170 180
YDEEFINEDT VNLPENVDWR **KKGAVTPVRH** QGSCGSCWAF SAVATVEGIN KIRTGKLEVEL

190 200 210 220 230 240
SEQELVDCEĪ RSHGCKGGYP PYALEYVAKN **GIHLRSKYPY** KAKQGTCKRAK QVGGPIVKTS

250 260 270 280 290 300
GVGRVQPNNE GNLLNAIAK**Q** **PVSVVVESKG** RPFQLYKGGI FEGPCG**TKVD** **HAVTAVGYGK**

310 320 330 340
SGGKGYILIK NSWGTAWGEK GYIRIK**RAPG** **NSPGVCGLYK** SSYPTKN

ANANAIN (UniProt P80884)

10 20 30 40 50 60
MTSKVQLVFL FLFLCVMWAS PSAASCDEPS DPMMKQFEEW MAEYGRVYKD NDEKMLRFQI

70 80 90 100 110 120
FKNNVNHIET FNNRNGNSYT LGINQFTDMT NNEFVAQYTG LSLPLNIKRE PVVSFDDVDI

130 140 150 160 170 180
SSVPQSIDWR DSGAVTSVKN QGRCGSCWAF ASIATVESIY KIKRGNLVSL SEQQVLDCAV

190 200 210 220 230 240
SYGCKGGWIN KAYSFIISNK GVASAAYPY KAAKGTCKTN GVPNSAYITR YTYVQRNNER

250 260 270 280 290 300
NMMYAVSNQP IAAALDASGN FQHYKRGVFT GPCGTRLNHA IVIIGYGQDS **SGK**KFWIVRN****

310 320 330 340
SWGAGWEGEGG **YIRLAR**DVSS SFGLCGIAMD PLYPTLQSGP SVEVI

STEM BROMELAIN (UniProt P14518)

10 20 30 40 50 60
AVPQSIDWRD YGAVTSVKNQ NPCGACWafa AIATVESIYK IKKGILEPLS EQQVLDCAKG

70 80 90 100 110 120
YGCKGGWEFR AFEFIISNK**G** **VASGAIYPYK** AAKGTCKTDG VPNSAYITGY ARVPRNNESS

130 140 150 160 170 180
MMYAVSKQPI TVAVDANANF QYYKSGVFNG PCGTSLNHAV TAIGYGQDSĪ IYPKKWGAK**W**

190 200 210
GEAGYIRMAR DVSSSSGICG IAIDPLYPTL EE

FRUIT BROMELAIN (UniProt O23791)

10 20 30 40 50 60
 MASKVQLVFL FLFLCAMWAS PSAASRDEPN DPMMKRFE EW MAEYGRVYKD DDEK**MRRFQI**
 70 80 90 100 110 120
FKNNVKHIET FNSRNENSYT LGINQFTDMT KSEFVAQYTG VSLPLNIERE PVVSFDDVNI
 130 140 150 160 170 180
 SAVPQSIDWR DYGAVNEVKN QNPCGSCWSF AAIATVEGIY KIKTG YLVSL SEQEVLDCAV
 190 200 210 220 230 240
 SYGCKGGWVN KAYDFIISNN GVTTEENYPY LAYQGTCNAN SFPNSAYITG YSYVRRNDER
 250 260 270 280 290 300
 SMMYAVSNQP IAALIDASEN FQYYNGGVFS GPCGTSLNHA ITIIGYGQDS SGTKYWIVRN
 310 320 330 340 350
 SWGSSWGE GG YVRMARGVSS SSGVCGIAMA PLFPTLQSGA NAEVIKMVSE T

MACRODONTAIN I (UniProt P83443)

10 20 30 40 50 60
AVPQSIDWRD YGAVNEVKNQ GPCGGCWAF AAIATVEGIY IRKGNLVYLS EQEVLDCAVS
 70 80 90 100 110 120
 YGCKGGWVNR AYDFIISNNG VTTDENYPYR AYQGTCNANY FPNSAYITGY SYVRRNDESH
 130 140 150 160 170 180
 MMYAVSNQPI AALIDASGDN FQYYKGGVYS GPCGFSLNHA ITIIGYGRDS **YWIVRNSWGS**
 190 200 210
 SWGQGGYVRI RRDVSHSGGV CGIAMSPLFP TLQ

***Calotropis procera*, PROCERAIN (UniProt A0A165EL94)**

10 20 30 40 50 60
 MSFVLILSFL LFVSAITCLS TNWRSDEVI ALYEEWLVKH QKLHSSLGEK IKR**FEIFKDN**
 70 80 90 100 110 120
 LRYIDEQNNY NKLNHKNFTL GLNQFADLTL DEFSSIYLG T SIEYDQIISS NPNHDGEEED
 130 140 150 160 170 180
 ILQEGAIELP NSVDWRQKGV VFPIRNQKGC GSCWAFSAVA SIETLIGIKK DPMIALSEQE
 190 200 210 220 230 240
 LVDCEKTSYG CKGGYYDNAF **AYVAKNGITS** GQKYPYKAEK GQCHQMEK**VA KISGYRRVLR**
 250 260 270 280 290 300
NEKQLQSVV **AQQVVS**GVK SKSR**DFQHYR** **SGVFSGACGP** RVDHAVNIVG YGSEGGVNYW
 310 320 330 340
 IVRNSWGTNW GENGYMRIPR NSQQSGGYCG IAVQAAYPVY

PROCERAIN B (UniProt A0A0A0Q2K8)

10 20 30 40 50 60
 MSFVLFLSFL LFVSAVTCFS TNWRSDEEVI ALYEEWLAKH QKLHSSLREN IEIEIFKDNL
 70 80 90 100 110 120
 RYIDEQNNYN KFNHKNFTLG LNQFADLTLG EFSSIYLGTS IEYDPIISSN PNHHGEEEDI
 130 140 150 160 170 180
 LQEGAIELPN SVDWREKDVV FPIRNQGQCG SCWTFSAVAS IETLIGIKED RMIALSEQEL
 190 200 210 220 230 240
 LDCERTSYGC KGGYYTDAFA YVAKKGLTSR EKYPYIFQQG QCYQKEKVVK ISGYRRIPKN
 250 260 270 280 290 300
 DEKKLQSVVA QQVVS~~GVKS~~ KSRDFQHYS GVFSGACGPR VDHAVNIVGY GSEGGVNYWI
 310 320 330
 VRNSWGTNWG ENGYMRIPRN SNQSGGYCGI AVQAAYPVY

***Bromelia hieronymi* cysteine peptidase (UniProt D2U6V5)**

10 20 30 40 50 60
 AVPQSIDWRD YGAVTSVKNQ GRCGSCWSFS AIATVEGIYK IKTGNLVSLG EQEVLDCAVS
 70 80 90 100 110 120
 HGCKGGWVDK AYNFIISNNG VTSAAAYPYK GYQGTGANS VPNAAYITGY KYVQRNNERS
 130 140 150 160 170 180
 MMYALSNOPI AALIDASGKN FQYYKGGVYS GPCGTSLNHA ITVIGYGQDS SGIKYWIVKN
 190 200 210 220 230
 SWGTSWGERG YIRMARDVSS SGICGIAMAP LFPTLDGAN VEVLMVSET

***B. antiacantha* cysteine peptidase (UniProt A0A515MFQ5)**

10 20 30 40 50 60
 EWMAEYGRVY NDNAEKMRRE QIFKNNVNH IETFNNRSGNS YTLGINQFTD MTNNEFLTRY
 70 80 90 100 110 120
 TGASLPLNIE REPVVSFDDV DISAVPQSID WRDYGAVTSV KNQGSCGSCW AFSAIATVEG
 130 140 150 160 170 180
 IYKIKAGNLV SLSEQEVLDC AVSYGCKGGW VNKAYDFIIS NNGVTSFANL PYKGYKGPCN
 190 200 210 220 230 240
 HNDLPNSACI TGYKYVQSN NERLMMISVAN QPIAALIDAS GDFQYYKGGV FTGPCGTSLN
 250 260 270 280 290 300
 HAITVIGYGQ DSSGTYWIV KNSWGSSWGE RGYIRMARDV SSPGGLCGIA MSTLFPTLDL

B. *fastuosa* cysteine peptidase (UniProt Q6Q2T4)

10 20 30 40 50 60
 EPSPMMERF EEWMAEYGRV YNDNAEKMR **FQIFK**NNVNH IETFNNRSGN SYTLGVNQFT

 70 80 90 100 110 120
 DMTNNEFLAR YTGASLPLNI ERDPVVSFDD VDISAVPQSI DWRDYGAVTS VKNQGSCGSC

 130 140 150 160 170 180
 WAFSAIATVE GIYKIKAGNL ISLSEQEVLD CALSYGCDGG WVNKAYDFII SNNQVTSFAN

 190 200 210 220 230 240
 LPYKGYKGPC NHNDLPNKAY ITGYTYVQSN NERSMMIAVA NQPIAALIDA GGDFQYYKSG

 250 260 270 280 290 300
 VFTGSCGTSL NHAITVIGYG QTSSGTKYWI VKNSWGTSWG ERGYIRMARD VSSPYGLCGI

 310 320
 AMAPLFPTLQ SGANAEEVIKM ISES