



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA

MAESTRÍA EN CIENCIAS APLICADAS

**UTILIZACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SEMIPURIFICADAS
DE AGUAMA (*Bromelia pinguin* L.) PARA LA PRODUCCIÓN DE
HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS**

PRESENTA:

Lic. en Biol. Ana Beatriz Rivera Leyva

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Idalia Osuna Ruiz

CODIRECTOR DE TESIS:

MC. Jesús Martín Moreno Hernández

Mazatlán, Sinaloa, Diciembre del 2020



ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

Mazatlán, Sinaloa, a 30 de noviembre de 2020

Los miembros del Comité de Tesis avalada por la Coordinación de la Maestría en Ciencias Aplicadas de la Universidad Politécnica de Sinaloa, en virtud de que el Alumno **Ana Beatriz Rivera Leyva**, aspirante de Grado de Maestra en Ciencias Aplicadas, satisface los requisitos señalados por las disposiciones del reglamento vigente, y aprueban la liberación de la Tesis de Grado titulada:

UTILIZACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SEMIPURIFICADAS DE AGUAMA (*Bromelia pinguin* L.) PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

EL COMITÉ DE TESIS

Dra. Idalia Osuna Ruiz

MC. Jesús Martín Moreno Hernández

Dr. Jesús Aarón Salazar Leyva

Dr. Israel Benítez García



CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **Mazatlán, Sinaloa** el día 30 del mes de noviembre del año **2020**, el que suscribe **Ana Beatriz Rivera Leyva** alumno del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas con número de matrícula **2018030980**, adscrito a la Universidad Politécnica de Sinaloa, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **Dra. Idalia Osuna Ruiz** y **M.C. Jesús Martín Moreno Hernández**, y ceden los derechos del trabajo intitulado **“UTILIZACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SEMIPURIFICADAS DE AGUAMA (*Bromelia pinguin* L.) PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**, a la Universidad Politécnica de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación. Así mismo, se hace constar, que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la dirección de correo electrónico mca@upsin.edu.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Lic. en Biol. Ana Beatriz Rivera Leyva

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a mi familia por brindarme su apoyo, paciencia y hacerme la persona que soy ahora, en especial a mi madre quien ha sido un gran ejemplo de fortaleza y resiliencia. A mi esposo por darme el mejor regalo de la vida, mi hija, quién es mi fuente de motivación e inspiración para esforzarme cada día y así poder tener un mejor futuro.

Ana Beatriz Rivera Leyva

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a CONACYT por haber sido beneficiado con una beca (923230), a la UPSIN por haberme aceptado en el posgrado MCA, además de brindar las instalaciones para realización del proyecto de tesis.

Al INIFAP por otorgarme la licencia para poder realizar mis estudios, además de brindar suministros para la realización de este trabajo.

Agradezco a mi asesora de Tesis, la Dra. Idalia Osuna Ruiz por su apoyo, comprensión y paciencia, a mi codirector, el MC. Martín Moreno Hernández por su disposición y asesoría. También a los profesores-investigadores, el Dr. Israel Benítez García, Dr. Aarón Salazar Leyva y al Dr. Emmanuel Martínez Montaña, compañeros y tesistas por brindarme sus conocimientos científicos, motivarme y tenerme paciencia durante el desarrollo de este trabajo, y a los estudiantes de servicio social que me apoyaron en el trabajo técnico. A la Dra. Isaura Bañuelos Vargas por brindar las instalaciones y suministros para realizar pruebas de laboratorio.

Este proyecto de tesis se realizó como parte de las actividades que realizan miembros de la Red Temática de Bioproductos y Bioprocesos impulsada por el Programa DELFÍN.

“ESTE TRABAJO FORMA PARTE DE LAS ACTIVIDADES DE LA RED TEMÁTICA CONACYT, “RED 12.3, PARA REDUCIR Y VALORIZAR LAS PÉRDIDAS Y DESPERDICIO DE ALIMENTOS: HACIA SISTEMAS ALIMENTARIOS SOSTENIBLES”, con Clave: 294768”.



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	5
Las Proteasas	5
Función Biológica de las Proteasas Vegetales	7
Empleo de proteasas en la Industria Alimentaria	8
Hidrolizados Proteínicos Funcionales	10
Hidrolizados Proteínicos de Lactosuero	12
Péptidos Antioxidantes en Hidrolizados de Lactosuero	13
Aguama (<i>Bromelia pinguin</i> L.) y su Potencial Biotecnológico	17
Aguama como Nueva Fuente de Proteasas	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	23
CAPÍTULO II	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Materiales	25
Material Biológico	25
Materia Prima	25
Reactivos	25
Metodología	25
Extracción y Semipurificación de Proteasas a Partir de Fruto de Aguama	25

Cuantificación de Proteínas	26
Determinación de la Actividad Proteolítica Total	27
Análisis electroforético por SDS-PAGE	28
Zimogramas	28
Efecto de Inhibidores Específicos Sobre la Actividad Proteolítica	29
Efecto de pH y Temperatura Óptima Sobre la Actividad Proteolítica	30
Efecto de pH y Temperatura en la Estabilidad del Extracto Enzimático	30
Efecto de Iones Metálicos en la Actividad Proteolítica	31
Efecto de Sales en la Actividad Proteolítica	31
Efecto de Agentes Surfactantes y Reductores Sobre la Actividad Proteolítica	32
Efecto de Solventes Orgánicos en la Actividad Proteolítica del Extracto	32
Análisis Proximal de Lactosuero	33
Liofilización de lactosuero	33
Proteína Total	33
Contenido de Lípidos	34
Contenido de Humedad	35
Contenido de Cenizas	35
Producción de Hidrolizados Proteínicos de Lactosuero	35
Perfil SDS-PAGE de los Hidrolizados Proteínicos	37
Actividad Antioxidante <i>In Vitro</i> de los Hidrolizados Proteínicos	37
Potencial Antioxidante Reductora Férrica (FRAP)	38
Actividad de Eliminación de Radical DPPH	39
Reducción del Radical ABTS	39
Diseño Experimental	41
Análisis Estadístico	42
CAPÍTULO III	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Semipurificación de Fitoproteasas de Fruto de Aguama	44
Perfil de Proteínas del Extracto Semipurificado	45
Efecto De Inhibidores Específicos en la Actividad del Extracto Enzimático Semipurificados de Aguama	47
Análisis de Inhibición de la Actividad Proteolítica por Zimografía	48
Efecto del pH Sobre la Actividad Proteolítica y Estabilidad del Extracto Semipurificado	52

Efecto de la Temperatura Sobre la Actividad Proteolítica y Estabilidad del Extracto Semipurificado	55
Efecto de Iones Metálicos en la Actividad Enzimática de Proteasas Extraídas de Aguama	59
Efecto de Sales en la Actividad Proteolítica del Extracto Semipurificado	60
Efecto de Agentes Reductores y Surfactantes Sobre la Actividad Proteolítica del Extracto Semipurificado	62
Efecto de Solventes Orgánicos Sobre la Estabilidad de Extractos Enzimáticos Semipurificados de Aguama	64
Producción de Hidrolizados Proteínicos a Partir de Lactosuero con Distintas Fuentes Enzimáticas	65
Caracterización Proximal de Lactosuero	65
Obtención de Hidrolizados Proteínicos de Lactosuero	66
Determinación de Actividad Antioxidante de Lactosuero y sus Hidrolizados Proteínicos	69
Potencia Antioxidante Reductora Férrica (FRAP)	69
Reducción del Radical DPPH	72
Reducción del Radical ABTS	74
Comparación de la capacidad Antioxidante por Distintas Técnicas in-vitro en Lactosuero e Hidrolizados	78
CAPITULO IV	81
CONCLUSIÓN	82
CAPÍTULO V	84
PERSPECTIVAS	85
REFERENCIAS	86
ABREVIATURAS	106
ANEXOS	107
Curva Estándar de Proteína con Albúmina de Suero Bovino (BSA)	107

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Bromelia pinguin</i> L. A) Inflorescencia B) Infrutescencia.....	17
Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: extracto crudo (EC), carril 3: semipurificado (ESP), señalado con flechas.....	46
Figura 3. Efecto de inhibidores específico de proteasas en extractos semipurificados de aguama. Se evaluó la actividad proteolítica después de una hora de incubación con el inhibidor, usando sustrato caseína.....	48
Figura 4. Gel de electroforesis en condiciones nativas. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: extracto crudo, carril 3: extracto semipurificado, carril 4: papaína.....	50
Figura 5. Zimograma de extractos enzimáticos semipurificados de aguama (ESP) en presencia de diferentes inhibidores. Carril 1: papaína, carril 2: extracto semipurificado de aguama (ESP), carril 3: ESP incubado con Pepstatin A, carril 4: ESP incubado con SBTI, carril 5: ESP incubado con de EDTA, carril 6: ESP incubado con TPCK y carril 7: ESP incubado con Hg ₂ Cl.....	51
Figura 6. pH óptimo de los extractos enzimáticos semipurificados de fruto de aguama. A) Actividad proteolítica relativa a pH ácido y B) Actividad proteolítica relativa a pH neutro- alcalino.....	53
Figura 7. Estabilidad del semipurificado de fruto de Aguama (ESP) a diferentes pH durante 30 y 60 minutos de incubación.....	55
Figura 8. Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de ESP a pH 3 (ácido) y pH 7 (neutro- alcalino).....	56
Figura 9. Termoestabilidad del extracto enzimático semipurificado de fruto de aguama. A) Actividad proteolítica relativa a pH 3 (ácido) y B) Actividad proteolítica relativa a pH 7 (neutro).....	58
Figura 10. Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica de ESP. Se evaluó la actividad proteolítica del extracto semipurificado después de una hora de incubación con el ion metálico, usando sustrato caseína.....	60
Figura 11. Efecto de la actividad proteolítica en presencia de diferentes concentraciones de sales (NaCl y CaCl ₂). Se evaluó la actividad proteolítica del extracto semipurificado después de una hora de incubación con las sales, usando sustrato caseína.....	61
Figura 12. Efecto de diferentes solventes orgánicos en la estabilidad de la actividad proteolítica de ESP.....	65
Figura 13. Monitoreo del grado de hidrólisis (GH) del lactosuero usando las enzimas Papaína, Bromelina y extracto enzimático semipurificado de aguama (ESP) (relación E/S de 1%, a un pH 7.0, a 50 °C).....	67
Figura 14. Perfil electroforético de lactosuero e hidrolizados proteínicos obtenidos con diferentes enzimas. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); Carril 2: Hidrolizado obtenido con papaína; Carril 3: Hidrolizado obtenido con bromelina; Carril 4: Hidrolizado producido con proteasas semipurificadas de aguama; Carril 5: Lactosuero; 6: Lactosuero tratado (fracción soluble de lactosuero sometido a centrifugación posterior a un ajuste de PH y tratamiento térmicos).....	69

Figura 15. Actividad antioxidante FRAP en Equivalentes Trolox de Actividad Antioxidante (TEAC) en lactosuero e hidrolizados proteínicos a diferentes concentraciones.	72
Figura 16. Actividad antioxidante DPPH en Equivalentes Trolox de Actividad Antioxidante (TEAC) en lactosuero e hidrolizados proteínicos a diferentes concentraciones.	74
Figura 17. Inhibición de radical ABTS en lactosuero e hidrolizados proteínicos a diferentes concentraciones.	76
Figura 18. EC ₅₀ de actividad antioxidante ABTS en lactosuero e hidrolizados proteínicos a diferentes concentraciones de muestra.	78
Figura 19. Curva estándar de concentración de proteína (BSA).	107

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Actividad antioxidante de hidrolizados realizados con diferentes enzimas vegetales.	16
Tabla II. Proceso de semipurificación de fitoproteasas de Aguama en pH neutro.	44
Tabla III. Efecto de surfactantes y agentes reductores en la actividad proteolítica de ESP.	63
Tabla IV. Análisis proximal de lactosuero.	66
Tabla V. Actividad antioxidante en Equivalentes Trolox de Actividad Antioxidante (TEAC) medida por distintas técnicas en lactosuero e hidrolizados a una concentración de 10 mg/mL.	80
Tabla VI. Absorbancia de las concentraciones de proteína (BSA), R ² = 0.9767.	107

RESUMEN

En los últimos años, se ha incrementado la búsqueda de proteasas de fuentes vegetales (fitoproteasas), con el fin de ser utilizadas en procesos biotecnológicos, como es el caso de las obtenidas de la aguama (*Bromelia pinguin* L.), cuyo extractos crudos han mostrado presentar estabilidad en un amplio rango de temperaturas, así como a diferentes compuestos usados en la industria, además de ser efectiva en la coagulación de leche y otros bioprocesos. Las fitoproteasas pueden emplearse en la producción de peptidos, como son los obtenidos mediante la hidrólisis de proteínas del lactosuero bovino, el cual es desaprovechado a pesar de ser considerado como uno de los principales subproductos de la industria quesera con alto potencial para la obtención de moléculas bioactivas. Es por ello que en este trabajo se desarrolló un protocolo de semipurificación y caracterización bioquímica del extracto enzimático semipurificado proveniente del mesocarpio del fruto de aguama (*Bromelia pinguin* L.), cuyo desempeño en la producción de hidrolizados proteínicos (HP) de lactosuero con capacidad antioxidante se comparó con aquellos HP elaborados con proteasas comerciales. **Métodos.** Se realizó la extracción y semipurificación de fitoproteasas de aguama, lo cual posteriormente fue caracterizado, evaluando la concentración de proteína, actividad proteolítica total, perfil proteínico por electroforesis, efecto de inhibidores específicos, pH, temperatura, iones metálicos, sales, agentes surfactante, reductores y solventes orgánicos sobre la actividad proteolítica del extraco semipurificado. Se llevó a cabo la producción de HP de lactosuero utilizando distintas fuentes enzimáticas (papaína, bromelina y el extracto semipurificado de aguama) a una relación enzima/sustrato (14, 963 U de actividad proteolítica/por gramo de proteína), ajustando los tiempos de reacción hasta alcanzar un 10% de grado de hidrólisis (GH). El perfil de pesos moleculares de las fracciones proteínicas hidrolizadas se determinó mediante

electroforesis SDS-PAGE. La actividad antioxidante *in-vitro* del lactosuero y los HP se evaluó mediante las técnicas de FRAP, DPPH y ABTS. **Resultados.** EL proceso de semipurificación permitió obtener extractos (ESP) con un factor de purificación de 3.75, presentando bandas proteicas de 20.2, 22.3 y 37.7 kDa, asociadas a proteasas presentes en otras especies vegetales del género *Bromeliaceae*. La actividad de éstas enzimas fue inhibida por TPCK (92 %), HgCl₂ (95 %) y Pepstatin A (44 %), indicando la presencia de Serín, Cisteín y Aspártico proteasas, respectivamente. Las condiciones de pH y temperatura óptima de los ESP se observó a pH 3 y 7 a 60 °C, no obstante los ESP presentaron mayor estabilidad en el rango de temperatura de 25-55 °C a pH 3 y pH 7. Así mismo, las proteasas en ESP fueron estables en presencia de sales, agentes reductores, surfactantes y solventes orgánicos. Los HP producidos con diferentes proteasas con papaína, bromelina y ESP, alcanzaron un GH de 10 % a los 412, 397 y 424 min, respectivamente. Las principales proteínas de lactosuero (lactoferrina y caseína) fueron susceptibles a la hidrólisis por las tres fuentes de fitoproteasas, la albúmina de suero bovino fue hidrolizada por papaína y ESP, las inmunoglobulinas por papaína y Bromelina, mientras β -lactoglobulina por papaína. Los protocolos empleados para evaluar la capacidad antioxidante permitieron evidenciar la presencia de proteínas y péptidos con éstas características en el lactosuero y los HP producidos con diferentes fitoproteasas. La actividad antioxidante medida por ABTS, demostró que el proceso de hidrólisis incrementa esta bioactividad, ya que fue el lactosuero el que presentó la menor actividad al ser necesaria una concentración de 80 mg/mL para poder inhibir el 50 % de los radicales en la prueba (EC₅₀); los HP realizados con bromelina y ESP tuvieron una EC₅₀ de 39.65 y 40.66 mg/mL, respectivamente; mientras que el HP realizado con papaína fue el que presentó mayor actividad antioxidante (EC₅₀ = 24.43 mg/mL).

Conclusiones. Los extractos semipurificados de aguama pueden ser usados en diferentes procesos industriales por su estabilidad. La producción de hidrolizados proteínicos con

proteasas de extractos semipurificados de aguama son una alternativa viable para la producción de peptidos con actividad antioxidante a partir de lactosuero.

Palabras claves: Aguama; extractos semipurificados; hidrolizados proteínicos, actividad antioxidante.

ABSTRACT

In recent years, the proteases from plant sources (phytoproteases) have increased, in order to be used in biotechnological processes, as is the case of those obtained from aguama (*Bromelia pinguin* L.), whose crude extracts have shown to present stability in a wide range of temperatures, as well as to different compounds used in the industry, in addition to being effective in the coagulation of milk and other bioprocesses. Phytoproteases can be used in the production of peptides, such as those obtained by hydrolysis of proteins from bovine whey, which is wasted despite being considered one of the main by-products of the cheese industry with high potential for obtaining bioactive molecules. That is why in this project, a protocol for a semi-purified enzymatic extract from the mesocarp of the aguama fruit (*Bromelia pinguin* L.) was developed, whose performance in the production of protein hydrolyzates (HP) of whey with antioxidant capacity was compared with those HP made with commercial proteases. **Methods.** The extraction and semi-purification of phytoproteases from aguama were carried out, which was subsequently characterized, evaluating the protein concentration, total proteolytic activity, protein profile by electrophoresis, the effect of specific inhibitors, pH, temperature, metal ions, salts, surfactant agents, reducers and organic solvents on the proteolytic activity of the semi-purified extract. The production of HP of whey was carried out using different enzymatic sources (papain, bromelain, and the semi-purified extract of aguama) to an enzyme/substrate ratio (14.963 U of proteolytic activity / per gram of protein), adjusting the reaction times until reaching a 10% degree of hydrolysis (GH). The molecular weight profile of the hydrolyzed protein fractions was determined by SDS-PAGE electrophoresis. The in-vitro antioxidant activity of whey and HP was evaluated using the FRAP, DPPH, and ABTS techniques. **Results.** The semi-purification process allowed to obtain extracts (ESP) with a purification factor of 3.75, presenting protein bands of 20.2, 22.3, and 37.7 kDa, associated with proteases present in other

plant species of the genus Bromeliaceae. The activity of these enzymes was inhibited by TPCK (92%), HgCl₂ (95%), and Pepstatin A (44%), indicating the presence of Serine, Cysteine, and Aspartic proteases, respectively. The pH and optimum temperature conditions of the ESPs were observed at pH 3 and 7 at 60 °C; however, the ESP showed greater stability in the temperature range of 25-55 °C to pH 3 and pH 7. Likewise, proteases in ESP were stable in the presence of salts, reducing agents, surfactants, and organic solvents. The HP produced with different proteases with papain, bromelain, and ESP, reached a GH of 10 % at 412, 397, and 424 min, respectively. The main whey proteins (lactoferrin and casein) were susceptible to hydrolysis by the three sources of phytoproteases, bovine serum albumin was hydrolyzed by papain and ESP, immunoglobulins by papain and Bromelain while β-lactoglobulin by papain. The protocols used to evaluate the antioxidant capacity made it possible to demonstrate the presence of proteins and peptides with these characteristics in the whey and the HP produced with different phytoproteases. The antioxidant activity evaluated by the ABTS test showed that the hydrolysis process increases this bioactivity, since it was the serum that presented the lowest activity since a concentration of 80 mg/mL was necessary to be able to inhibit 50% of the radicals in the test (EC₅₀); HP performed with bromelain and ESP had an EC₅₀ of 39.65 and 40.66 mg/mL, respectively; while the HP performed with papain was the one that presented the highest antioxidant activity (EC₅₀ = 24.43 mg / mL). **Conclusions.** The semi-purified extracts of aguama can be used in different industrial processes due to its stability. The production of protein hydrolysates with proteases from semi-purified extracts of aguama is a viable alternative to produce peptides with antioxidant activity from whey.

Keywords: Aguama; semi-purified extracts; Protein hydrolysates, antioxidant activity.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado la búsqueda de fuentes vegetales para la obtención de enzimas proteolíticas (proteasas), con el fin de ser utilizadas en diversos procesos industriales, como la elaboración de cerveza, productos lácteos, ablandamiento de carne, así como en la industria farmacéutica, generando fármacos y péptidos bioactivos para tratamientos contra cáncer, trastornos digestivos y virales (González-Rábade *et al.*, 2011).

Las proteasas de origen vegetal más comercializadas a nivel industrial han sido papaína, quimopapaína (extraída del látex de papaya), ficina (del látex del árbol de higo); y bromelina (obtenida del tallo de piña) (Sun *et al.*, 2016). Siendo esta última una fuente importante de enzimas proteolíticas, al igual que otras especies de la familia *Bromeliaceae*, los géneros de esta familia como *Ananas*, *Bromelia*, *Hohenbergia* y *Pseudananas*, se caracterizan por presentar grandes cantidades de endoproteasas, siendo por lo tanto, una fuente natural viable para diversos usos biotecnológico (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2019).

La especie más estudiada de la familia *Bromeliaceae* es la *Ananas comosus* (piña), de la cual se obtienen las proteasas Bromelina (EC. 3.4.22.32), Ananaína (EC. 3.4.22.31) que provienen de sus tallos y Bromelina (EC. 3.4.22.33) proveniente de frutos. Otras fitoproteasas poco estudiadas de esta familia como nuevas fuentes de fitoproteasas con potencial tecnológico son la *Bromelia hemisphaerica* (hemisfericina), *B. plumieri* (karatsina), *Pseudananas macrodentes* (macrodontaínas I y II), *B. fastuosa* (balansaína), además de otras proteasas provenientes de *B. serra*, *B. laciniosa*, *B. palmeris*, *B. sylvestris* (Payrol *et al.*, 2008; Natalucci *et al.*, 2009; González-Rábade *et al.*, 2011).

Respecto a esto, una especie de bromelia con uso biotecnológico potencial, es la *Bromelia pinguin* L., la cual es una planta que produce un fruto denominado comúnmente aguama, guámara, piñuela o timbiriche (dependiendo de la región geográfica en la que se

desarrolla), esta especie ha sido utilizada tradicionalmente en etnobotánica y en la elaboración de bebidas usando el fruto, en países tropicales, diferentes estudios demuestran la presencia de enzimas proteolíticas en los frutos, cuyas características catalíticas las hacen interesantes para explorar diferentes aplicaciones industriales (Payrol *et al.*, 2008; Natalucci *et al.*, 2009; Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a; Moreno-Hernández *et al.*, 2017 b; García-Magaña *et al.*, 2018).

Durante los últimos años se ha documentado el empleo de las fitoproteasas (como papaína, ficina y bromelina) en el procesamiento de lácteos, ablandamiento de carne, en la industria de la panificación y en la producción de péptidos bioactivos, estos últimos han presentado especial atención en las últimas décadas, debido a que la actividad biológica que poseen puede mejorar la salud y disminuir la probabilidad de presentar enfermedades (Shah & Mir, 2019). Respecto a esto, diferentes estudios han demostrado que se pueden generar péptidos bioactivos a partir de hidrolizados de diferentes fuentes proteicas durante el procesamiento de alimentos y subproductos, los cuales han sido realizados con diferentes fitoproteasas, entre las cuales se encuentra la bromelina (usando como sustrato proteína aislada de soya, residuos de arroz, harina de palmiche, subproductos de pescado, fracciones de glóbulos rojos de ciervos, ovejas, cerdos y vacas, plasma de ganado y lactosuero) (Lee *et al.*, 2008; Zarei *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Gajanan *et al.*, 2016 ; Rocha *et al.*, 2017; Shah & Mir., 2019).

En los péptidos bioactivos son secuencias cortas de aminoácidos provenientes de la fragmentación de proteínas, los cuales poseen efecto benéfico en las funciones corporales, además estos pueden beneficiar a la salud del organismo (Rocha *et al.*, 2017; Di Bernardini *et al.*, 2011). Una fuente proteica para la elaboración de hidrolizados con péptidos bioactivos es el lactosuero (la parte líquida de la leche que queda después de separar la cuajada en la elaboración de queso) (Bertucci *et al.*, 2018 a; Mares-Mares *et al.*, 2019; FAO, 2019). Este es subutilizado, como alimento de animales y, en mayor cantidad, es desechado, causando problemas de

contaminación, a pesar de poseer diferentes moléculas de valor nutrimental (Hernández, 2015; FAO, 2012).

Como se mencionó anteriormente, las enzimas proteolíticas de aguama presentan potencial aplicación en la industria alimentaria, es por ello que considerando los resultados de Moreno-Hernández *et al.* (2017 a y 2017 b) quienes mencionan que las fitoproteasas presentes en extractos crudos de frutos de Aguama presentan estabilidad a pH ácido en presencia de diferentes compuestos usados en la industria, además tienen la capacidad de coagular leche, mientras García-Magaña *et al.* (2018) realizaron hidrolizados proteínicos con extractos enzimáticos semipurificados de este fruto, sin embargo, no existe información de la caracterización y aplicación de extractos semipurificados de Aguama para la elaboración de hidrolizados proteínicos de lactosuero con el fin de generar compuestos bioactivos, lo cual es importante para la generación de alimentos funcionales, es por ello que en este estudio se realizó una caracterización y evaluación de la capacidad de las fitoproteasas de extractos semipurificados del fruto de esta planta para generar hidrolizados proteínicos con capacidad antioxidante.

ANTECEDENTES

Las Proteasas

Las enzimas son los catalizadores verdes que juegan un papel destacado en la industria, entre éstas, se encuentran las proteasas (también denominadas peptidasas, proteinasas o enzimas proteolíticas) que son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de proteínas, por medio de una reacción de hidrólisis, lo anterior ocurre cuando la proteasa reconoce una secuencia específica de la cadena peptídica en la proteína, generando un péptido o aminoácidos libres, éstas son descritas en la Nomenclatura de enzimas del Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular conocida por sus siglas en inglés como NC-IUBMB, clasificadas como hidrolasas (grupo 3) e hidrolasas de enlaces peptídicos (subgrupo 4) (Terra & Ferreira, 2012). La especificidad de éstas enzimas depende del tipo de aminoácidos y otros grupos funcionales cercanos al enlace que hidrolizan (Sumantha *et al.*, 2006).

Éstas enzimas también pueden clasificarse en dos grupos dependiendo de la posición dónde catalizan la hidrólisis del polipéptido y las exoproteasas (EC 3.4.11-19) realizan hidrólisis reconociendo aminoácidos localizados en los extremos carboxilo o amino terminal y endoproteasas (EC 3.4.21-24), realizar la hidrólisis de enlaces peptídicos localizados en el centro de la cadena peptídica (García-González *et al.*, 2017). Las exoproteasas se les clasifican respecto al extremo preferentemente para realizar la hidrólisis: aminoproteasas (NH_3^+ - terminal), y las carboxi proteasas (COO-terminal). Por su parte, las endoproteasas se subdividen en diversos grupos dependiendo de los residuos o la necesidad de un ión metálico en su sitio activo para llevar a cabo la catálisis, por ejemplo, serin-, aspártico- y cisteín- proteasas, en las cuales los residuos del aminoácido serina, ac. aspártico y cisteína, respectivamente intervienen en la reacción. Así como en las metalo-proteasas donde intervienen los iones Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}

en coordinación con diferentes residuos para efectuar la hidrólisis (Rawlings *et al.*, 2010; Terra & Ferreira, 2012).

La base de datos MEROPS (the peptidase Data base- EMBL-EBI, <https://www.ebi.ac.uk/merops/>) utiliza una clasificación jerárquica de las proteasas la cual se basa en su estructura, agrupando por familia, las cuales son un conjunto de enzimas proteolíticas homólogas, debido a la similitud significativa en su secuencia de aminoácidos con la enzima tipo de la familia o con otra proteína que haya demostrado ser homóloga a la enzima tipo. Cada familia se identifica con una letra que representa el tipo catalítico de las enzimas proteolíticas que tienen un número único, algunas de éstas familias se subdividen en subfamilias (Rawlings *et al.*, 2008).

De acuerdo con MEROPS, las proteasas se clasifican en: Asparto- (A), las cuales son endoproteasas activas principalmente a pH ácido, cuyo centro catalítico está formado por dos residuos del aminoácido Aspártico (Asp) que se activan con una molécula de agua, y esto media el ataque nucleofílico en el enlace peptídico (James, 2004); Cisteína- (C), endoproteasas y algunas exoproteasas, sus residuos catalíticos usan Cisteína (Cis) e Histidina (His) como nucleófilo lo que forma una diada catalítica (Rawlings *et al.*, 2018) siendo activadas por compuestos de tipo tiol (Grudkowska & Zagdanska, 2004); Glutámico- (G), endoproteasas de hongos, se ha interpretado que el glutámico en la posición (Glu136), aporta el residuo catalítico primario (Fujinaga *et al.*, 2004); Metalo- (M), aminoproteasas cuyo enlace catalítico de iones de zinc el cual está unido por dos His y un Glutámico (Glu) (Rawlin *et al.*, 2018); Asparagina- (N), se sugiere que los residuos del sitio activo son Asp75 y Asn363 (Aspártico y Asparagina en las posiciones 75 y 363, respectivamente) (Reddy *et al.*, 2004); Treonina- (T), en éstas enzimas los residuos de Treonina (Thr) en la posición N-terminal de algunas de las subunidades beta, funcionan como nucleófilos en la catálisis (Seemuller *et al.*, 1995); Serina-proteasas (S),

endoproteasas, formando la triada catalítica con los residuos de aminoácidos Ser (serina), His y Asp (Hedstrom, 2002; Rawling, *et al.* 2018); y Mixtas (P), las cuales incluyen amino proteasas y proteínas de autoprosesamiento (Fanuel *et al.*, 1999).

Función Biológica de las Proteasas Vegetales

Las proteasas son enzimas que juegan un papel importante en diversos procesos biológicos, ya que son responsables de la maduración, tráfico intracelular y degradación de diferentes proteínas (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2016). Las proteasas vegetales o fitoproteasas son reguladores de procesos biológicos en las plantas, tales como la meiosis, supervivencia de gametofitos, embriogénesis, formación de la semilla, deposición de cutículas, destino de células epidérmicas, desarrollo de estomas, biogénesis de cloroplastos y respuestas de defensa local y sistémica, además son acumuladas en diferentes compartimentos celulares como vacuolas, vesículas, lisosomas, citoplasma, núcleo, endosomas, membrana plasmática y cloroplastos y/o acumuladas en apoplasto, con el fin de llevar a cabo funciones biológicas dentro de la planta (Van der Hoorn, 2008; Balakireva & Zamyatin, 2018).

Las proteasas vegetales se dividen en siete clases, según la base de datos MEROPS: serina (S), cisteína (C), aspártico (A), asparagina (N), treonina (T), glutamato (G) y metalo (M) –proteasas (Rawlings *et al.*, 2014). Y como se mencionó anteriormente, éstas enzimas son importantes en distintos procesos biológicos de las plantas, por ejemplo, las Cisteín-proteasas, incluyen enzimas que participan activamente durante la muerte celular programada en las plantas, regulan procesos fisiológicos que involucran las células epidérmicas, influyen en los tiempos de floración y la arquitectura de inflorescencias, así como en el desarrollo del polen o el embrión, algunas de éstas han sido caracterizadas en las plantas, por ejemplo: la fitocalpaína (esencial en el desarrollo de la epidermis); proteasas del tipo papaína (relacionadas con la

identificación de patógenos, la señalización de resistencia a enfermedades, defensa contra insectos y senescencia); otras involucradas en la muerte celular como las caspasas y metacaspasas (en citoplasma o núcleos), o enzimas de procesamiento vacuolar (Van der Hoorn, 2008).

Por su parte, Serín-proteasas, como las subtilasas se consideran convertasas de prohormonas específicas, mientras que las proteasas similares a carboxiproteasas se encuentran realizando su función dentro de vacuola (Fraser *et al.*, 2005). Es probable que algunas Metaloproteasas se encuentren unidas a la membrana, restringiendo el tamaño del meristemo apical del brote al promover diferenciación, son esenciales para el desarrollo de plástidos y el gravitropismo (movimiento en relación a la gravedad) de brotes (Van der Hoorn, 2008). Enzimas Aspártico-proteasas, similares a pepsina producen pre-proteasas, éstas son secretadas generalmente de las células en forma de enzimas glicosiladas inactivas, activándose posteriormente en forma autocatalítica a pH ácido, éstas proteasas se relacionan con la respuesta de defensa, ante micro lesiones, presencia de altos niveles de intermedios reactivos de oxígeno (IRO) y ácido salicílico (Suzuki *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2004; Van der Hoorn, 2008).

Empleo de proteasas en la Industria Alimentaria

Las enzimas forman parte del procesamiento de diferentes productos industriales, haciéndolos procesos ecológicos, manteniendo la calidad del medio ambiente y la sustentabilidad (Nair & Jayachandran, 2018). En la industria alimentaria, las proteasas se utilizan con el fin de mejorar las características nutricionales, pueden prolongar la vida de anaquel de los alimentos, son capaces de modificar algunas propiedades funcionales, así como prevenir reacciones no deseadas, y pueden mejorar sabores y olores (González-Rábade *et al.*, 2011).

En términos generales, las proteasas industriales pueden provenir de diferentes fuentes: de origen animal, como la quimosina, pepsina y tripsina, obtenidas del tracto digestivo; de origen microbiano, obtenidas de especies como *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Aspergillus sp.* y *Rhizomucor sp.*; y en menor medida, pero empleadas desde la antigüedad (Feijoo-Siota & Villa, 2010), de origen vegetal, como la papaína (extraída del látex de la papaya), la Bromelina (del tallo de la piña), la cardosina, cinarasa y ficina (proteasas obtenidas del látex del árbol de higo) (Aehle, 2004; Sullivan & Calkins, 2010).

Sin embargo, impulsado por aspectos culturales y religiosos de ciertas comunidades o preocupaciones relacionadas con efectos de salud en los consumidores (asociado a enfermedades emergentes transmitidas de animales a humanos). En los últimos años se han buscado fuentes de proteasas alternativas a las de animales terrestres, como las de origen bovino y porcino para que puedan ser utilizadas en procesos tecnológicos (Ogawa *et al.*, 2004). En este sentido, enzimas de origen vegetal pueden resultar atractivas, ya que a lo largo de su ciclo de vida las producen constantemente y por lo tanto pueden considerarse una fuente importante de éstas (Schaller, 2004). Por lo que en la actualidad, ha incrementado el interés por las proteasas de estas fuentes, ya que han sido utilizadas durante siglos en el procesamiento de alimentos en la industria láctea (por ejemplo en la coagulación de proteínas) y en la panificación (González-Rábade *et al.*, 2011), así como en la industria farmacéutica y otros procesos biotecnológicos debido a que poseen actividad en un amplio rango de temperaturas y pH (Dubey *et al.*, 2007), características deseables en las enzimas industriales.

En el caso particular de aplicaciones de fitoproteasas en la industria de alimentos, al momento, existen reportes de la evaluación de diversas enzimas obtenidas a partir de una gran variedad de especies vegetales. De acuerdo con Shah & Mir (2018), más de treinta especies de plantas se han estudiado por su acción proteolítica en la coagulación de lácteos, identificando la

presencia de las enzimas cardosina, cipsosina, cinarasa, onopordosina, orizasina, procirsina, ficina, zingibaina, actinidina, cucumisina, nerifolina (S), dubiumina, religiosina (A,B,C), streblina, hieronymaina y letucina; destinada al tratamiento de productos cárnicos se han reportado al menos diez especies de plantas como fuentes de actinidina, bromelina, ficina, papaína y zingibína; En cuanto a la modificación de harina y masa, se han destinado las enzimas bromelaína, papaína y caricaína; Y al menos nueve especies han sido utilizadas como fuentes de papaína, bromelina, ficina, actinidin, zingibaina, salpichronina, pomiferina, cipsosina, cardosina, onopordosina, con las cuales ha sido posible producir péptidos bioactivos, los cuales pueden ser empleados en alimentos por su funcionalidad (Shah & Mir, 2018).

Hidrolizados Proteínicos Funcionales

El término funcional, aplicado a productos alimentarios, hace referencia a aquellos alimentos que además de aportar nutrimentos, al ser ingeridos regularmente son capaces de mejorar la salud del consumidor, pudiendo tener efectos positivos en los sistemas inmunológico, cardiovascular, nervioso e intestinal (Udenigwe & Aluko, 2012), un hidrolizado proteínico puede ser considerado un alimento funcional, si cumple con dicha característica.

Los hidrolizados proteínicos (HP) resultan de un proceso hidrolítico realizado sobre los enlaces peptídicos de la proteína utilizada como materia prima, con la finalidad de generar péptidos de menor tamaño molecular o inclusive de aminoácidos libres (Rutherford & Gilani, 2009), con este proceso, las proteínas son solubilizadas de la fuente proteica original, incrementando la posibilidad de mejorar su valor biológico y nutricional, asociado a la liberación de diferentes tamaños, el aumento de grupos ionizables y la exposición de grupos hidrófobos ocultos, con lo cual es posible obtener productos de alto valor agregado e interés comercial (Silva *et al.*, 2014; Calderón-Chiu *et al.*, 2020), siendo el grado de hidrólisis (GH) alcanzado en

el proceso, un parámetro importante en las propiedades funcionales exhibidas. En la mayoría de los HP se ha reportado que aquellos que tienen un GH < 10% son los que presentan mejores propiedades funcionales, y que el cambio y exposición de los aminoácidos presentes y sus residuos puede controlar la actividad biológicas de los péptidos generados dando lugar a bioactividades importantes como la capacidad antioxidante (Calderón-Chiu *et al.*, 2020).

Una técnica controlada para producir HP con propiedades funcionales y bioactivas, es la hidrólisis enzimática. En comparación con la hidrólisis química, la hidrólisis enzimática, presenta mayores ventajas en la generación de péptidos funcionales, ya que utiliza condiciones menos agresivas lo cual la hace, más fácil de controlar, con la ventaja de ser más precisa en la escisión de enlaces peptídicos y no genera reacciones secundarias, que como consecuencia puede provocar la disminución del valor nutricional, además, presenta mayor facilidad en la recuperación de proteínas y en la purificación de péptidos de interés (Tavano, 2013; Benjakul *et al.*, 2014; Villamil *et al.*, 2017).

Para la elaboración de HP, es posible utilizar una gran variedad de fuentes de proteína, siendo los subproductos agroindustriales una de las fuentes que más interés ha cobrado por la posibilidad de dar valor agregado u disminuir el impacto medioambiental. En términos generales, los subproductos agroindustriales que contienen proteína entre 10-50%, pueden presentar potencial para ser fuente de péptidos bioactivos, la bioactividad desarrollada en éstos, dependerá de la secuencia de aminoácidos, el peso molecular, las conformaciones y propiedades superficiales (Dullius *et al.*, 2018). Las proteínas empleadas como materia prima para producir péptidos funcionales, pueden ser subproductos de origen vegetal o de origen animal, dentro de éstas últimas, destacan las proteínas de lactosuero, por poseer además de calidad nutricional, un mayor valor biológico que la caseína (proteína mayoritaria y coagulada para obtener el queso), las proteínas del lactosuero, son ricas en aminoácidos esenciales humanos (AA), aminoácidos

de cadena ramificada (BCAA) y AA con azufre, lo que promueve regulación metabólica y el plegamiento de proteínas (Görgüç *et al.*, 2020), además pueden funcionar como fuente de nitrógeno en alimentación humana, siendo ideal en la preparación de alimentos infantiles y dietas enterales (Vairo-Cavalli *et al.*, 2008).

Hidrolizados Proteínicos de Lactosuero

El suero de leche o lactosuero es la fracción líquida remanente después del proceso de coagulación de la leche y la cual es separada de la cuajada durante la fabricación de queso, por lo tanto, un subproducto importante de la industria quesera (FAO, 2019; Mazorra-Manzano & Moreno-Hernández, 2019).

El suero lácteo está constituido por aproximadamente el 20% del total de proteína de la leche, contiene una buena proporción de aminoácidos de tipo esenciales, aminoácidos de cadena ramificada y aminoácidos con azufre, además de proteínas, contiene lactosa oligosacáridos, grasas, vitaminas A, C, D, E y del complejo B, minerales (calcio, fósforo, potasio y hierro), posee un pH entre 6.5 y 6.8 (Miranda *et al.*, 2009). Es por ello que la industria ha buscado alternativas para la recuperación de los componentes de este subproducto, ya sea en la elaboración de suero en polvo, aprovechamiento como bebidas a base de suero y bebidas fermentadas (Adjonu *et al.*, 2013). Industrialmente se utiliza en la fabricación de lactosa, pasta de suero y suero en polvo dado que es de fácil digestibilidad (Dullius *et al.*, 2018).

Sin embargo, pese al valor nutricional que posee el lactosuero y a que se ha aumentado su aprovechamiento en la producción de otros alimentos, una gran parte de éste es subutilizado en los sistemas de producción porcina y una mayor proporción del mismo es descartado, causando problemas de contaminación en los sitios donde se vierte, como efluentes, suelos y manto freático (FAO, 2012; Hernández, 2015). Esta subutilización o descarte, es probable que

se deba al desconocimiento de ciertos productores respecto al valor nutricional de este subproducto y a la posible dificultad en el acceso a las tecnologías apropiadas para su manejo, procesamiento y aprovechamiento (Poveda & Elpidia, 2013).

Una posible alternativa de aprovechamiento del lactosuero, es la generación de HP con funcionalidad biológica del tipo antimicrobiana, inmunomoduladora, antihipertensiva, anticáncer y antioxidante (De Carvalho-Silva *et al.*, 2012; Dullius *et al.*, 2018).

Al respecto, diversos autores han reportado el desarrollo de actividad antioxidante cuando la proteína de lactosuero ha sido hidrolizada utilizando fitoproteasas extraídas de diferentes plantas como *Maclura pomifera* (Bertucci *et al.*, 2015), *Carica papaya* (Le Maux *et al.*, 2016), *Ananas comosus* (Corrochano *et al.*, 2018 a); también se pueden generar hidrolizados con actividad antioxidante con enzimas comerciales como la alcalasa (Halavach *et al.*, 2020).

Péptidos Antioxidantes en Hidrolizados de Lactosuero

Los péptidos bioactivos son secuencias cortas de aminoácidos provenientes de la fragmentación de proteínas, los cuales poseen efecto benéfico en las funciones corporales, además estos pueden beneficiar a la salud del organismo (Rocha, 2017). El momento de fragmentar la fuente proteica, los residuos de aminoácidos presentes en las secuencias de la proteína nativa, son expuestos en los péptidos generados, lo que tiene un impacto positivo en ciertas funciones fisiológicas de los organismos que los consumen; siendo el tamaño, la composición y el orden de los aminoácidos presentes en la secuencia, factores determinantes en su actividad biológica (Lafarga & Hayes, 2014), siendo reportadas bioactividades relacionadas con la capacidad para actuar como quelantes, la estimulación de crecimiento de bacterias probióticas, así como propiedades anticoagulantes, antimicrobianas, hipocolesterolémicas, antihipertensivas y antioxidantes (Meza-Espinoza *et al.*, 2017 a). En términos generales, una de

las bioactividades más comúnmente exhibida por los hidrolizados de proteínas, es la actividad antioxidante, siendo los péptidos presentes los responsables de dicha bioactividad (Memarpoor-Yazdi *et al.*, 2012).

La antioxidación es necesaria en los organismo, ya que la oxidación es un proceso biológico importante en el cual se genera energía en muchos sustratos, mientras que en el metabolismo humano las células aeróbicas producen especies reactivas de oxígeno (EROS), los cuales se pueden encontrar en forma de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), radicales aniónicos superóxido ($\cdot\text{O}^{2-}$) e hidrógeno peróxido (H_2O_2), nitrógeno reactivo o especies de azufre reactivo, estos radicales pueden tener efectos patológicos en los organismos (Corrochano *et al.*, 2018 a; Chen & Huang, 2019).

Algunas consecuencias de la oxidación son lesiones celulares como peroxidación de proteínas y lípidos, rotura de cadena de ADN, racemización o descarboxilación de aminoácidos, disfunción enzimática y descomposición oxidativa de los carbohidratos, pudiendo causar trastornos neurodegenerativo, cáncer, daño hepático, envejecimiento, fibrosis quística o enfermedades cardiovasculares, este daño se puede evitar mediante la actividad antioxidante, la mediante un compuesto antioxidante que retarda la aparición o elimina las especies reactivas, en especial las que son derivadas del oxígeno (Corrochano *et al.*, 2018 a; Salehi *et al.*, 2018). Por lo que, el empleo de péptidos bioactivos antioxidantes, pueden mejorar la salud de los consumidores potenciales con posibles efectos positivos a nivel inmunológico, cardiovascular, nervioso e intestinal (Udenigwe & Aluko, 2012).

Diversos reportes revelan que existe una dependencia de la bioactividad de péptidos con las condiciones empleadas en la hidrólisis proteínica, factores como la especificidad de la enzima empleada, las características químico-estructurales de la proteína sustrato, así como las condiciones de hidrólisis empleadas (temperatura, relación enzima-sustrato, pH, etc.); Se ha

encontrado que el uso de diferentes enzimas proteolíticas y las condiciones empleadas en la hidrólisis influyen en la producción de los péptidos con actividad antioxidante, lo que se traduce en HP con características variadas aún cuando como fuente proteica al lactosuero (Tabla I). Por lo que las propuestas encaminadas a evaluar nuevas enzimas como las provenientes de especies vegetales subutilizadas para producir péptidos antioxidantes a partir de lactosuero, sigue representando una alternativa para su aprovechamiento.

Tabla I. Actividad antioxidante de hidrolizados de proteína de lactosuero generados mediante el empleo de fitoproteasas.

Materia prima	Proteasa	TH (hrs)	GH (%)	Secuencia peptídica	Concentración	Técnica de Actividad antioxidante	Actividad Antioxidante (% inhibición)	Referencia
LD	ESP <i>Maclura pomífera</i>	3	31.30	α -LA: f(5–12) KCEVFREL, f(6–13) CEVFRELK, f(13–19)	4.44 mg/mL proteína de péptidos <3kDa	ABTS	EC ₅₀ 4.44 mg/mL	Bertucci <i>et al.</i> , 2015
PAL	Asparto proteasa de <i>Salpichroa origanifolia</i>	20	5.8	Péptidos menores a 3 kDa NE	3.36 mg/mL proteína	DPPH	EC ₅₀ 3.36 mg/mL	Rocha <i>et al.</i> , 2017
LDP	Bromelina	3	11.98-15.37	NE	1 mg/mL de proteína	ABTS	15.4-18.19%	Abadía-García <i>et al.</i> 2016
	Papaína		12.05-19.62				19.47-22.37%	
PAL	Papaína	3.6	NE	NE	2 mg/mL péptidos <5kDa	DPPH	31.36%	Zhidong, <i>et al.</i> 2013
						FRAP	0.61%	
PAL	Papaína	5	3	NE	Diluciones de hidrolizado	FRAP	0.86 %	Mohan <i>et al.</i> 2015
PAL	Papaína	3	4.93	NE	8 mg/MI	ORAC	0.2853 mmol TE/g	Le Maux <i>et al.</i> 2016

LD= lactosuero descremado, PAL= Proteína aislada de lactosuero, LDP= Lactosuero descremado y pretratado. ESP= Extracto semipurificado. TH= Tiempo de hidrólisis. GH= Grado de hidrólisis. NE= No especificado.

Para la producción de hidrolizados proteínicos con bromelina y papaína, en todos los estudios se emplearon las enzimas comerciales liofilizadas.

Aguama (*Bromelia pinguin* L.) y su Potencial Biotecnológico

La aguama o guámara es una planta (Figura 1) que se distribuye en América Central y en las islas del Caribe, ampliamente, creciendo como una planta silvestre en zonas áridas (Payrol *et al.*, 2008).



Figura 1. *Bromelia pinguin* L. A) Inflorescencia B) Infrutescencia. Imágenes tomadas de: (Naturalista, 2019).

La planta completa se emplea como cercas vivas, las pencas son usadas para obtener fibra, elaboración de adornos y los frutos son usados en bebidas y en etnomedicina (Monragón-Chaparro *et al.*, 2011), esto último asociado a la presencia de diferentes metabolitos secundarios, como fenoles, alcaloides, terpenos, saponinas y ácidos grasos, y presencia de componentes con actividades biológicas como antihelmíntica (contra *Lumbricus terrestres* y *Trichomonas vaginalis*) probablemente debida a la acción de endoproteasas cisteínicas (Payrol *et al.*, 2001; Payrol *et al.*, 2005 b), también ha sido reportada la actividad anti fúngica y antibacteriana contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Echirichia* y *Pseudomonas* (González & Trelles, 2007).

Por su parte, Ruiz-Ruiz *et al.*, (2016) encontraron actividad antibacteriana de extractos fraccionados mediante cromatografía de filtración en gel contra *E. coli* y *S. aureus*, lo cual se atribuye a la actividad proteolítica de la pulpa de frutos de *B. pinguin*.

Existen múltiples reportes etnobotánicos de los frutos de aguama, en los que se informa que éstos son utilizados frecuentemente como diuréticos, abortivos, antimicrobiano, también, para el tratamiento de enfermedades como tos ferina, escorbuto, diabetes y enfermedades renales (Camacho-Hernández *et al.*, 2002). En la mayoría de los casos se atribuyen algunas de éstas propiedades a la presencia de ácidos como el ascórbico, cítrico, glicólico, málico, láctico, succínico, aconítico, así como minerales como calcio, potasio y magnesio (Pío-León *et al.*, 2009); En otros casos, las propiedades medicinales se han atribuido a la presencia de endoproteasas cisteínicas comúnmente llamadas pinguinaína (Toro-Goyco *et al.*, 1980;; Payrol *et al.*, 2007).

Aguama como Nueva Fuente de Proteasas

Debido a que diferentes autores han reportado la presencia de proteasas en frutos de aguama en diferentes países como Puerto Rico (Toro-Goyco *et al.*, 1968), Cuba (Payrol *et al.*, 2005 a y 2008) y México (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a; García-Magaña *et al.*, 2018; Meza-Espinoza *et al.*, 2017 a), y considerando que, en términos generales las características de la actividad proteolítica como: 1) Extractos crudos con estabilidad en condiciones tanto ácidas como alcalinas neutras; 2) Amplia termoestabilidad; 3) Estabilidad a diversas condiciones usadas en procesos industriales (solventes orgánicos, surfactantes y agentes reductores). Hace que esta fuente sobresalga respecto a otras especies del mismo género, y sugiere por tanto, que los extractos crudos de aguama poseen proteasas que pueden ser potencialmente utilizables en industrias como la cervecera, de detergentes y farmacéutica (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a),

por otro lado, previamente ha sido comprobado que estos extractos crudos presentan actividad coagulante de leche (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 b).

Algunos estudio, han demostrado una mayor recuperación de actividad en extractos del fruto de aguama, cuando se añaden técnicas sencillas de semipurificación. Por ejemplo, la precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, presentó una mayor actividad proteolítica específica (García-Magaña *et al.*, 2018) respecto a lo reportado para extractos crudos (Moreno-Hernández *et al.*, 2017b), siendo de 43.58 U/mg y 3.3 U/mg, para semipurificado y extracto crudo, respectivamente. También, se ha encontrado que el empleo de extractos semipurificados de fitoproteasas de esta fuente vegetal son capaces de producir biopéptidos con actividad antioxidante a partir de leche, albúmina de huevo y proteína de soya (Meza-Espinoza *et al.*, 2017 b).

Sin embargo, a pesar de éstas investigaciones, aún no se ha reportado la aplicación de estos extractos semipurificados de proteasas de aguama en la producción de hidrolizados de lactosuero con el propósito de generar péptidos con actividad antioxidante. Por lo que, se considera un área de oportunidad para la atención de: 1) Proponer alternativas de uso para *Bromelia pinguin* como fuente de proteasas con aplicación industrial; 2) Generación de productos de valor agregado, a partir de subproductos como el lactosuero, utilizando fitoproteasas de aguama.

JUSTIFICACIÓN

Las proteasas son las enzimas con más demanda dentro de los procesos industriales, aunque éstas pueden aislarse de diversas fuentes incluyendo animal y microbiana, son las vegetales una de las fuentes más estudiadas en los últimos años, asociado a sus propiedades catalíticas atractivas y potenciado por nuevas tendencias de consumo. Dentro de las fuentes vegetales destacan las proteasas aisladas de plantas pertenecientes a la familia *Bromeliaceae* la cual posee diferentes especies productoras de enzimas proteolíticas. Una de éstas especies es *Bromelia pinguin*, cuya diversidad de proteasas en sus frutos ha sido recientemente estudiada. No obstante aún se requiere del perfilamiento tecnológico de éstas enzimas.

Una de las aplicaciones más pertinentes de las fitoproteasas es la producción de hidrolizados proteínicos (HP) con el fin de liberar de péptidos con propiedades bioactivas, destacando los péptidos antioxidantes. Éstos péptidos se han reportado en HP de diversas fuentes proteicas, incluyendo los subproductos y co-productos lácteos como el lactosuero, el cual a pesar de poseer diferentes moléculas de valor nutrimental, en muchas ocasiones es desaprovechado o subutilizado en alimentación animal y en mayor medida, es desechado causando problemas de contaminación. Aunado a esto, son escasos los estudios que emplean este subproducto como materia prima para la generación de moléculas bioactivas.

Es por ello que explorar alternativas biotecnológicas que eventualmente permitan tanto el aprovechamiento de especies vegetales subutilizadas para obtener enzimas con potencial aplicación en bioprocesos, así como, la revalorizar los subproductos de la industria alimentaria utilizando dichas enzimas, ha sido identificado como un área de oportunidad que el presente trabajo de investigación atiende, al generar información base para: 1) Producir y caracterizar un extracto semipurificado de fitoproteasas del fruto de aguama; y 2) Evaluar la capacidad de

dichas fitoproteasas para generar hidrolizados proteínicos con capacidad antioxidante a partir de lactosuero bovino.

HIPÓTESIS

El extracto enzimático semipurificado del mesocarpio de fruto *Bromelia pinguin*, debido a su actividad y estabilidad ante diferentes factores, puede ser empleado para la producción de hidrolizados proteínicos de lactosuero generando péptidos con actividad antioxidante.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener y caracterizar bioquímicamente un extracto enzimático semipurificado a partir de mesocarpio del fruto de aguama (*Bromelia pinguin* L.) y comparar su efectividad frente a proteasas comerciales para la producción de hidrolizados proteínicos de lactosuero con capacidad antioxidante.

Objetivos Específicos

1. Semipurificar enzimas proteolíticas de aguama (*Bromelia pinguin*).
2. Caracterizar bioquímicamente el extracto enzimático.
3. Establecer condiciones para un proceso de hidrólisis de lactosuero empleando dos fuentes comerciales de fitoproteasas (Papaína y Bromelina) y el extracto enzimático semipurificado.
4. Comparar la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos con fitoproteasas semipurificadas de aguama respecto a los producidos con enzimas comerciales.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Material Biológico

Los frutos de Aguama maduros, se obtuvieron de un mercado local de Culiacán, Sinaloa, en mayo de 2019. Estos se mantuvieron en bolsas herméticas y almacenadas a -20 °C hasta la preparación de los extractos enzimáticos.

Materia Prima

El lactosuero de leche de bovino, fue proporcionado por un productor de queso artesanal de Villa Unión, Sinaloa. El cual es obtenido mediante el uso de cuajo comercial durante la preparación del queso. Una parte del lactosuero fresco fue liofilizado para realizar el análisis proximal y posteriormente fue almacenado en bolsas herméticas a -20 °C, otra parte de la muestra se mantuvo en estado líquido y fue almacenado a la temperatura de -20 °C.

Reactivos

Los reactivos utilizados en este proyecto fueron de grado analítico y suministrados por SIGMA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) a menos que se especifique lo contrario.

Metodología

Extracción y Semipurificación de Proteasas a Partir de Fruto de Aguama

Para la extracción de proteasas a partir de la pulpa del fruto se mezcló 20 g de mesocarpio (sin semilla) en una solución amortiguadora 2 mM Tris-HCl, pH 7.0 (1:5 p/v) con un homogeneizador (BIO ESGE) durante 5 min en cama de hielo, la mezcla resultante se filtró para, posteriormente centrifugarse a 5,000x g por 25 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante, el

cual fue designado como extracto crudo (EC). Se tomaron alícuotas, las cuales fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a).

Al EC se le añadió etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una relación 1:1 (v/v), se agitó por inversión levemente y se dejó reposar por 20 min en cama de hielo, posteriormente se centrifugó a $5,000x\text{ g}$ por 25 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se recuperó el sobrenadante al cual se le llamó sobrenadante de etanol (SE) y al precipitado se le llamó precipitado de etanol (PE), a los cuales se tomaron alícuotas, siendo almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso.

Al SE se le añadió 4 volúmenes de etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, posteriormente se agitó levemente por inversión y se dejó reposar durante 20 min en cama de hielo, después del reposo, se centrifugó a $10,000x\text{ g}$ por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado resultante fue suspendido con solución amortiguadora 2 mM Tris-HCl, pH 7.0 en una relación 1:3 (m/v), respectivamente. Esta suspensión fue nombrada como extracto semipurificado de Aguama (ESP), también se tomaron muestras del sobrenadante resultante de esta extracción (S4E), el cual fue almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Modificado de Pérez *et al.*, 2010). Una parte de este fue liofilizado y posteriormente almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el fin de ser usado para realizar los hidrolizados proteínicos.

Cuantificación de Proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el ensayo de Bradford (1976). Un volumen de cada fracción (EC, SE, EP, S4E y ESP) fue agregado al colorante azul de Coomassie en una relación 0.1:1 v/v, posteriormente fue incubado a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida en un espectrómetro de UV-Vis a 595 nm (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a). Se utilizó una curva estándar con albúmina de suero bovino (BSA) de 0.05- 0.6 mg/mL para calcular la concentración de proteína (Anexos: Tabla VI).

Determinación de la Actividad Proteolítica Total

La actividad proteolítica fue evaluada con los sustratos naturales hemoglobina al 1% (con solución amortiguadora Glicina-HCl 0.1 M, pH 3.0) y caseína al 1% (con solución amortiguadora 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0). Un volumen de 500 μ L de cada sustrato fue incubado con 20 μ L de las fracciones enzimáticas (EC, SE, EP, S4E y ESP) bajo condiciones estándar, 25 °C por 15 min. La reacción enzimática fue detenida con la adición de 500 μ L de ácido tricloroacético (ATA) al 10% (p/v) e incubando las muestras durante 10 min en refrigeración (4° C), para después ser centrifugadas a 22,000x g por 10 min. La absorbancia del sobrenadante registrada a 280 nm fue empleada para calcular la actividad proteolítica total respecto a un blanco, agregando ATA a la mezcla antes de la incubación del extracto enzimático con el sustrato (modificando el tiempo de incubación de García-Carreño & Haard, 1993; Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a). Se definió una unidad de actividad proteolítica como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ g de tirosina a partir del sustrato (hemoglobina o caseína) por minuto bajo condiciones del ensayo.

La actividad proteolítica total se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad total: } \left[\frac{\frac{\Delta Abs_{280}}{\text{min}} \times 1000 \times \text{Vol. reacción}}{0.051} \right] \text{ Ecuación (1)}$$

Dónde:

ΔAbs_{280} = incremento de la absorbancia a 280 nm

Vol. Reacción = es el volumen final que se obtuvo de los reactivos en mL (1.52 mL).

0.051 = es el coeficiente de extinción molar de la Tirosina

Min = es el tiempo de incubación de la reacción (30 min)

Análisis electroforético por SDS-PAGE

Se mezcló cada extracto enzimático (EC y ESP) con amortiguador de carga 2 x SDS (Tris-HCl 0.1 M, pH 6.8, dodecil sulfato de sodio al 1.2 %, glicerol al 30 %, 2-mercaptoetanol al 15 % y azul de bromofenol al 0.0018%). Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 15 min, posteriormente fueron cargadas en un sistema de geles discontinuos de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 5% p/v como gel concentrador y gel al 12% (p/v) para resolución. Se empleó una unidad de electroforesis Mini-PROTEAN, BIO-RAD, bajo las condiciones de voltaje constante de 100 V durante 90 min. Finalmente estos fueron teñidos con colorante azul brillante de Coomassie R250 al 0.1% (p/v) (metanol/ácido acético glacial/agua en una proporción 5:2:5, respectivamente) y desteñidos con una solución al 10% (v/v) ácido acético y metanol al 30% (v/v) hasta obtener la coloración adecuada. El peso molecular de las bandas de proteínas fue estimado utilizando estándares de peso molecular de amplio rango, 161-0317 (6.5-200 kDa) de Bio-Rad Laboratorios, (LaemmLi, 1970).

Zimogramas

Las proteasas activas en las fracciones enzimáticas fueron analizadas mediante zimografía, empleando un gel de resolución con poliacrilamida al 12% con las muestras de extracto semipurificado, las condiciones de preparación del gel fueron similares a la electroforesis SDS-PAGE, pero en el tratamiento de la muestra el amortiguador de carga no contenía 2-mercaptoetanol, además las muestras no fueron incubadas a 100 °C. La electroforesis fue llevada a cabo en refrigeración, una vez terminada la corrida de electroforesis se lavaron los geles con agua desionizada, posteriormente se sumergió el gel en una solución de sustrato que contenía caseína al 2% en 0.2 M Tris-HCl, pH 7.0, durante 30 min a 4 °C, pasado este tiempo

se retiró el sustrato frío y se le agregó el sustrato a la temperatura óptima (60 °C) y se incubó por 90 min. Se retiró el sustrato y se lavó el gel con agua desionizada, posteriormente se agregó la solución de tinción y se dejó reposar toda la noche, al día siguiente destiñó el gel con agua desionizada y fue almacenado en solución conservadora. Se tomó como proteínas activas aquellas zonas del gel con decoloración visible. Para determinar el tipo de proteasas presentes en las bandas, antes de realizar la electroforesis se incubó el extracto semipurificado con diferentes inhibidores: Pepstatin A (1 mg/mL), inhibidores de Tripsina de soya (SBTI 1 mg/mL), tosil fenilalanil clorometilcetona (TPCK; 1.76 mg/mL), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 0.25 mg/mL) y HgCl₂ (135 mg/mL) durante una hora, para posteriormente cargar los geles y realizar el proceso como se indicó anteriormente (Bruno *et al.*, 2002; García-Carreño *et al.*, 1993).

Efecto de Inhibidores Específicos Sobre la Actividad Proteolítica

Con el fin de esclarecer el tipo de proteasas asociadas a la actividad proteolítica en el semipurificado, se incubó una muestra del extracto semipurificado en presencia de inhibidores específicos de proteasas como Pepstatin A (1 mg/mL), inhibidores de Tripsina de soya (SBTI 1 mg/mL), fenilalaninaclorometilcetona (TPCK; 1.76 mg/mL), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 0.25mg/mL) y cloruro de mercurio (HgCl₂ 135 mg/mL). Se mezcló un volumen equivalente de solución inhibidora con 10 µL del extracto semipurificado y se incubó durante 60 min a 25 °C. Después de la incubación, la actividad proteolítica restante se determinó como describe en la sección Determinación de la actividad proteolítica total, usando caseína al 1% (p/v) como sustrato (0.1 M Tris-HCl, pH 7.0). Se usaron tubos controles sin inhibidores y con los correspondientes solventes de los inhibidores. La actividad de la inhibición se estimó

como el porcentaje, considerándola como el 100% cuando el extracto fue incubado en ausencia de inhibidores (modificado de García-Carreño, 1996 y Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a).

Efecto de pH y Temperatura Óptima Sobre la Actividad Proteolítica

El efecto del pH sobre la actividad proteolítica del extracto enzimático se evaluó a diferentes condiciones de pH (2.0 – 12.0). A condiciones ácidas, la proteína sustrato utilizada fue hemoglobina (1%) disuelta en amortiguador glicina-HCl 0.1 M para su evaluación a pH 2.0-3.0, disuelta en citrato-NaOH 0.1 M para evaluar los pH 4.0-6.0; las evaluaciones a pH alcalino neutro con caseína (1%) disuelta en Tris-HCl 0.1 M para los pH 7.0-9.0, y glicina-NaOH 0.1 M para los pH 9.0-12.0 incubando durante 15 min para posteriormente determinar la actividad proteolítica en condiciones estándar (sección Determinación de la actividad proteolítica total).

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática del extracto semipurificado se realizó incubándolo a pH 3 y pH 7 (los cuales presentaron mayor actividad proteolítica), en un rango de 25- 80 °C, en intervalos de 5 °C, posteriormente el ensayo de actividad se llevó a cabo en condiciones estándar (sección Determinación de la actividad proteolítica total), a la temperatura correspondiente.

El efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica se estimó considerando como el 100% el valor de la actividad enzimática más elevada detectada en cada ensayo (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a).

Efecto de pH y Temperatura en la Estabilidad del Extracto Enzimático

El efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteolítica del extracto enzimático semipurificado (ESP) se determinó mediante la incubación de este a diferentes pH (2.0-12.0) en la solución correspondiente durante 30 y 60 min a temperatura ambiente (25 °C).

La estabilidad térmica se determinó incubando ESP en una solución amortiguadora a pH 7.0 en un rango de 25-75 °C en intervalos de 5 °C, durante 30 y 60 min.

Posteriormente el ensayo de actividad se llevó a cabo en condiciones estándar (sección Determinación de la actividad proteolítica). El 100% de actividad proteolítica corresponde a la actividad del extracto semipurificado en condiciones estándar (a pH 3.0 o pH 7.0 a 25 °C, durante 15 min) sin previa incubación a las diferentes condiciones de ensayo (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a).

Efecto de Iones Metálicos en la Actividad Proteolítica

Con el fin de conocer el efecto de la presencia de diferentes iones metálicos en la actividad proteolítica, se evaluaron KCl (cloruro de potasio), CaCl₂ (cloruro de calcio), MgCl₂ (cloruro de magnesio), CuSO₄ (sulfato de cobre) y FeSO₄ (sulfato de hierro), a 5 mM, donde se usaron 30 µL del extracto semipurificado y 70 µL del ion metálico a evaluar, incubando por una hora. Después de la incubación, la actividad proteolítica se determinó en condiciones estándar (sección Determinación de la actividad proteolítica total). Los resultados se reportan como porcentaje relativo a la actividad proteolítica observada en ausencia del ion metálico (Klomklao *et al.*, 2004).

Efecto de Sales en la Actividad Proteolítica

Se evaluó la actividad proteolítica en presencia de NaCl y CaCl₂, en concentraciones finales de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 % (p/v), usando una solución de sustrato de caseína al 1% p/v en amortiguador 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0. Después de una hora incubación, la actividad proteolítica se determinó en condiciones estándar (sección Determinación de la actividad proteolítica total). Los resultados se reportan como porcentaje relativo a la actividad proteolítica observada en ausencia de las sales (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a).

Efecto de Agentes Surfactantes y Reductores Sobre la Actividad Proteolítica

Se evaluó la estabilidad de la actividad proteolítica agregando el tensoactivo iónico dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas) a diferentes concentraciones a diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1 % p/v), el tensoactivo no iónico Tween-40 (1, 2 y 5 % v/v), y agentes reductores 2-mercaptoetanol (5, 10 y 15% v/v) y ditioneitol (DTT, 5mM), incubando 20 μ L del agente con un mismo volumen de extracto semipurificado durante 60 min a 25 °C. Posteriormente se determinó la actividad proteolítica con el sustrato afín en condiciones estándar (sección Determinación de la actividad proteolítica total), reportando el resultado como porcentaje relativo a la actividad proteolítica en ausencia de agente tenso activos o reductores (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a).

Efecto de Solventes Orgánicos en la Actividad Proteolítica del Extracto

Se incubó 75 μ L ESP con 25 μ L de 10, 20, 40 y 80 % (v/v) de distintos solventes orgánicos polares (metanol, etanol, 2-propanol y acetona) a 25 °C, durante 60 min, posteriormente se realizó el ensayo de actividad proteolítica total con el sustrato correspondiente (caseína 1% p/v con solución amortiguadora 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0). Los resultados se reportaron como porcentaje relativo a la actividad proteolítica observada en ausencia de los solventes orgánicos (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a).

Análisis Proximal de Lactosuero

Liofilización de lactosuero

Con el fin de conocer el rendimiento del lactosuero se pesó el lactosuero líquido, el cual posteriormente fue liofilizado y se tomó el peso seco, se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{\text{Peso seco (gr)}}{\text{Peso líquido (gr)}} \right) \times 100 \% \quad \text{Ecuación (2)}$$

Proteína Total

El contenido de proteínas totales se realizó mediante el método Micro Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), el cual consistió en pesar 0.05 g de muestra seca en papel Weighing, el cual se introdujo en un matríz Kjeldahl, al cual se le agregó 1.5 g de K_2SO_4 , 0.05 g de $CuSO_4$ y 3 mL de H_2SO_4 concentrado. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a calentamiento hasta completar la digestión de la muestra, fue incorporado H_2O destilada, hasta un volumen de 25 mL para disolver el sulfato de amonio formado. Después, una muestra de 5 mL del digerido fue agregada a un destilador micro-Kjeldahl, luego se agregó una solución de 0.1 N de $NaOH$ dentro de la cámara de ebullición, para que por arrastre de vapor se destilara el nitrógeno total presente de la muestra, el cual fue condensado sobre una solución que contenía 1.5 mL de ácido bórico al 3% e indicador Shiro-Tashiro (Rojo de metilo-azul metileno) para determinar cambios de pH. Al obtener un volumen de 40 mL de destilado, se retiró la solución condensada y se tituló con HCl 0.02 N, hasta obtener el primer vire de color en la solución.

Se usó como estándar grenetina en lugar de muestra y un blanco (sin muestra), las muestras se realizaron por triplicado. Para realizar el cálculo de porcentaje de nitrógeno, se implementó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \left[\left(\frac{(m-b) \times N_{HCl} \times 0.014007}{\text{Peso (gr)}} \right) \times 100 \right] \times 5 \quad \text{Ecuación (3)}$$

Dónde:

m= mL de HCl de la muestra

b= mL de HCl consumido por el blanco.

N HCl= Normalidad de HCl (0.02)

0.014007= miliequivalente de N

Una vez determinado el porcentaje de Nitrógeno proteico, se calculó el porcentaje de proteína usando el factor de conversión a proteína de 6.25, por lo tanto el contenido de proteína se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteína total} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25 \quad \text{Ecuación (4)}$$

Contenido de Lípidos

Para conocer el contenido de lípidos se realizó el Método de Folch *et al.*, (1957), el cual consistió en pesar 0.05 g de muestra, a la cual se agregó 2 mL de metanol, 4 mL de cloroformo, y se dejó reposar la mezcla durante 12 horas para posteriormente filtrarla con papel Whatman número 1. El filtrado se le adicionó 1.5 mL de KCl al 1.72 %, y se dejó reposar nuevamente por 12 horas. Pasado este tiempo, se desechó la porción hidrofílica (el estrato superior) con una pipeta Pasteur. Se tomaron 2 mL de la fracción hidrofóbica y se colocaron en un tubo de ensaye a peso constante, para posteriormente evaporar el cloroformo a baño María y colocar la muestra en estufa a 100 °C durante una hora para posteriormente dejar enfriar y pesar. Todas las muestras se realizaron por triplicado, usando un blanco (sin muestra). Para realizar el cálculo del contenido de lípidos, se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípidos} = \left[\left(\frac{\text{Tubo con muestra (gr)} - \text{tubo seco (gr)} - (\text{Promedio del \% lípidos control})}{\text{Peso muestra}} \right) \times 100 \right] \times 2$$

Ecuación (5)

Contenido de Humedad

Para realizar el cálculo de porcentaje de humedad, se pesaron crisoles previamente enumerados y calcinados, para posteriormente agregar 0.5 g de muestra, las cuales se colocaron en la estufa a 105 °C durante 24 horas, transcurrido este tiempo se colocaron los crisoles en un desecador, se registró el peso de los crisoles con muestra seca (AOAC, 2010). Todas las muestras se realizaron por triplicado, usando la siguiente fórmula para el cálculo del porcentaje de humedad:

$$\% \text{ humedad} = \left[\left(\frac{\text{Crisol con muestra (gr)} - \text{Crisol con muestra después de 24 horas (gr)}}{\text{Peso muestra (gr)}} \right) \times 100 \right] \quad \text{Ecuación (6)}$$

Contenido de Cenizas

Para realizar el cálculo de contenido de cenizas se determinó utilizando las muestras secas proveniente de la determinación de humedad, las cuales fueron colocadas en una mufla a 550 °C durante 5 horas, posteriormente se baja a 100 °C, durante 12 horas, pasado el tiempo se colocan los crisoles en un desecador, para dejar que las muestras estén a temperatura ambiente, posteriormente se registra el peso del crisol con las cenizas (AOAC, 2010). Para realizar el cálculo se usa la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \left[\left(\frac{\text{Crisol con ceniza (gr)} - \text{Crisol seco (gr)}}{\text{Peso muestra (gr)}} \right) \times 100 \right] \quad \text{Ecuación (7)}$$

Producción de Hidrolizados Proteínicos de Lactosuero

La hidrólisis de lactosuero fue realizada empleando un método enzimático con tres fuentes distintas de fitoproteasas comerciales: Papaína de látex de papaya (EC 3.4.22.2, Sigma

P3375), Bromelina de tallo de piña (EC 3.4.22.32, Sigma B4882) y el extracto semipurificado. Los hidrolizados de lactosuero se prepararon según la descripción de Nongonierma & FitzGerald (2013) y Lacroix & Li-Cha (2013), en la cual se usó una solución al 1 % de proteína cruda de lactosuero (p/v) añadiendo lactosuero liofilizado al lactosuero líquido para completar la cantidad de proteína requerida, siendo disuelto por agitación a 50 °C durante una hora, la cual se ajustando el pH 7.0 con NaOH 0.2 N.

La hidrólisis se inició añadiendo la enzima en una relación de 14, 963 U por g de sustrato, a una temperatura de reacción de 50° C, manteniendo a pH 7.0 constante, usando el método pH-stat, hasta llegar al 10% de grado de hidrólisis (GH) (Adler-Nissen, 1986; Mann *et al.*, 2015). El grado de hidrólisis (% GH) se definió como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos a partir del número total de enlaces peptídicos, calculado a partir del volumen y molaridad de NaOH utilizado para mantener un pH constante(O’Keeffe & FitzGerald, R. J. 2014).

Posteriormente, la reacción de hidrólisis fue inactivada calentando las muestras a 95 °C durante 10 min (Zhidong *et al.*, 2013), después los hidrolizados fueron centrifugados a 2,800x g durante 20 min a temperatura ambiente, para posteriormente ser liofilizados y almacenado a – 20 °C para su posterior análisis. El grado de hidrólisis (% GH) se calculó empleando la siguiente fórmula (Adler-Nissen, 1986):

$$\mathbf{GH\ (\%)} = V_B \times N_B \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{htot} \times 100\% \quad \text{Ecuación (8)}$$

Dónde:

V_B : representa el volumen de NaOH utilizando para mantener el pH a un valor determinado constante (7.0 para éstas enzimas).

N_B : normalidad de la base (para el presente trabajo se utilizó una concentración de 0.2 N).

$1/\alpha$: es el grado de disociación de los grupo α -amino a condiciones conocidas de pH y temperatura (para este caso, a un pH de 7.0 a 50° C, $1/\alpha=2.27$).

MP: es la masa de proteína (g) presente en la mezcla de reacción (5g de proteína cruda en un volumen de reacción total de 500 mL, para el presente trabajo).

htot: representa el número de enlaces peptídicos presentes en la fuente de proteína utilizada para la hidrólisis (meqv α -amino/g de proteína), utilizando el valor de 8.8 para la proteína de lactosuero (Adler-Nissen, 1986).

Perfil SDS-PAGE de los Hidrolizados Proteínicos

Se visualizó el perfil de bandas proteicas de los hidrolizados en un sistema de geles discontinuos, empleando un gel concentrador al 5%, y uno de resolución al 17% de poliacrilamida. Las muestras de cada HP y lactosuero crudo fueron preparadas de acuerdo a Laemmli (1970), inyectando lactosuero (lactosuero ajustado en condiciones de la hidrólisis realizada, sin presencia de enzimas); sobrenadante de lactosuero; y los hidrolizados proteínicos elaborados con el extracto semipurificado y las fitoproteasas comerciales (bromelina y papaína) en las mismas condiciones que se indican en la sección Electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (LaemmLi, 1970).

Actividad Antioxidante *In Vitro* de los Hidrolizados Proteínicos

La actividad antioxidante se evaluó a las muestras de lactosuero liofilizado; lactosuero tratado (lactosuero ajustado en condiciones de la hidrólisis realizada, sin presencia de enzimas);

y los hidrolizados proteínicos elaborados con el extracto semipurificado y las fitoproteasas comerciales (bromelina y papaína).

Potencial Antioxidante Reductora Férrica (FRAP)

La potencia antioxidante reductora férrica (FRAP), muestra la capacidad que tiene el compuesto para reducir el ion férrico (Fe^{3+}), este fue determinado por el método de Benzie & Strain (1996). Preparando las siguientes soluciones: solución amortiguadora de 300 mM acetato de sodio, pH 3.6; solución 10 mM TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) en 40 mM HCl y 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (disuelto con agua desionizada), posteriormente se preparó el reactivo FRAP, mezclando las soluciones en relación 10:1:1 (en oscuridad), respectivamente. Después de realizar el reactivo FRAP se incubó a 37 °C durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se agregó 1000 μL de reactivo FRAP con 100 μL de muestra, dejando reposar esta mezcla de reacción en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm, usando como estándar Trolox y como blanco agua destilada.

Dónde el aumento de la absorbancia de la mezcla de reacción con respecto a la concentración de muestras, indica el incremento del poder antioxidante de reducción férrica (Klomklao & Benjakul, 2018).

El FRAP se calculó restando el blanco a las muestras, siendo reportado como micromoles de Equivalentes Trolox de Actividad Antioxidante (TEAC) por miligramo de muestra utilizando una curva estándar de Trolox (0–800 μM).

Actividad de Eliminación de Radical DPPH

La actividad de eliminación de radicales DPPH se determinó según lo descrito por Al-Shamsi *et al.*, (2018) y Zheng *et al.*, (2015), en la cual se usó 100 μL de muestra de solución acuosa (a concentraciones de 1- 10 mg/mL) con 900 μL de reactivo DPPH (2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil) a 0.3 mM, diluido con etanol, fueron incubadas durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, posteriormente su absorbancia fue medida a 517 nm. La actividad será expresada en micromoles de TEAC por gramo de muestra utilizando una curva estándar de Trolox (0–80 μM). Se usó como estándar Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), el cual es un análogo de la vitamina E. La actividad de inhibición del radical DPPH se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición DPPH} = \frac{a-b}{a} \times 100\% \quad \text{Ecuación (9)}$$

Dónde:

a: absorbancia del control de DPPH.

b: Absorbancia después de incubar 30 min la muestra con el DPPH.

Reducción del Radical ABTS

La actividad de eliminación de radicales ABTS se determinó con la técnica de acuerdo con el método de Arnao, Cano & Acosta (2001) y Chen *et al.*, (2003). En la cual el radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico) se activó 16 horas antes, usando 19.2 mg de radical ABTS se disolvieron en condiciones de oscuridad en 5 mL de agua desionizada, también se preparó una solución de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (37.8 mg disuelto en 1 mL de agua desionizada en oscuridad). Posteriormente se tomaron 88 μL de la

solución de $K_2S_2O_8$ y se agregó a la solución ABTS para dejar reposar de 12-16 Hrs a temperatura ambiente en obscuridad, después de haber transcurrido el tiempo se tomó 1 mL de radical ABTS activado y se agregó 88 mL de etanol y se disolvió, protegiendo de la luz, ajustando a 0.8 la absorbancia a 734 nm.

Para el ensayo de ABTS se usaron 2.9 mL de solución de ABTS y 100 μ L de muestra los cuales fueron mezclados en una celda de 4 mL. Después de 10 min, a temperatura ambiente, la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 734 nm. Como muestra blanco, se empleó etanol a 80% y como estándar se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), el cual es análogo de la vitamina E. El porcentaje de reducción del radical ABTS se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición ABTS} = \frac{a-b}{a} \times 100\% \quad \text{Ecuación (10)}$$

Dónde:

a= la absorbancia de la solución de ABTS antes de añadir el extracto (tiempo cero).

b= la absorbancia de la solución de ABTS después de 10 minutos de adición de la muestra.

La concentración media efectiva (EC_{50}) con la cual la muestra es capaz de eliminar el 50% de los radicales de ABTS presentes en la solución de prueba, bajo las condiciones experimentales utilizadas, se determinó una vez realizada la verificación de ajuste al modelo lineal ($y=mx+b$, $r^2>0.98$) de los datos experimentales de los porcentajes de eliminación de radicales ABTS (y) por efecto de las distintas concentraciones de muestra (x). Empleando la regresión lineal, se obtuvo el valor de EC_{50} :

$$EC_{50} \text{ de eliminación de radicales ABTS} = \frac{50-b}{m} \quad \text{Ecuación (11)}$$

Dónde:

b= el valor de la ordenada al origen de la curva obtenido mediante la regresión lineal.

m= el valor de la pendiente de la ecuación de la línea recta.

Diseño Experimental

Los frutos para realizar la extracción fueron seleccionados aleatoriamente, con el fin de tener una muestra representativa de las proteasas presentes en todos los frutos.

Por cada análisis se usó un diseño aleatorio, se tomó como variable de respuesta la actividad proteolítica (%) y como factor: el nivel de purificación (EC, PE, SE, S4P y ESP para realizar la tabla de rendimiento); pH (para el análisis de pH óptimo y estabilidad); Temperatura (para el análisis de temperatura óptima y termoestabilidad); inhibidores específicos (efecto de inhibidores específicos de proteasas); iones metálicos (efecto de iones metálicos); diferentes concentraciones de sales (efecto de sales); diferentes concentraciones de surfactantes y agentes reductores (evaluación del efecto de estos); y diferentes concentraciones de solventes orgánicos (efecto de solventes orgánicos). Los cuales fueron analizados como experimentos independientes.

Por otra parte, para la caracterización de los hidrolizados proteínicos primero se usó como variable el tiempo de hidrólisis y como factor los hidrolizados realizados con diferentes fuentes enzimáticas (bromelina, papaína y ESP), mientras que para los análisis de actividad antioxidante se tomó como variable la inhibición de la actividad antioxidante en Equivalentes

Tolox de Actividad Antioxidante (TEAC) y como factores las diferentes concentraciones de lactosuero, lactosuero tratado e hidrolizado proteínico realizado con papaína, bromelina o ESP.

Cada prueba se realizó por triplicado usando una confianza de 95% y una precisión de 5%.

Análisis Estadístico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado, posteriormente se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov), homocedasticidad (Levene), para realizar un Análisis de Varianza (ANOVA, por sus siglas) de una vía, utilizando el software Statgraphics-Centurion, usando la prueba LSD de Fisher con una significancia de 0.05 para la caracterización de los extractos proteolíticos semipurificados de Aguama. Con el fin de conocer las diferencias significativas entre los hidrolizados proteínicos realizados se efectuó un Anova de una vía en la cual se usará la prueba Tukey, tomando una $p < 0.05$ (Bertucci *et al.*, 2015).

CAPÍTULO

III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Semipurificación de Fitoproteasas de Fruto de Aguama

Durante el proceso de la semipurificación, se observó que el extracto crudo (EC) empleado en el proceso de semipurificación inició con una actividad proteolítica específica de 8.55 U/mg en pH neutro, la cual se logró incrementar a 13.68 U/mg en la siguiente etapa de extracción por efecto de la solubilización de las enzimas de interés con etanol y eliminación de algunas proteínas interferentes mediante la recuperación del sobrenadante (SE), tras la precipitación con etanol se obtuvo el semipurificado (ESP) con 32.12 U/mg de actividad específica, lo cual permitió recuperar el 118% de actividad proteolítica del extracto crudo, con un factor de purificación de 3.75 (Tabla II).

Tabla II. Proceso de semipurificación de fitoproteasas de Aguama en pH neutro.

Proceso de Extracción	Actividad proteolítica Neutra-alcalina				
	Proteína soluble total (mg)	Total (U)	Específica (U/mg proteína)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
EC	78.44	671.25	8.55	100.00	1.00
PE	126.72	451.69	3.56	41.6	0.59
SE	46.44	635.48	13.68	67.29	1.14
S4E	59.75	1.98	0.03	0.30	0.00
ESP	24.78	796.09	32.12	118.60	3.75

Proceso de extracción de enzimas proteolíticas de aguama, donde se muestra el extracto de crudo (EC), precipitado de etanol (PE), sobrenadante de etanol (SE), sobrenadante de 4 volúmenes de etanol (S4E) y semipurificado (ESP).

En el proceso de semipurificación empleado para estudio, se logró un mayor factor de purificación en comparación a los reportados por otros autores como García-Magaña *et al.*, 2018, quienes reportaron para extractos semipurificados de pulpa de fruto de *B. pinguin* un factor de purificación de 2.37 y 2.5, lo cuales fueron obtenidos por precipitación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) y sometidos a ultrafiltración (tubos con filtros de 10 kDa), respectivamente. Por su parte Meza-Espinosa *et al.* (2017) reportaron un factor de purificación de 2.8 empleando

un proceso similar para recuperar las proteasas del mesocarpio del fruto de *B. pinguin*. Estos estudios reflejan la variación que presentan, por una parte, las distintas estrategias de semipurificación, así como, las variaciones que pueden existir intra-especie con factores relacionados a los estadios de madurez del fruto, las épocas de colecta, el manejo de muestra, entre otros factores, ya que en todos los casos aún no se reporta la purificación de una enzima en particular.

Perfil de Proteínas del Extracto Semipurificado

En la Figura 2 se observa que el extracto crudo (EC) (carril 2), mientras que en el extracto semipurificado (ESP) (carril 3) se observan tres que se encuentran en pesos moleculares aproximados de 20.2, 22.3 y 37.7 kDa (señaladas con flechas en la Figura 2), relacionadas a enzimas con actividad proteolítica y tres de pesos moleculares entre 5 y 8 kDa, que pueden corresponder a oligopéptidos.

Es probablemente que dos de las bandas reportadas en este estudio (20.2 y 22.3 kDa) estén relacionadas con proteasas encontradas en pulpa de fruto de *B. pinguin*, como Payrol *et al.*, (2005 b), quienes reportan una proteasa cisteínica de 20 kDa; Payrol *et al.*, (2008) también reportaron cuatro proteasas denominadas como pinguinaínas de 23-23.6 kDa, por otro lado, Moreno-Hernández *et al.*, (2017 a) reportan dos bandas de proteínas situadas entre 22-24 kDa, asociados a cisteín-proteasas, así como las reportadas por Toro-Goycon *et al.*, (1968) con un peso molecular entre 18-25 kDa.

Otras especies pertenecientes a la familia *Bromeliaceae* presentan cisteín-proteasas con pesos similares, como es el caso de la proteasa hieronymina III de (*Bromelia hieronymi*) con peso molecular 23.7 kDa (Bruno *et al.*, 2008) y una proteasa de *Bromelia balansae* con 23 kDa (Pardo *et al.*, 2000), por otra parte, se ha reportado una proteasas aspártica en *Ananas comosus*

con un peso molecular de 55.23 kDa, las cuales fueron presentes en frutos que presentaron estrés postcosecha (Raimbault *et al.*, 2013).

Con estos resultados podemos inferir que la fracción recuperada del ESP contiene preteínas en el rango de peso molecular de fitoproteasas obtenidas anteriormente en esta especie, además de otras encontradas en la familia *Bromeliacea*.

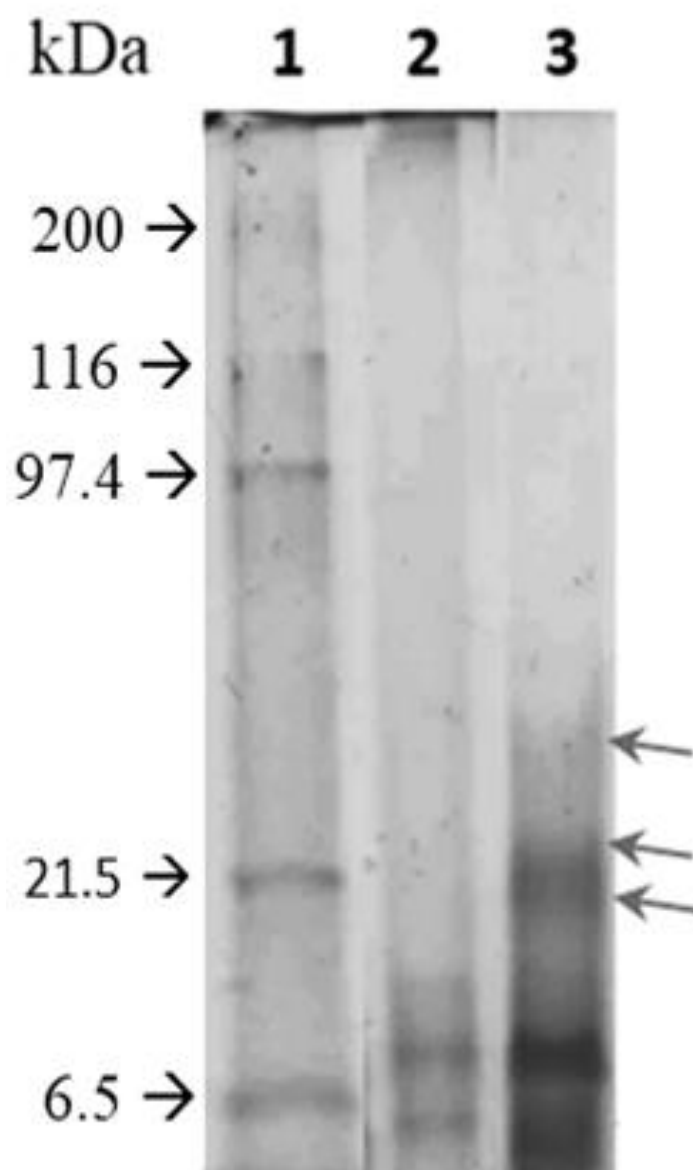


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: extracto crudo (EC), carril 3: semipurificado (ESP), señalado con flechas.

Efecto De Inhibidores Específicos en la Actividad del Extracto Enzimático

Semipurificados de Aguama

Con el fin de conocer el tipo de proteasas presentes en el extracto semipurificado de aguama, se realizaron diferentes ensayos con inhibidores específicos (Figura 3), donde se destacó una mayor inhibición, en presencia de TPCK (92 %), compuesto inhibidor de serín-proteasas (Praxedes-Garcia *et al.*, 2012), por lo que, indica la posible presencia de proteasas con mecanismos similares a las quimotripsinas en el extracto semipurificado, además se ha reportado su capacidad para inhibir fitoproteasas tipo papaína, bromelina y ficina (Shaw, 1967). El cloruro de mercurio (HgCl_2) inhibió un 95 % la actividad enzimática del extracto semipurificado, debido a que metales pesados como el mercurio son capaces de unirse a los grupos sulfhidrilo (-SH) del sitio activo característico de las cisteín-proteasas, y por tanto inhiben su actividad, la inhibición observada en este estudio indica la presencia de este tipo de enzimas en el semipurificado, lo cual ha sido observado también en semipurificados de *B. pinguin* en ejemplares de Cuba (Payrol *et al.*, 2008). Mientras que en presencia de Pepstatin A, un inhibidor específico de aspártico-proteasas, la actividad proteolítica se redujo un 44%, evidenciando que proteasas aspárticas contribuyen a la actividad del extracto semipurificado de aguama, cabe señalar que esta actividad resulta poco común en la familia *Bromeliaceae*, aunque ha sido reportada en la piña (*Ananas comosus*), asociada como una respuesta al estrés postcosecha (Raimbault *et al.*, 2013), considerando que la planta *B. pinguin* y el desarrollo de sus frutos, están sometidos al estrés ambiental y de manejo (ya que es un cultivo silvestre, y no es explotado actualmente), pudiera ser que a diferencia de cultivos bien establecidos, la aguama, exhiba actividad del tipo aspártico-proteasas como consecuencia de las condiciones en que se desarrolló. Por otra parte, el extracto semipurificado no mostró la presencia de actividad tipo

tripsina o de metaloenzimas, ya que no fue inhibido por SBTI y EDTA (Kumari, Sharma & Jagannadham, 2012).

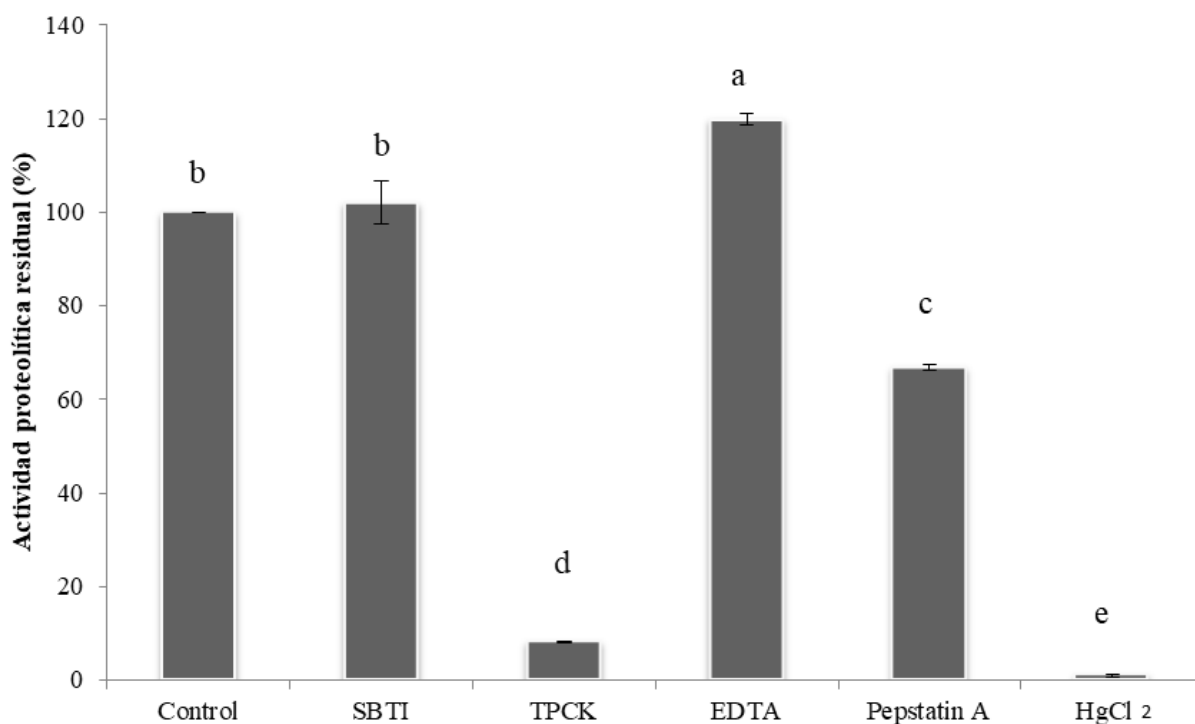


Figura 3. Efecto de inhibidores específico de proteasas en extractos semipurificados de aguama. Se evaluó la actividad proteolítica después de una hora de incubación con el inhibidor, usando sustrato caseína.

Las literales indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Análisis de Inhibición de la Actividad Proteolítica por Zimografía

Con la finalidad de complementar la influencia de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica del extracto semipurificado de aguama, se realizó el ensayo en geles de poliacrilamida, para conocer las bandas proteicas asociadas a las bandas proteicas correspondientes. En la Figura 4 se muestra el perfil electroforético en condiciones no desnaturalizantes, en la cual se puede observar en el extracto crudo (carril 2) más bandas, de mayor peso molecular, respecto al extracto semipurificado (carril 3), el cual presentó una banda de peso similar al de la papaína de latex (carril 4) y una de mayor peso. Además, la Figura 5

muestra la actividad proteolítica y el efecto de inhibidores específicos empleando geles de poliacrilamida con sustrato proteico. En los cuales se observaron dos bandas de actividad proteolítica en el extracto semipurificado (carril 2), la banda de mayor peso molecular (asociado a un peso moléculas aproximado de 37.7 kDa, fue inhibida en presencia de Pepstatin A (carril 3), inhibidor de aspártico-proteasas, misma que había sido reportada previamente para extractos crudo de aguama (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a).

Además de la banda mencionada anteriormente, se puede observar que una banda de menor peso molecular de 20.2 kDa fue inhibida ligeramente por TPCK (carril 6), el cual es un inhibidor de serín-proteasas (Praxedes *et al.*, 2012), lo cual coincide con lo observado anteriormente en extractos crudos y semipurificados de *B. pinguin* (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a; Meza-Espinoza *et al.*, 2017 b).

Dos bandas activas del extracto semipurificado (Figura 5, carril 2) sufrieron una activación aparente en el zimograma, en presencia de Hg₂Cl (carril 7), siendo este efecto inconsistente, con la respuesta en el ensayo de inhibición (95 % de inhibición, Figura 3) y lo que se ha reportado para otras cisteín proteasas presentes en esta especie (Payrol *et al.*, 2008; Moreno-Hernández *et al.*, 2017a). Las diferencias con los resultados de este método electroforético, respecto a los ensayos de actividad proteolítica realizados en tubo, pueden deberse a la baja sensibilidad de este método debido a la alta concentración de sustrato (caseína) en el gel, ya que proteasas con baja actividad pueden digerir solo una pequeña porción de sustrato durante el tiempo de incubación, por lo tanto los sustratos no digeridos permanecen absorbidos en la matriz del gel, por lo que se tiñen, por lo tanto no se visualiza adecuadamente la actividad (Yasumitsu, 2017).

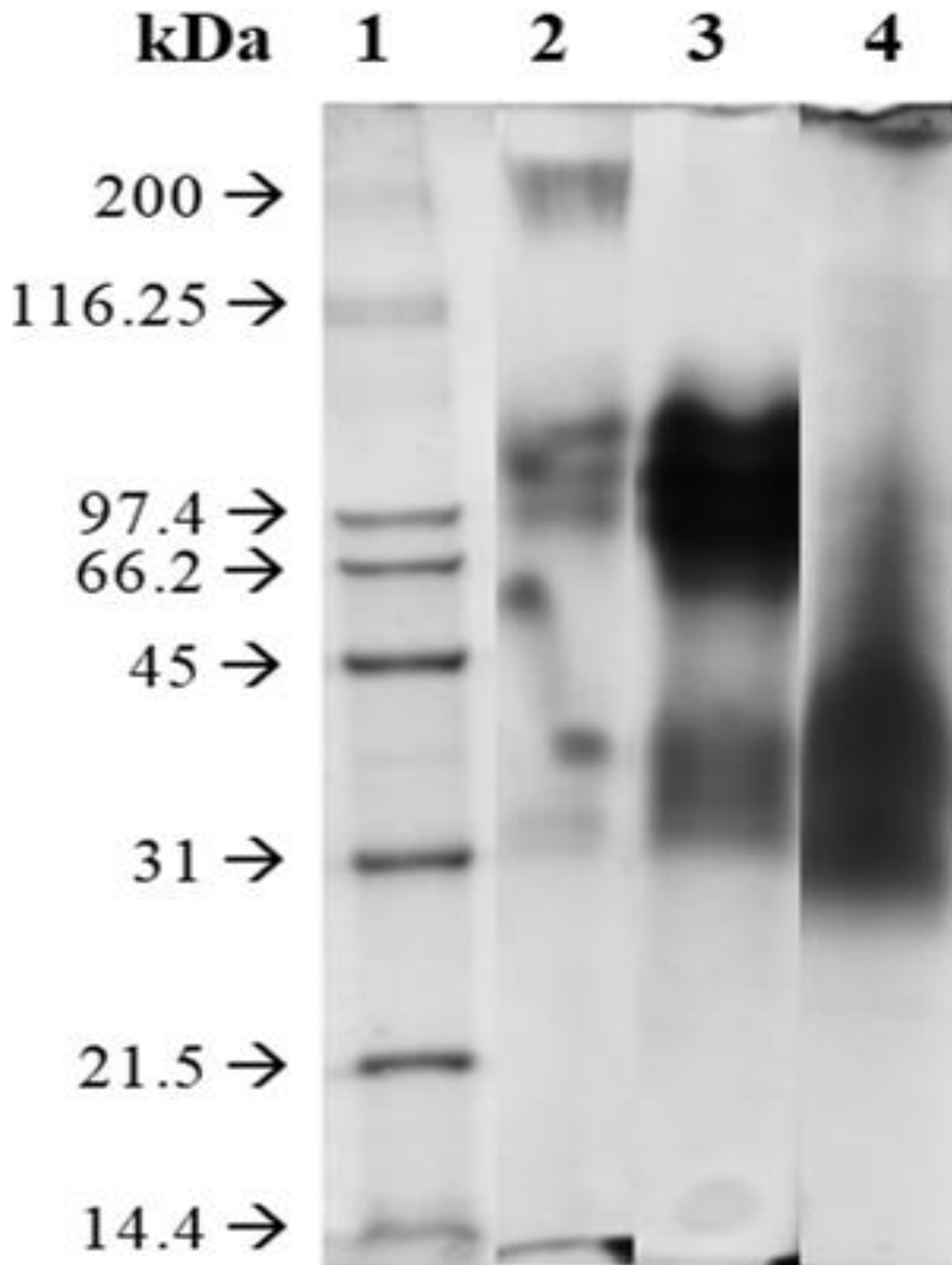


Figura 4. Gel de electroforesis en condiciones nativas. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: extracto crudo, carril 3: extracto semipurificado, carril 4: papaína.

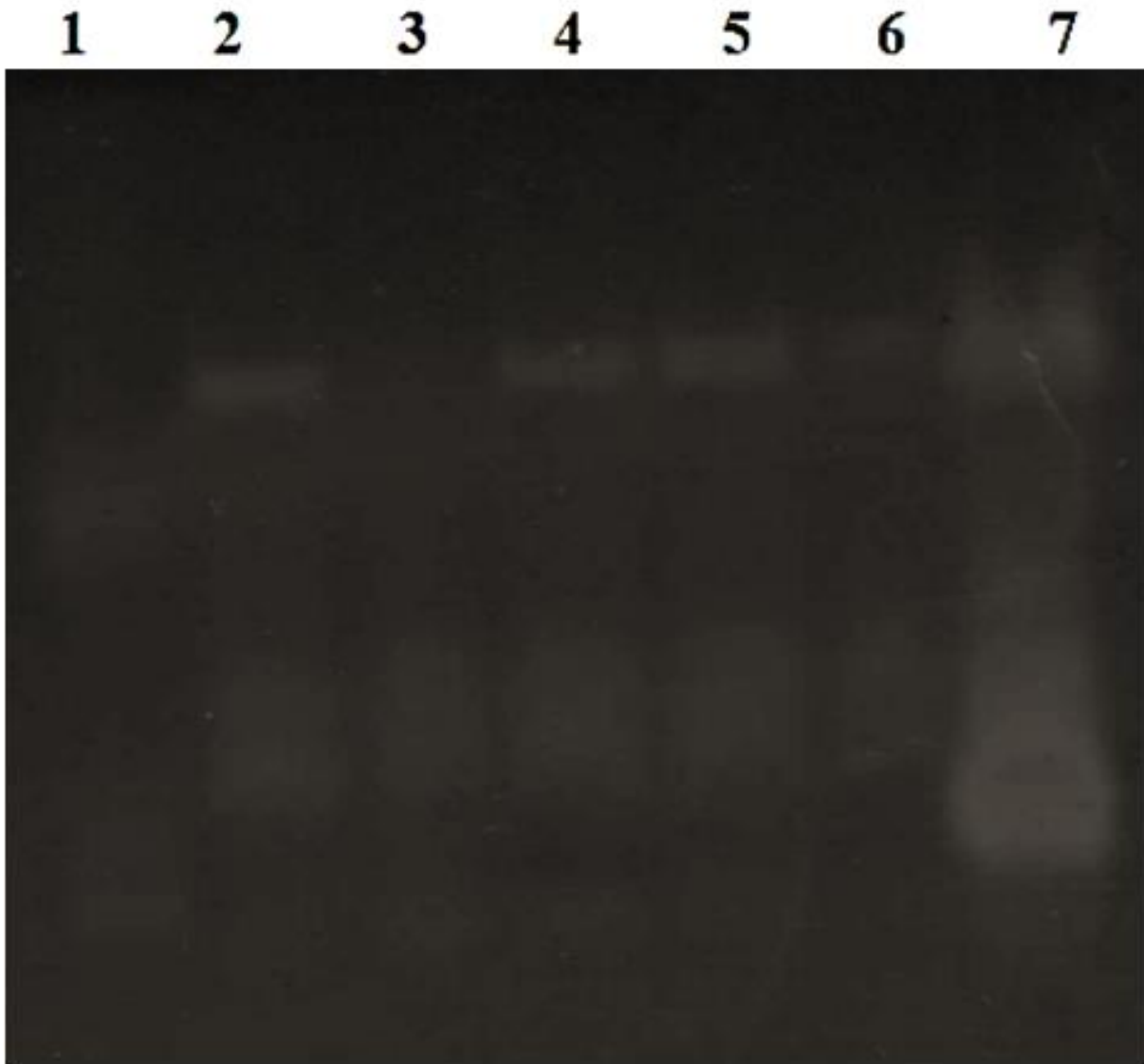


Figura 5. Zimograma de extractos enzimáticos semipurificados de aguama (ESP) en presencia de diferentes inhibidores. Carril 1: papaína, carril 2: extracto semipurificado de aguama (ESP), carril 3: ESP incubado con Pepstatin A, carril 4: ESP incubado con SBTI, carril 5: ESP incubado con de EDTA, carril 6: ESP incubado con TPCK y carril 7: ESP incubado con Hg_2Cl .

Efecto del pH Sobre la Actividad Proteolítica y Estabilidad del Extracto Semipurificado

El efecto de pH sobre la actividad proteolítica del ESP de aguama, se muestra en la Figura 6, donde se puede observar dos valores de pH óptimo de actividad, uno localizado a pH 3.0 con 43.7 U/mg (Figura 6 A) y otro a pH 7.0 con 32.77 U/mg (Figura 6 B), lo cual coincide con los estudios previos de extractos crudos provenientes de *B. pinguin* (Moreno-Hernández *et al.*, (2017 a), quienes señalaron la presencia de proteasas de tipo asparto y cisteín proteasas. Por otra parte, Payrol *et al.*, (2005 a y b) también habían reportado actividad proteolítica máxima a pH 7.0-8.5 de extractos de fruto de *B. pinguin* en colecciones de Cuba, los autores relacionaron este comportamiento a la presencia de cisteín-proteasas en mayor proporción.

Existen reportes de fitoproteasas aisladas empleando la misma técnica utilizada en nuestro estudio en otras plantas de la familia Bromeliacea, que tienen perfil de actividad respecto al pH similar a las del extracto semipurificado de *B. pinguin*; Por ejemplo, la enzima denominada Pendulifloraina, fue aislada de *Hohenbergia penduliflora*, se trata de una cisteína-proteasa cuya máxima actividad se encuentra entre pH 7.5 y 8.5 (Pérez *et al.*, 2010).

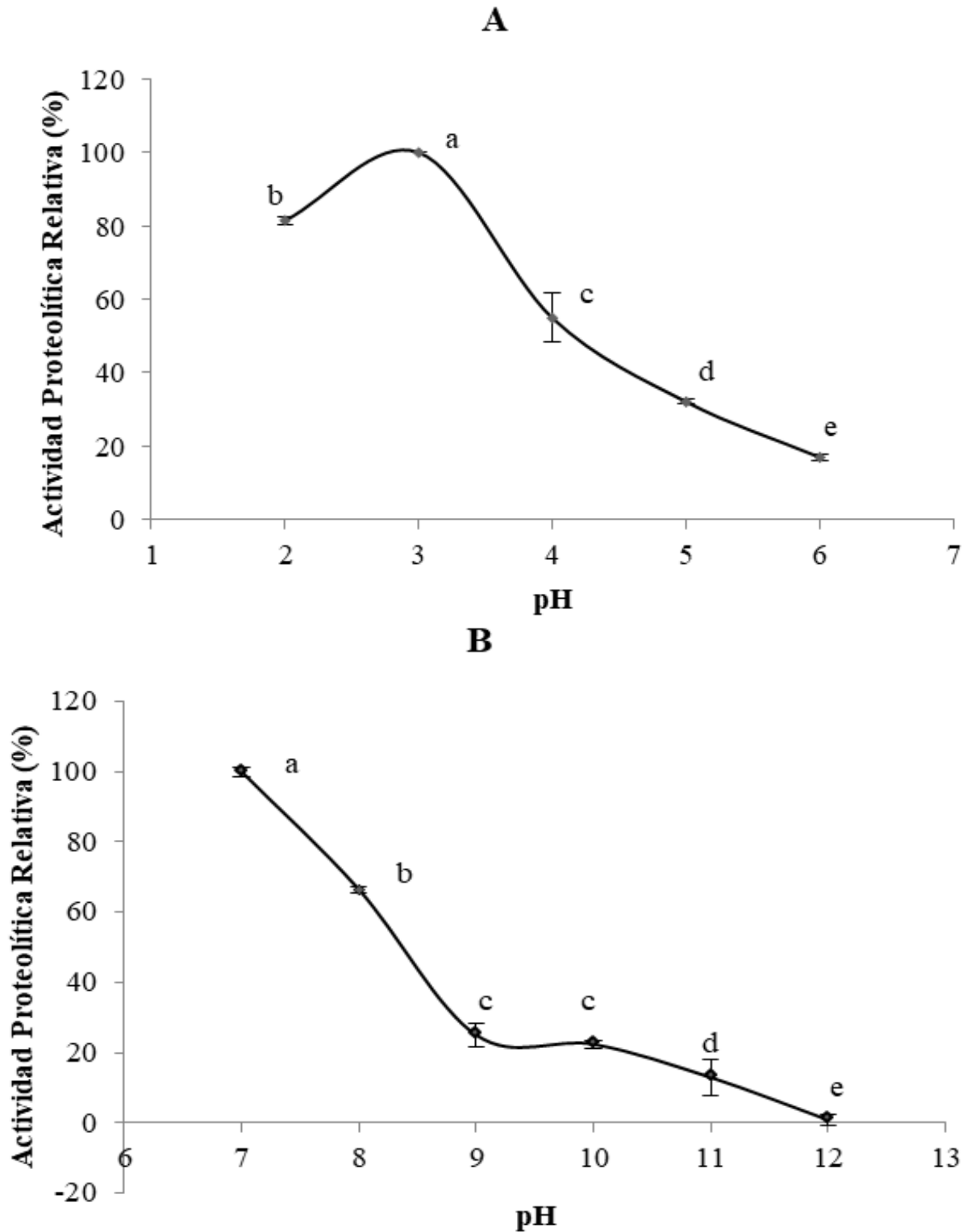


Figura 6. pH óptimo de los extractos enzimáticos semipurificados de fruto de aguama. A) Actividad proteolítica relativa a pH ácido y B) Actividad proteolítica relativa a pH neutro-alkalino. Las literales indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Respecto a la estabilidad del extracto semipurificado de aguama a diferentes pH, se puede observar en la Figura 7, que la incubación a pH 3 y 7, independientemente del tiempo, no afecta negativamente la actividad proteolítica significativamente, sin embargo, fuera de estos valores, la estabilidad disminuye significativamente, a condiciones de pH 5, 6, 11 y 12, las que ocasionaron las mayores pérdidas de actividad proteolítica tras una hora incubación.

Ha sido reportado que cisteín-proteasas presentes en frutos de la familia Bromeliacea, difieren de los encontrados en este estudio, tal es el caso de Bromelina (*Ananas comosus*) que se mantienen estables entre pH 5 y 8, y Penduliflora (*Hohenbergia penduliflora*), la cual presentó estabilidad en un rango entre pH 6 y 9 a 60 min de incubación (Benítez *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010). De igual forma lo reportado previamente para extractos crudos de *B. pinguin* por Moreno-Hernández *et al.*, (2017 a), difiere en términos de la estabilidad a través del tiempo, ya que se obtuvo una estabilidad menor posterior a 30 min de incubación a pH 2 y 7 (90 %) y una mayor pérdida de actividad a pH 3 posterior a los 60 min de incubación (40 %). Éstas mejoras en la estabilidad del extracto se atribuyen al proceso de semipurificación, los cual, en el caso del extracto semipurificado permitió el incremento en la estabilidad a su pH óptimo de actividad proteolítica tanto en condiciones ácidas (pH 3) como neutras (pH 7), la cual no se pierde al modificar el pH, posiblemente asociado al fenómeno de desnaturalización Mazorra-Manzano *et al.*, 2010).

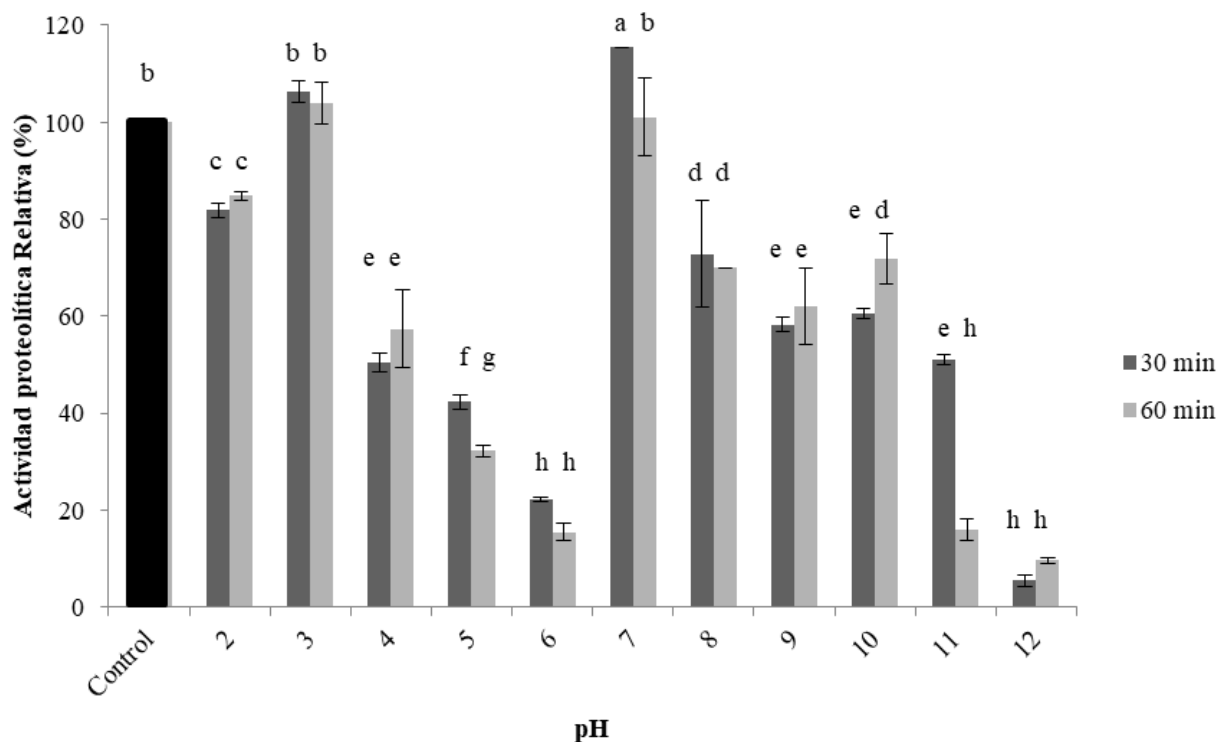


Figura 7. Estabilidad del semipurificado de fruto de Aguama (ESP) a diferentes pH durante 30 y 60 minutos de incubación. Las literales indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Efecto de la Temperatura Sobre la Actividad Proteolítica y Estabilidad del Extracto

Semipurificado

El efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto semipurificado a condiciones ácidas y neutra (por sus valores óptimos de pH 3 y 7) se muestra en la Figura 8, donde ambos presentaron una temperatura óptima de 60 °C, la cual es una temperatura mayor en comparación con lo reportado previamente para extractos crudos de *B. pinguin* que fue de 45 °C a pH 3, y decayendo a los 60 °C (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a). Éstas diferencias en la temperatura óptima de la actividad proteolítica pueden estar relacionadas con el hecho de que la actividad de una enzima es dependiente de la temperatura, por los cambios estructurales que ocurren cuando las preparaciones enzimas son sometidas a estrés térmico, donde pueden ocurrir eventos de desnaturalización proteica provocando inactivación de las enzimas (Arez, 2019).

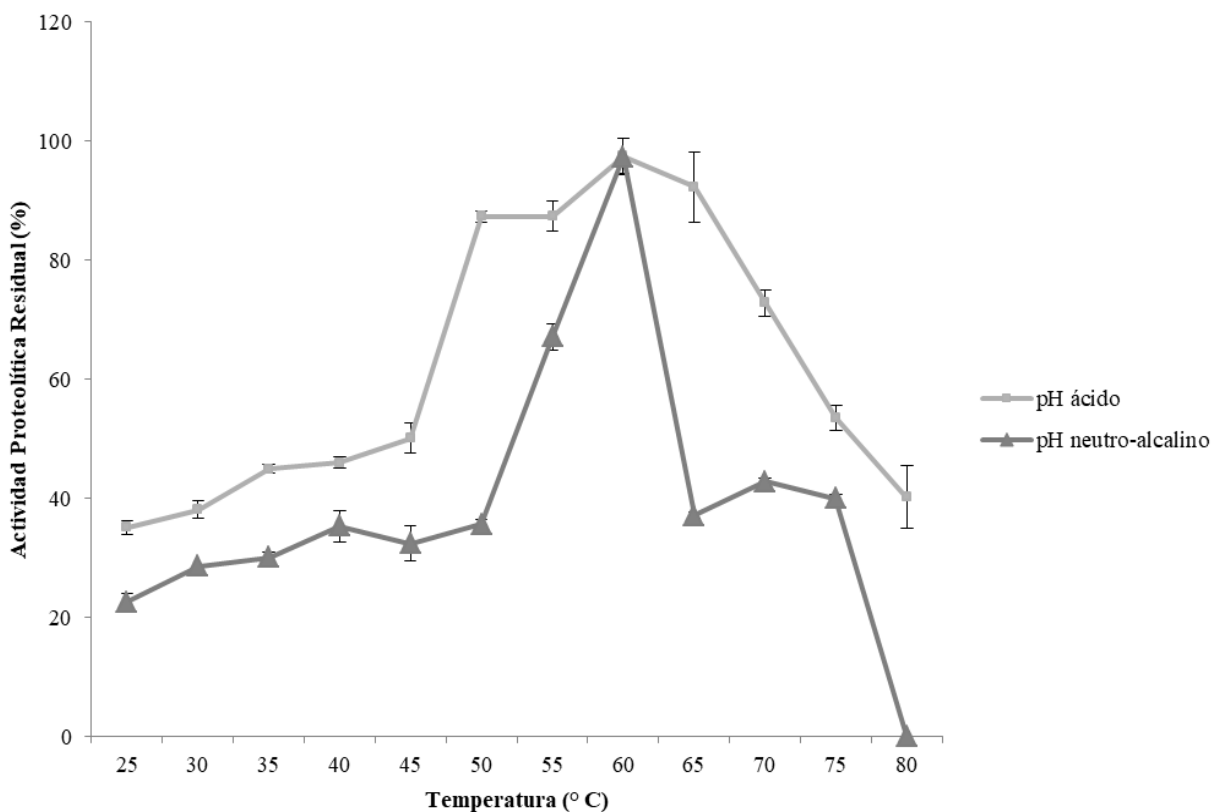


Figura 8. Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de ESP a pH 3 (ácido) y pH 7 (neutro-alkalino).

Respecto a la estabilidad a la temperatura del extracto enzimático semipurificado, la actividad proteolítica a pH ácido (pH 3) no presentó diferencias significativas respecto al control en un intervalo de 25 a 55 ° C, independientemente del tiempo de incubación, posterior a éstas temperaturas se mantuvo aproximadamente en 89 % de actividad proteolítica a los 30 min de incubación a 60 ° C y se pierde drásticamente al duplicar el tiempo de incubación, llegando a 14.3 % (Figura 9 A). La estabilidad del extracto a pH 7.0, no presentó diferencias significativas al incubar el extracto semipurificado de 25 a 60 ° C, al ser incubado a temperaturas mayores a 65° C, este perdió drásticamente actividad proteolítica (menor a 14 %) significativamente, independientemente del tiempo de incubación (Figura 9 B).

El comportamiento de nuestro extracto enzimático semipurificado, difiere de la proteasa Pendulifloraina I (extraída de la *Bromelia Hohembergia penduliflora*) que presentó menor

estabilidad, siendo en el rango de 20 a 45 °C (Pérez *et al.*, 2010). Benítez *et al.*, (2008) reportan que las cisteín-proteasas de la Bromelina (de *Ananas comosus*) presentan actividad entre 20 y 65 °C, lo cual coincide, parcialmente con nuestro estudio. En relación a trabajos realizados con *B. pinguin*, los extractos semipurificados de nuestro estudio muestran mayor termoestabilidad que extractos crudos reportados previamente, ya que a pH 3 conservaron su actividad proteolítica posterior a su incubación por 30 min en un rango de temperatura de 30 a 50 °C, pero disminuyen drásticamente su actividad si se duplica el tiempo de incubación (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a), lo que se puede atribuir al hecho de que cuando se sobrepasan éstas temperaturas, las enzimas sea desnaturizada por el efecto del calor (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013); este comportamiento puede aplicarse a procesos tecnológicos, como son las reacciones de hidrólisis de proteínas con éstas enzimas, ya que es posible detener la reacción mediante el empleo de temperaturas elevadas, tal como se hace con la papaína, la cual se inactiva a 100 °C por 10 min cuando se utiliza en los procesos de hidrólisis (Sokol *et al.*, 2008). Para efectos prácticos, la termoestabilidad, permite controlar el proceso de hidrólisis proteica necesario para la generación de péptidos bioactivos, ya que busca que la hidrólisis pueda detenerse a temperaturas poco elevadas a corto tiempo, evitando con eso, que se corra el riesgo de perder la bioactividad (Bertucci *et al.*, 2015). Asimismo, la inactivación enzimática a temperaturas suaves y tiempos cortos, permite establecer bioprocesos con un menor costo energético.

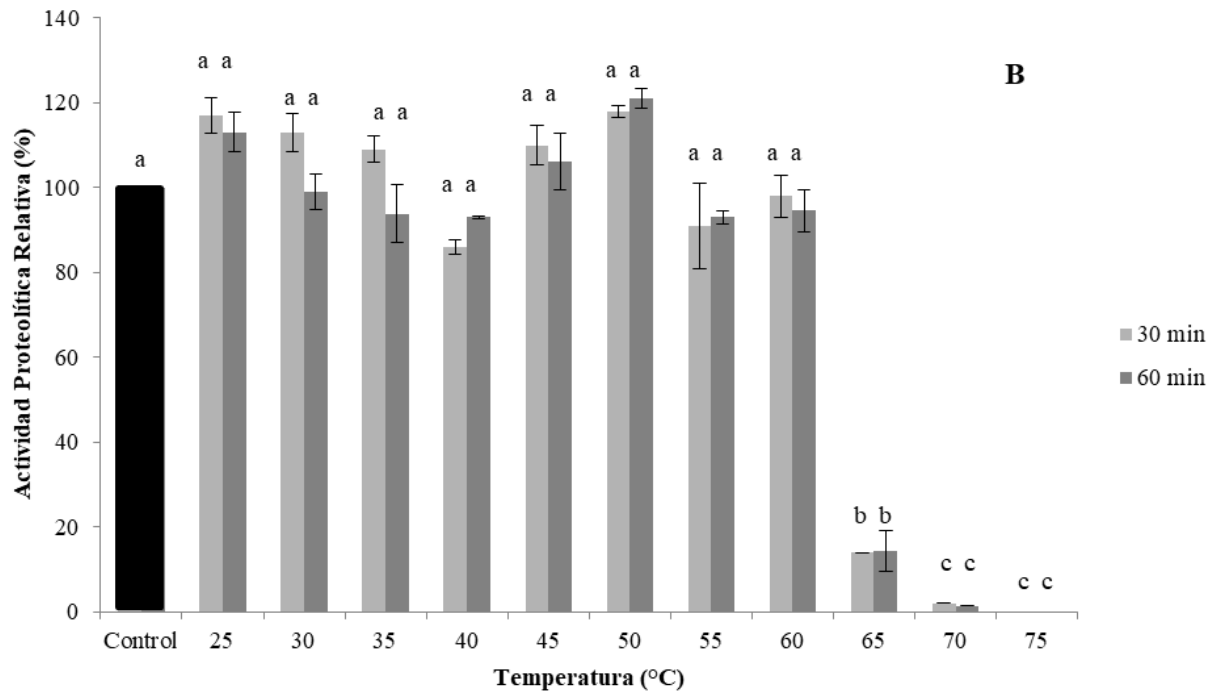
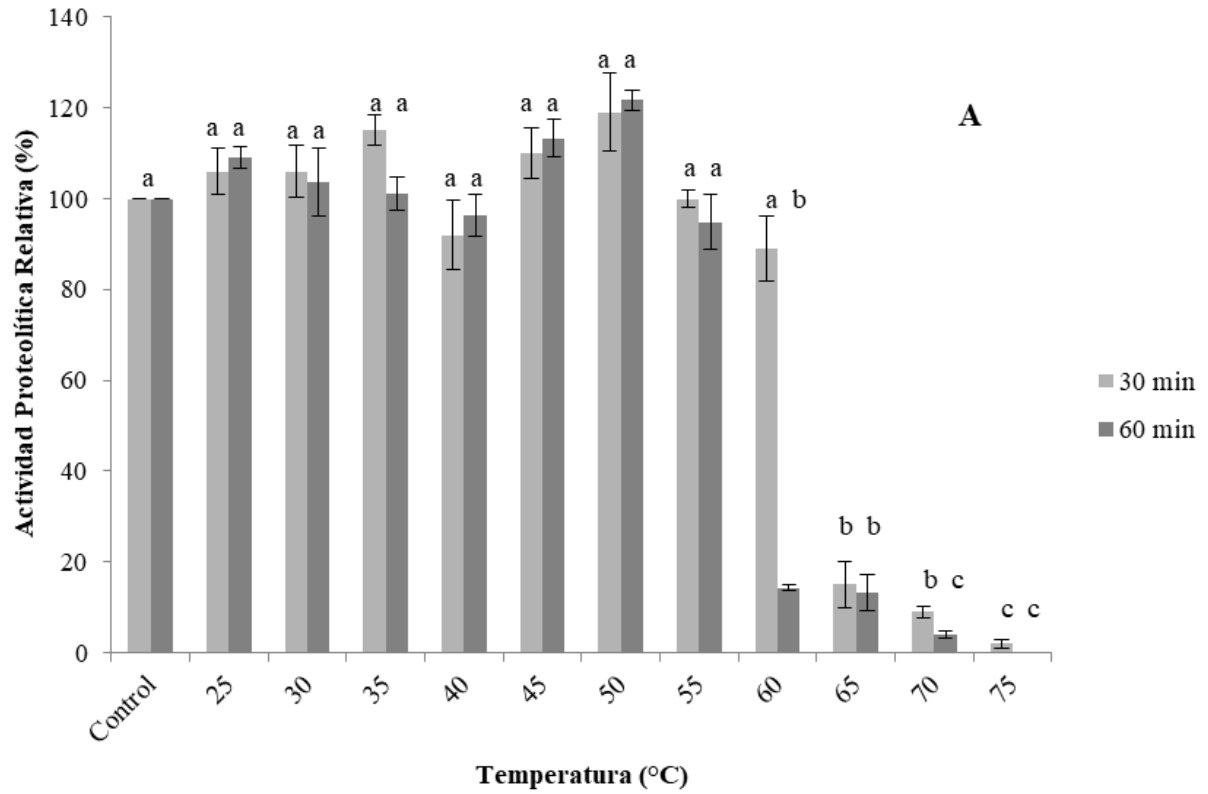


Figura 9. Termoestabilidad del extracto enzimático semipurificado de fruto de aguama. A) Actividad proteolítica relativa a pH 3 (ácido) y B) Actividad proteolítica relativa a pH 7 (neutro). Las literales indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Efecto de Iones Metálicos en la Actividad Enzimática de Proteasas Extraídas de Aguama

El efecto de los iones metálicos sobre la actividad enzimática del extracto semipurificado de aguama se puede observar en la Figura 10. La actividad proteolítica del extracto semipurificado fue afectada por la presencia de sulfato de cobre (CuSO_4) y sulfato de hierro (FeSO_4), perdiendo 96% y 91% de actividad, respectivamente. En presencia de los iones Cu^{2++} y Fe^{++} , la disminución de la actividad proteolítica puede asociarse con la afinidad de estos iones por los grupos sulfhidrilo (-SH), lo cual inactiva proteínas funcionales, debido a que el ion se une a los residuos presentes en el sitio activo de las proteasas tipo cisteína (Aranishi *et al.*, 1997; Tripathi *et al.*, 2011; Hernández-Sámano *et al.*, 2015), esto coincide con resultados reportados por otros autores, donde se encontró un comportamiento similar en presencia de estos iones para la actividad proteolítica de distintas fitoproteasas, tales como las serín-proteasas del tipo quimotripsina de *Solanum dubium* (solanum) (Mohamed-Ahmed *et al.*, (2009), así como en las proteasas de fruto de *Cucumis melo* (melón) (Kaneda *et al.*, 1975) y las proteasas alcalinas *Hylocereus polyrhizus* (pitaya) (Amid *et al.*, 2014).

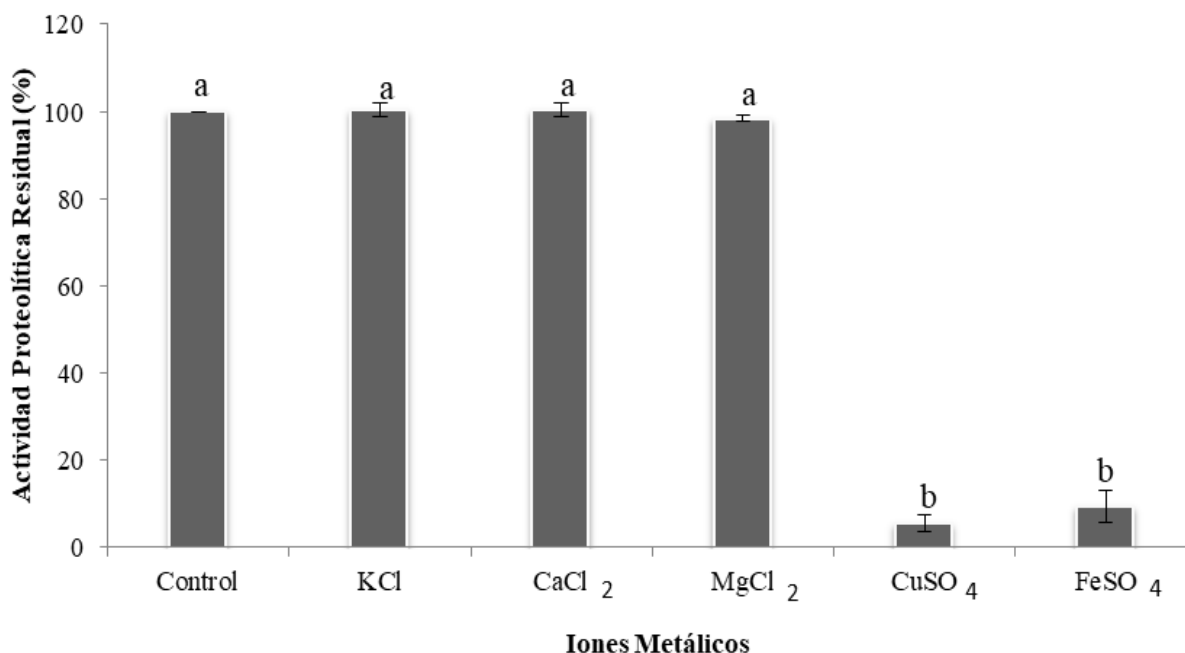


Figura 10. Efecto de iones metálicos en la actividad proteolítica de ESP. Se evaluó la actividad proteolítica del extracto semipurificado después de una hora de incubación con el ion metálico, usando sustrato caseína. Las literales indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Efecto de Sales en la Actividad Proteolítica del Extracto Semipurificado

Al evaluar la presencia de diferentes concentraciones de sales NaCl y CaCl₂, inclusive las concentraciones más elevadas (30 % p/v), no se observó un efecto ($P > 0.05$) sobre la actividad enzimática (Figura 11), por lo cual se puede deducir que la presencia de éstas sales no influye en el desempeño de la enzima durante la catálisis.

En este sentido, Mohamed-Ahmed *et al.*, (2009) reportaron un comportamiento similar ante la presencia de NaCl, para serín-proteasas similar a quimotripsina extraídas de semillas de solanum (*Solanum dubium*), cuya presencia no afectó en su actividad proteolítica. El ESP evaluado en este estudio en condiciones de pH neutro exhibió una mayor estabilidad que extractos crudos, evaluados a pH ácido de *B. pinguin* reportados por Moreno-Hernández *et al.*, (2017 a), quienes observaron que estos mantenían su actividad proteolítica hasta el 10% de

NaCl, pero al aumentar la concentración de sal al 20 %, la actividad enzimática del extracto disminuyó abruptamente.

Por su parte, la estabilidad al CaCl_2 , se ha relacionado con la presencia de cisteín-proteasas del tipo fitocalpaínas encontradas en la papaya, las cuales pueden presentar residuos catalíticos de los aminoácidos Cys, His y Asn, la cual está regulada por la unión al calcio (Hosfield *et al.*, 1999).

La elevada estabilidad del ESP de aguama ante la presencia de NaCl, indica que este tipo de extracto podría ser usado en el procesamiento de pescado y productos cárnicos durante el proceso de marinado (Le *et al.*, 2015). También, podemos deducir que este extracto semipurificado podría ser usado en el procesamiento de productos lácteos como el lactosuero, ya que este contiene sales de calcio, fósforo y cloro (Parra-Huertas, 2009).

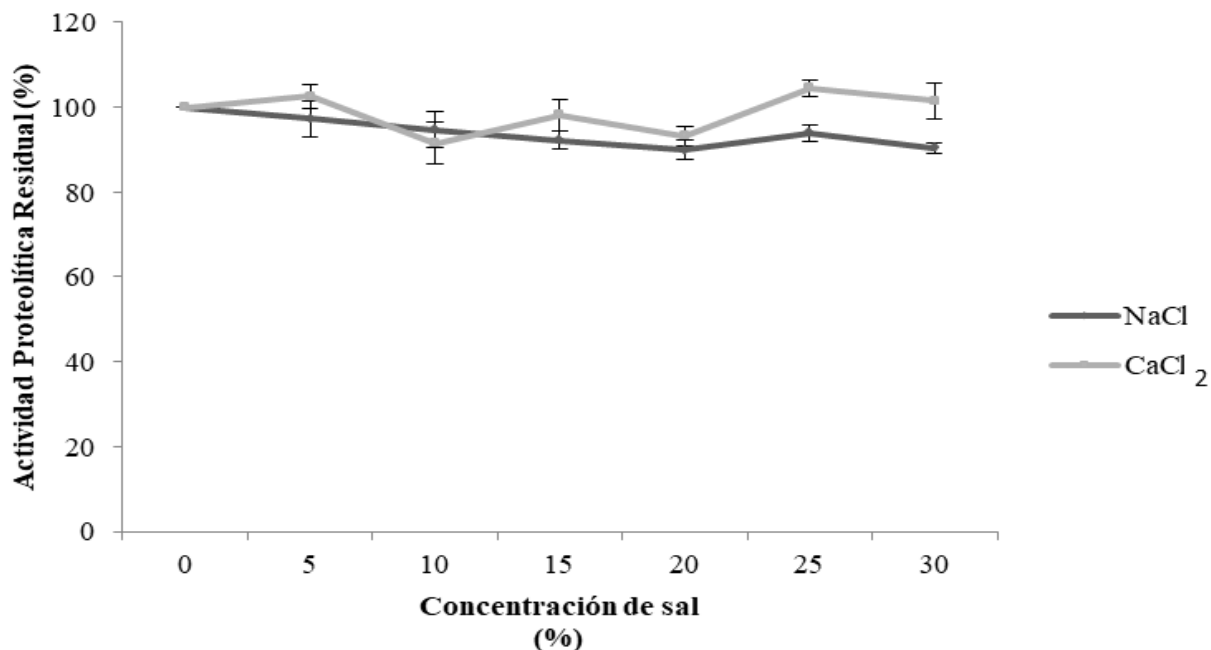


Figura 11. Efecto de la actividad proteolítica en presencia de diferentes concentraciones de sales (NaCl y CaCl_2). Se evaluó la actividad proteolítica del extracto semipurificado después de una hora de incubación con las sales, usando sustrato caseína.

Efecto de Agentes Reductores y Surfactantes Sobre la Actividad Proteolítica del Extracto Semipurificado

La actividad residual de las enzimas presentes en el extracto semipurificado en presencia de agentes surfactantes y reductores se presenta en la Tabla III, en la cual se muestra que a bajas concentraciones de surfactantes como el SDS (0.1 y 0.5 % p/v) y Tween-40 (1% v/v) no presentaron diferencias ($P < 0.05$) respecto al control, sin embargo, al incrementarse la concentración de estos reactivos, se observó una disminución en la actividad proteolítica del ESP: perdiendo 9% de actividad a concentración de SDS al 1%. Mientras que a concentraciones de 2% y 5% de Tween-40, se perdió 12% y 24% de actividad proteolítica, respectivamente. Este comportamiento difiere de lo reportado anteriormente para un extracto crudo de *B. pinguin*, evaluados a pH ácido, ya que en este estudio, se observó mayor disminución de actividad proteolítica, llegando a perderse completamente a una concentración de SDS al 1% (Moreno-Hernández *et al.*, 2017 a).

Por otra parte, se observa que en presencia de agentes reductores como el 2-mercaptoetanol y DTT, la actividad proteolítica aumentó significativamente ($p < 0.05$), respecto al control (Tabla III). Este comportamiento coincide con lo reportado por Moreno-Hernández *et al.*, (2017 a) en la actividad proteolítica de extractos crudos de *B. pinguin* evaluados en condiciones ácidas, de igual forma comportamientos similares han sido descritos para cisteín-proteasas de otras fuentes vegetales, apoyando la teoría que este tipo de enzimas son capaces de mantener los residuos de cisteína que forman parte del sitio activo en forma reducida (Payrol *et al.*, 2005 a; Kumar & Jagannadham, 2003). Este mismo efecto ha sido observado en estudios realizados con plantas de la familia *Bromeliaceae* para cisteín-proteasas en presencia de 2-mercaptoetanol y DTT (Bruno *et al.*, 2008; Theodorou *et al.*, 2007), lo cual se ha asociado a que

los residuos Ser y Cys presentes en el sitio activo de serín y cisteín-proteasas, respectivamente, actúan como nucleófilos durante el primer paso de la catálisis, uniéndose con el sustrato, para posteriormente llevar a cabo la escisión del enlace peptídico (Powers, Asgian, Ekici & James, 2002), por lo tanto un agente reductor presente en el medio de reacción, puede ceder electrones evitando que el sitio activo se inhiba, lo que puede suceder durante la extracción de proteínas por oxidación (Beynon & Bond, 2000). Por lo tanto, la estabilidad que fue observada en la actividad proteolítica del extracto semipurificado de aguama, en presencia de agentes surfactantes y reductores, hace factible a este extracto enzimático semipurificado para su potencial aplicación en la industria de detergentes y del curtido de pieles (Le *et al.*, 2015).

Tabla III. Efecto de surfactantes y agentes reductores en la actividad proteolítica de ESP.

Compuesto	Concentración	Actividad proteolítica residual (%)
Control	0	100 ^c
Surfactantes: SDS	0.1 %	98.75 ± 0.66 ^c
	0.5 %	110.45 ± 1.54 ^c
	1 %	90.99 ± 2.28 ^d
	5 %	76.44 ± 4.03 ^e
Tween-40	1 %	105.08 ± 0.55 ^c
	2 %	87.71 ± 5.07 ^d
	5 %	76.44 ± 4.03 ^e
Agentes reductores: 2-mercaptoetanol	5 %	151.66 ± 9.86 ^a
	10 %	155.73 ± 4.7 ^a
	15 %	156.78 ± 1.11 ^a
	5 Mm	120.096 ± 4.2 ^b
DTT	5 Mm	120.096 ± 4.2 ^b

Actividad proteolítica residual del extracto semipurificado después de una hora de incubación con el compuesto, usando sustrato caseína.

Literales distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Efecto de Solventes Orgánicos Sobre la Estabilidad de Extractos Enzimáticos

Semipurificados de Aguama

Se evaluó la actividad proteolítica en presencia de diferentes solventes orgánicos (Figura 12), se observa que en presencia de metanol, etanol y 2-propanol, la actividad proteolítica del ESP no se vio afectada significativamente ($P < 0.05$), sin embargo la presencia de acetona al 10 % y 80 %, disminuyó la actividad proteolítica en un 38 % y 100%, respectivamente. Nuestros resultados presentaron mayor actividad proteolítica que las cisteín-proteasas purificadas de variedades de *B. pinguin* presentaron 70% de actividad proteolítica después de haber sido precipitadas con etanol (Payrol *et al.*, 2008). Por otra parte, la presencia de solvente polares, como la acetona pueden conducir a interacciones hidrófobas dentro de la proteína, cambiando la estructura de la molécula y teniendo una modificación en la interacción entre el sitio activo de la enzima y el sustrato (Barberis *et al.*, 2006).

Debido a su estabilidad a los diferentes solventes, podemos deducir que el extracto semipurificado de aguama pueden ser también utilizado en la elaboración de cerveza y vino como es el caso de la papaína, donde se evita la agregación de proteínas con polifenoles y oligosacáridos (Benucci *et al.*, 2011; Esti *et al.*, 2013). Además, en diversos procesos industriales los solventes orgánicos son usados para incrementar la solubilidad de sustratos no polares, suprimir las reacciones secundarias dependientes de agua o para la descontaminación microbiana (Ogino & Ishikawa, 2001).

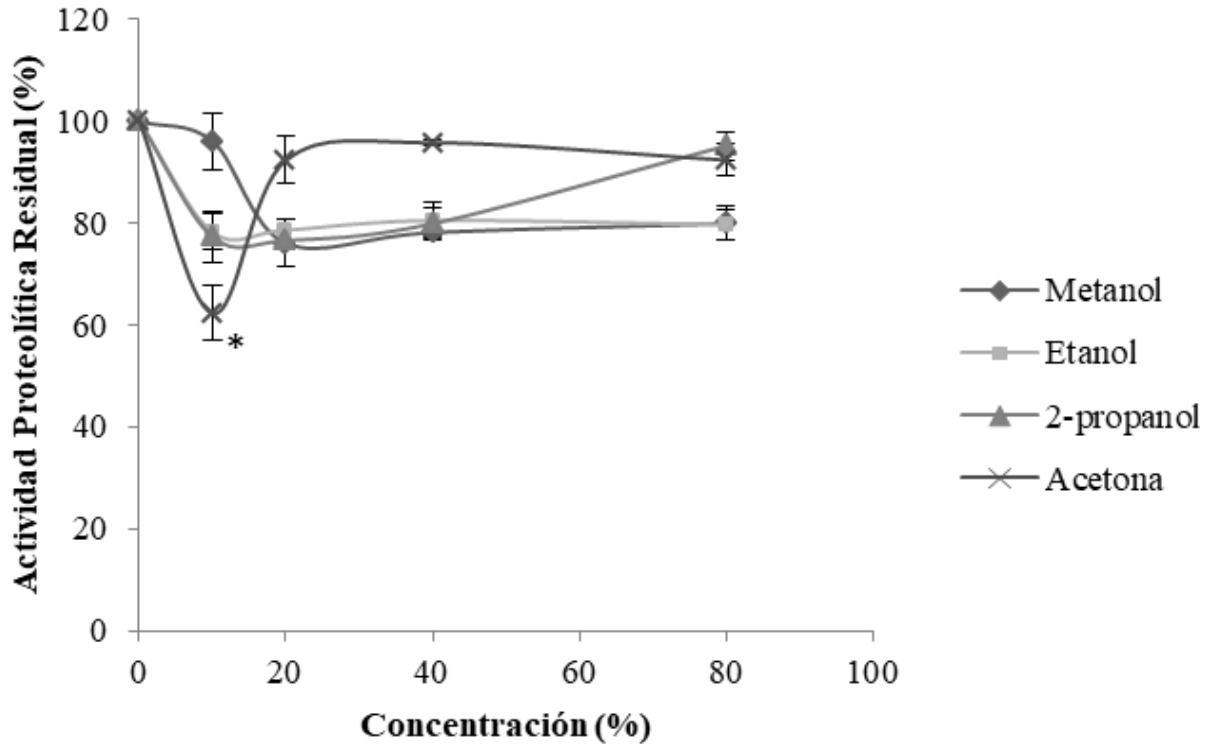


Figura 12. Efecto de diferentes solventes orgánicos en la estabilidad de la actividad proteolítica de ESP. Actividad proteolítica residual del extracto semipurificado después de una hora de incubación con el solvente, usando sustrato caseína. Las literales (*) indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Producción de Hidrolizados Proteínicos a Partir de Lactosuero con Distintas Fuentes

Enzimáticas

Caracterización Proximal de Lactosuero

Se analizó lactosuero liofilizado, al ser la materia prima para producir los hidrolizados de proteína; esta muestra presentó 12.5 % de proteína cruda (Tabla IV). En cuanto al rendimiento de lactosuero obtenido al liofilizar respecto al lactosuero fresco, fue de 5.73% (peso/peso), lo que indica un contenido de proteína cruda de 7.1 g/L, este contenido proteico en el lactosuero fresco, es similar a lo reportado por Panesar *et al.*, 2007, quienes reportan valores de proteína comprendidos entre 6 y 10 g/L, se ha reportado que la composición proteica presente en el suero lácteo, es β -lactoglobulina (LG) con un contenido cercano al 10%, 4% de α -

lactoalbúmina (Hinrichs, 2001; Aoi *et al.*, 2011), y en menor medida lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas y glicomacropéptidos (Baro *et al.*, 2001).

Tabla IV. Análisis proximal de lactosuero.

Compuesto	Concentración (%)
Proteínas totales	12.5 ± 0.26
Lípidos	13.37 ± 3.45
Humedad	3.88 ± 3.88
Cenizas	8.04 ± 0.05
Compuestos libres de nitrógeno	62.21

Obtención de Hidrolizados Proteínicos de Lactosuero

Los hidrolizados de proteína producidos con papaína, bromelina y extracto enzimático semipurificado de aguama (ESP) (Figura 13) llegaron al 10% de GH a los tiempos 412 ± 52 , 397 ± 29 y 424 ± 35 minutos, respectivamente, sin tener diferencias significativas en el tiempo al cual se llegó al 10 % de grado de hidrólisis.

La curva de hidrólisis muestra un incremento en el grado de hidrólisis en un menor tiempo después de los 350 min (Figura 13): esto se puede relacionar con el hecho de que la mayoría de las proteínas del lactosuero son globulares, lo cual dificulta el acceso a las proteasas al inicio de la reacción y posteriormente, al ser calentadas por un tiempo prolongado las proteínas se desnaturalizan y permiten un mayor acceso de las enzimas hacia el sustrato (Benítez *et al.*, 2008). En relación a lo anterior, otros autores reportan que al precalentar lactosuero y aplicar alta presión antes de hidrolizar el sustrato, se alcanza un máximo de GH en 24 h, sin tener diferencias significativas con hidrolizados obtenidos durante 12 h con pretratamiento o sin pretratamiento realizados con Tripsina, Quimotripsina y pepsina (Piccolomini *et al.*, 2012; Adjonu *et al.*, 2013).

En este estudio no se hizo un tratamiento térmico previo sobre el sustrato, debido a que el calor e hidrólisis prolongada puede ocasionar cambios estructurales en los aminoácidos del sustrato y afectar negativamente su actividad antioxidante (Pihlanto, 2006; Bertucci *et al.*, 2015).

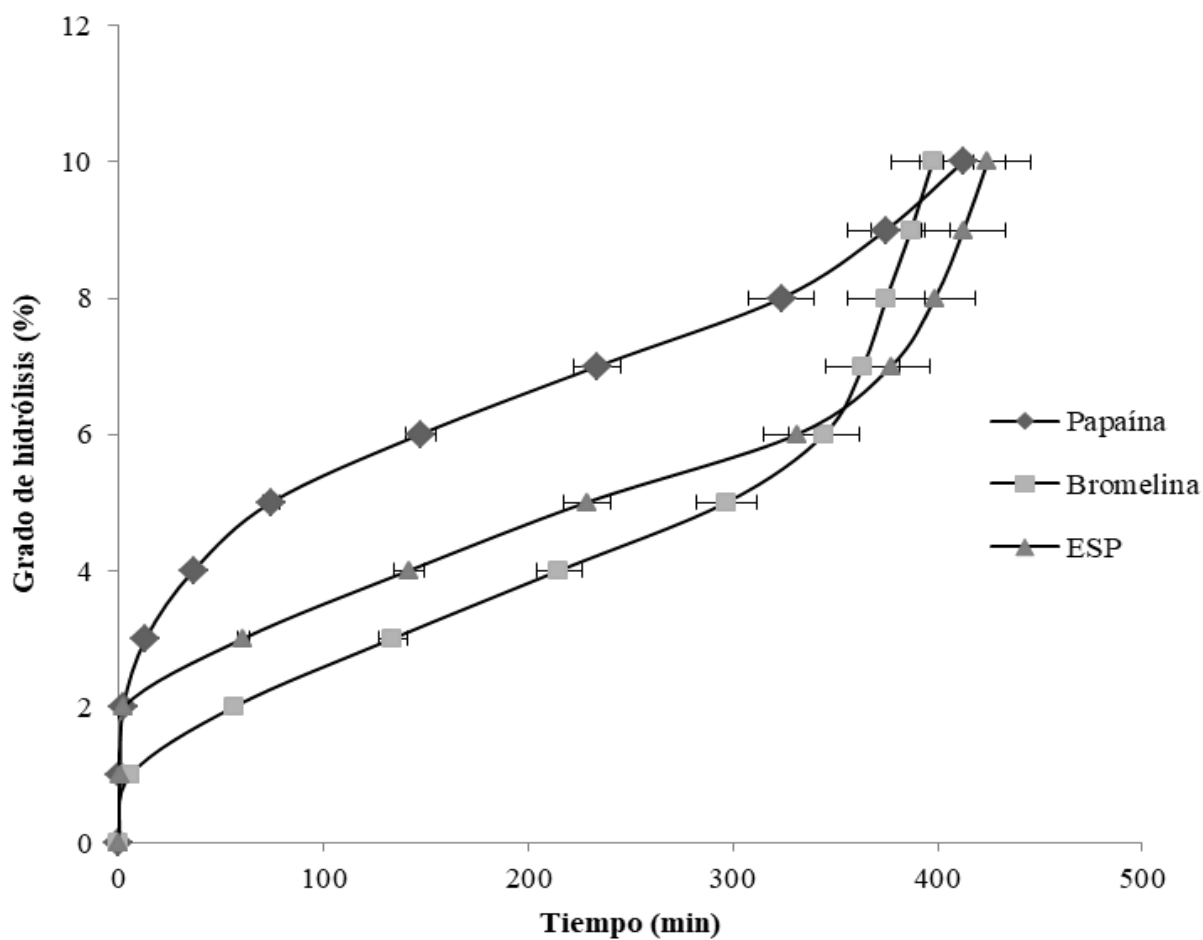


Figura 13. Monitoreo del grado de hidrólisis (GH) del lactosuero usando las enzimas Papaína, Bromelina y extracto enzimático semipurificado de aguama (ESP) (relación E/S de 1%, a un pH 7.0, a 50 °C). Las barras de error indican desviación estándar del tiempo al cual fue alcanzado el grado de hidrólisis deseado.

Se realizó electroforesis SDS-PAGE con el objetivo de visualizar la hidrólisis de proteínas del lactosuero, en la Figura 14 se puede observar las bandas correspondientes a las proteínas más abundantes en el lactosuero, como lactoferrina (70 kDa, albúmina de suero bovino

(66.2 kDa), inmunoglobulinas (50 kDa), β -Lactoglobulina (18.3 kDa), α -Lactoalbúmina (14.2 kDa) (Madureira *et al.*, 2007). El tratamiento con las diferentes proteasas influyó en el perfil proteico, encontrándose que al hidrolizar con la enzima papaína (carril 2) las proteínas de alto peso molecular sufrieron una mayor hidrólisis, correspondientes a las proteínas lactoferrina, albúmina de suero bovino (BSA), inmunoglobulinas, quimosina y caseínas, siendo degradadas a fracciones menores a 21 kDa (zonas de barrido en el gel).

Las muestras hidrolizadas con bromelina y proteasas semipurificadas de aguama (carril 3 y 4, respectivamente), no exhibieron una degradación tan extensiva de las proteínas de alto peso molecular, siendo más específicas para hidrolizar preferentemente lactoferrina y una degradación parcial de quimosina y trazas de caseínas, también, los hidrolizados realizados con bromelina fueron capaces de hidrolizar la fracción de inmunoglobulinas, mientras que en los producidos con el extracto semipurificado de aguama la fracción de albúmina de suero bovina (BSA). En estos hidrolizados, las proteínas menos susceptibles a proteólisis fueron β -lactoglobulina (β -LG) y α -lactalbumina (α -LA).

El perfil de bandas de proteína de las muestras de los diferentes hidrolizados mostró similitud con lo reportado con Mazorra-Manzano *et al.*, 2020, quienes mencionan que las proteínas de menor concentración en el suero (Lactoferrina y BSA) son más susceptibles a la proteólisis enzimática, no así la fracción β -LG y α -LA. Esto puede deberse a que las proteínas β -LG y α -LA, son proteínas globulares, en su conformación nativa los sitios de corte sean inaccesibles para las fitoproteasas, imposibilitando el ataque enzimático, en su defecto éstas fitoproteasas presentan especificidad hacia ciertos sitios de corte en la secuencia de éstas proteínas. Alternativamente es posible contemplar pretratamientos como una combinación de

presión-temperatura, cambios de pH y ultrasonido para provocar la desnaturalización de la proteína sustrato e incrementar así su grado de hidrólisis (Ambrosi *et al.*, 2016).

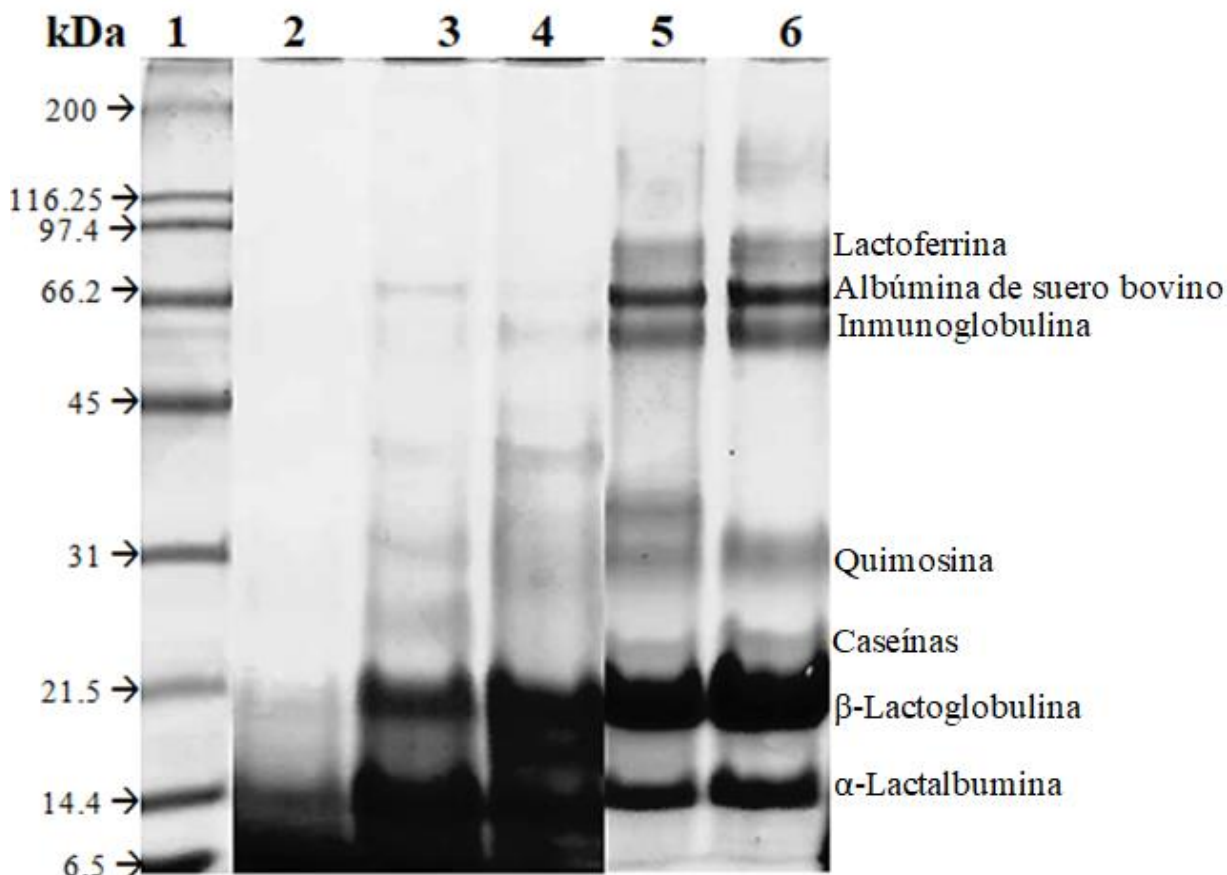


Figura 14. Perfil electroforético de lactosuero e hidrolizados proteínicos obtenidos con diferentes enzimas. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); Carril 2: Hidrolizado obtenido con papaína; Carril 3: Hidrolizado obtenido con bromelina; Carril 4: Hidrolizado producido con proteasas semipurificadas de aguama; Carril 5: Lactosuero; 6: Lactosuero tratado (fracción soluble de lactosuero sometido a centrifugación posterior a un ajuste de PH y tratamiento térmicos).

Determinación de Actividad Antioxidante de Lactosuero y sus Hidrolizados Proteínicos

Potencia Antioxidante Reductora Férrica (FRAP)

Los valores obtenidos en la técnica de FRAP indican la capacidad de un compuesto para donar un electrón a los radicales libres, inhibiendo o estabilizando dichos radicales (Klomklao *et al.*, 2013). Con el fin de determinar la potencia antioxidante reductora férrica (FRAP) que se

logró en el lactosuero sometido a un proceso de hidrólisis, se realizaron ensayos de diferentes concentraciones de lactosuero, lactosuero tratado y de hidrolizados proteínicos (HP) (Figura 15). La actividad antioxidante evaluada mediante esta técnica presentó diferencias significativas ($P<0.05$) en el lactosuero para las concentraciones más elevadas (40 y 50 mg/mL); los hidrolizados proteínicos y el lactosuero tratado no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 15).

Se observó una dependencia de la concentración en la TEAC avaluada por la técnica FRAP en todas las muestras, ya que los mayores valores se observaron en las concentraciones más altas probadas (Figura 15). Siendo independiente la concentración probada de todas las muestras, el lactosuero fue el que exhibió la mayor actividad medida por esta técnica ($P<0.05$).

Estos resultados no son consistentes con lo reportado para la hidrólisis de fuentes protéicas, ya que generalmente se ha observado que la actividad antioxidante se incrementada con este proceso; por ejemplo, una hidrólisis de proteína aislada de lactosuero con bromelina, la cual alcanzó 4.31 % de grado de hidrólisis, permitió incrementar la actividad antioxidante medida por FRAP en una concentración probada de 15 mg/mL, teniendo valores de 19 TE $\mu\text{mol/g}$ y 3.81 TE $\mu\text{mol/g}$, para el hidrolizado de bromelina y el lactosuero, respectivamente (realizada a pH 7, 50 °C por 180 min) (Corrochano *et al.*, 2018 b). Éstas diferencias, pudieran estar relacionadas con las condiciones de hidrólisis y la temperatura de inactivación de las enzimas, Mohan *et al.*, (2015) reportaron que la inactivación del proceso de hidrólisis por frío (en cama de hielo por 15 min) incrementó la actividad antioxidante del lactosuero hidrolizado con papaína en comparación con el hidrolizado inactivado con calor (95 °C por 15 min), siendo de 0.86 y 0.32 mM equivalentes de L-glutathion reducido, respectivamente, mientras que el

lactosuero sin hidrolizar incubado con calor y con frío mostró 0.2 y 0.7 mM equivalentes de L-glutación reducido, respectivamente.

La destacada actividad del lactosuero, respecto a la de los hidrolizados proteínicos, se puede deber a la presencia de lactoferrina, la cual se encontró presente en lactosuero crudo y lactosuero tratado (Figura 14), ya que se trata de una glicoproteína con elevada capacidad antioxidante; sin embargo la pérdida de la actividad antioxidante del suero tratado térmicamente (95 °C) y cuantificada por FRAP, puede asociarse con la desnaturalización de la lactoferrina (temperatura de desnaturalización 89.1 °C), perdiendo así su capacidad antioxidante, como lo han demostrado estudios de inactivación térmica de esta proteína (Franco *et al.*, 2018).

Se ha comprobado que proteínas como la lactoferrina y contenido de fosfoserina en la secuencia primari de las caseínas contribuyen a la actividad antioxidante del lactosuero crudo, sin embargo se encuentran en baja concentración (Khan *et al.*, 2019).

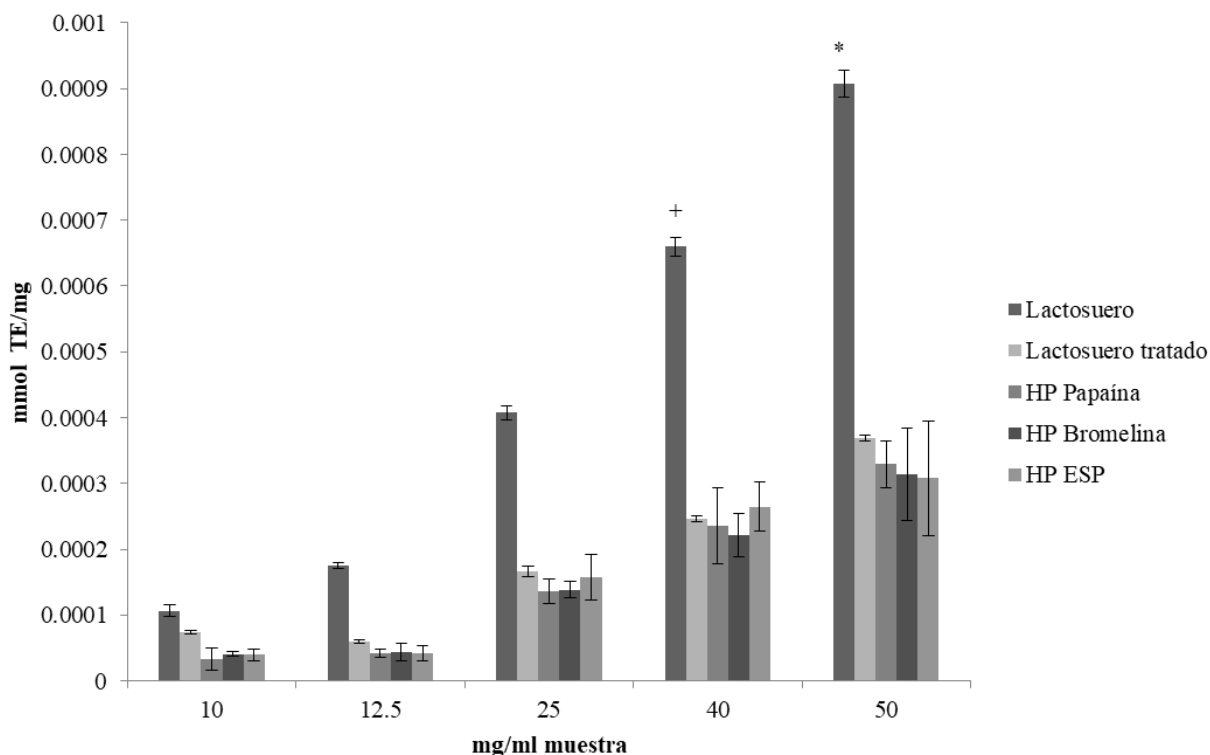


Figura 15. Actividad antioxidante FRAP en Equivalentes Trolox de Actividad Antioxidante (TEAC) en lactosero e hidrolizados proteínicos a diferentes concentraciones. Las literales (*, +) muestran las diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).

Reducción del Radical DPPH

Este ensayo determina la capacidad que poseen los componentes de una muestra para ceder iones de hidrógeno para reducir y estabilizar el radical DPPH (Guija-Poma *et al.*, 2015). En la Figura 16 se presentan los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante, medida por la reducción de radicales DPPH. Los resultados muestran que tanto el suero tratado y sin tratar, exhibieron los mayores valores de TEAC respecto a los hidrolizados proteínicos, destacando el lactosero sin tratar a 10 mg/mL ($0.046 \pm 0.004 \text{ E-}05 \text{ mmol TE/mg}$).

Esta actividad antioxidante es menor a los reportados por Rocha *et al.* (2017), quienes encontraron valores de EC_{50} de 3.3 mg/mL al evaluar fracciones proteicas $< 3 \text{ kDa}$ en hidrolizados producidos a partir de concentrado de proteína lactoserica, sometidos a hidrólisis

(5.8 % GH) en una sistema inmovilizado de proteasa aspártica semipurificadas de enzimas proteolíticas de *Salpichroa organifolia*. Difiriendo también de Zhidong *et al.*, (2013), quienes evaluaron la actividad antioxidante con el mismo radical, en péptidos menores a 5 kDa, sin evaluar el grado de hidrólisis obtenido a las 3.6 horas con papaína, reportando 31.36 % de inhibición usando 2 mg/mL de dichos péptidos.

Es necesario hacer notar, que debido al medio de reacción en el que se realiza la prueba de DPPH (utilizando solventes como etanol y metanol), la solubilidad de las proteínas del suero es limitada, existiendo además componentes en el lactosuero que pueden disminuir la sensibilidad de la técnica, por lo que se ha cuestionado la evaluación de la actividad antioxidante *in-vitro* de productos lácteos con esta técnica, dado que los compuestos antioxidantes que no son solubles en este tipo de solventes no pueden ser identificados. En este sentido, se ha mencionado que esta técnica no es eficiente para la determinación de actividad antioxidante de péptidos ya que el radical DPPH solo muestra reactividad hacia los residuos Cis y Cis-dipéptidos con el grupo –SH, presentes en las proteínas del lactosuero, por lo que muchas de las diferencias encontradas y problemas técnico asociado a la determinación de la EC₅₀, para esta prueba en los hidrolizados de lactosuero, pudieran estar asociadas a éstas causas (Zheng *et al.*, 2015). Siendo necesaria la incorporación de técnicas más adecuadas, como la eliminación de radicales ABTS.

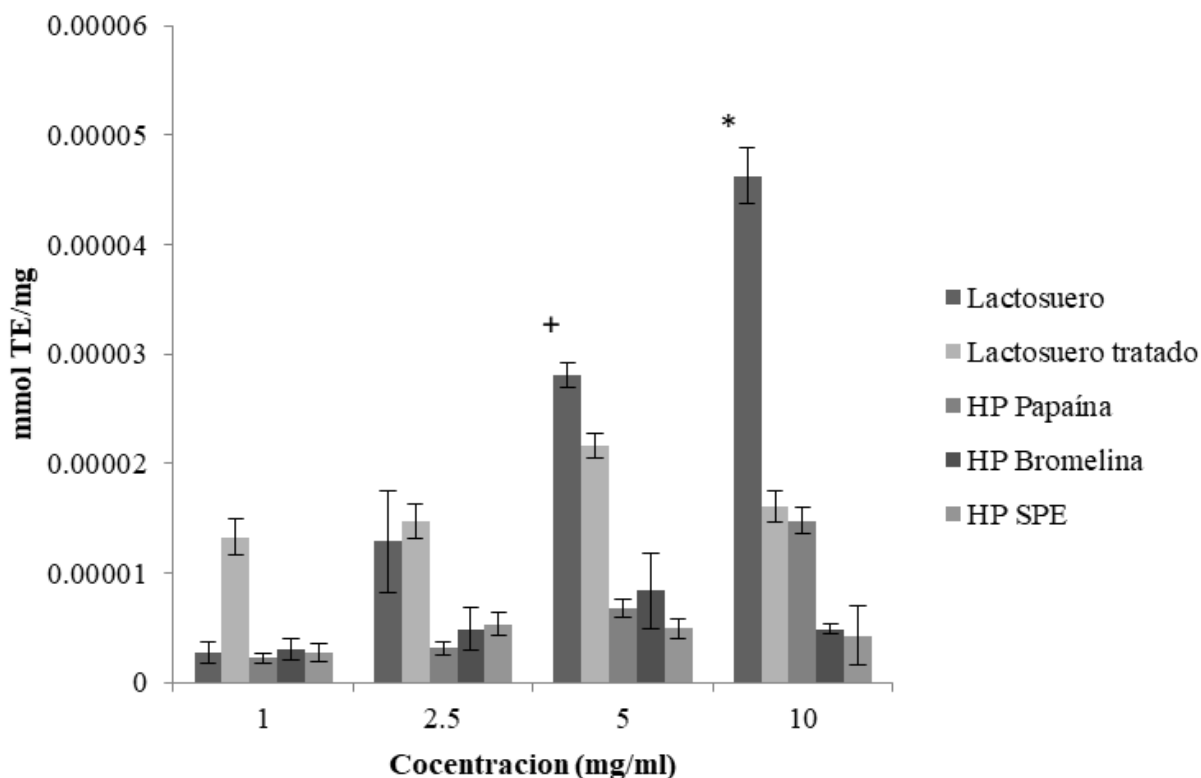


Figura 16. Actividad antioxidante DPPH en Equivalentes Trolox de Actividad Antioxidante (TEAC) en lactosiero e hidrolizados proteínicos a diferentes concentraciones. Las literales (*,+) muestran las diferencias significativas entre grupos ($P<0.05$).

Reducción del Radical ABTS

En la Figura 17, se muestra el efecto de la concentración de muestra sobre la actividad antioxidante *in-vitro*, determinada por eliminación de radicales ABTS. Se observó un incremento de la capacidad antioxidante correspondiente al aumento en la concentración de proteína. También se observó que el proceso de hidrólisis incrementa la capacidad antioxidante del lactosiero. Se observaron diferencias ($P<0.05$) entre lactosiero sin hidrolizar y aquellos hidrolizados realizados con las proteasas vegetales, los producidos empleando la proteasa papaína (83.03% de inhibición), seguidos de los realizados con bromelina y ESP (61.34 y 60.79% de inhibición, respectivamente), siendo diferentes significativamente de la actividad en el lactosiero sin tratar y al tratado (Figura 17); por lo que se infiere que el proceso de hidrólisis permite incrementar la

actividad antioxidante in vitro, lo cual no se observó en las otras técnica de determinación de actividad antioxidante.

En comparación con estudios similares, los porcentajes de eliminación de radicales de ABTS, considerando una concentración de 1 mg/mL de hidrolizados, nuestros resultados son menores a los exhibidos por muestras de hidrolizados con bromelina (18.62 %) y papaína (19.62 %), asociado posiblemente a que las condiciones de hidrólisis empleadas, las cuales difieren a las usadas en este estudio, ya que estos realizaron el proceso de hidrólisis a 50 ° C y 60 °C para la bromelina y papaína, respectivamente, usando una proporción de enzima/sustrato 1:20, durante 180 min, llegando a 9.42 % y 12.05 % de GH, respectivamente (Abadía-García *et al.*, 2016); por su parte Corrochano *et al.* (2018 b), reportaron que una concentración de 15 mg/mL de HP de bromelina con 4.31 % de GH, posee un 38.3% de eliminación de ABTS, siendo mayor al obtenido en este estudio, ya que a 20 mg/mL se obtuvo 31.1 % de inhibición del radical ABTS.

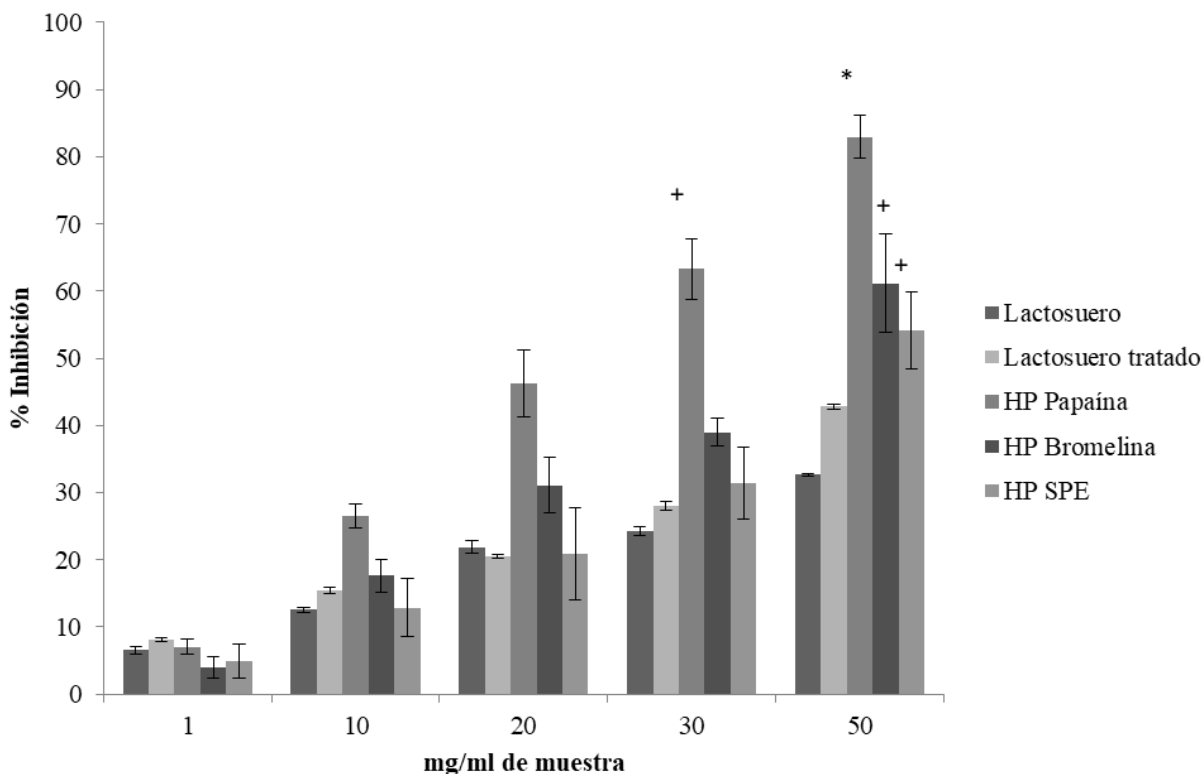


Figura 17. Inhibición de radical ABTS en lactosuero e hidrolizados proteínicos a diferentes concentraciones.

Las literales (*, +) muestran las diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).

En la Figura 18 se presentan los valores de concentración media efectiva (EC_{50}) necesaria para la eliminación del 50 % de los radicales ABTS. Se puede observar que la hidrólisis con papaína (HP papaína), exhibió el menor valor de EC_{50} de 24.43 mg/mL, por tanto, es el que posee la mayor actividad antioxidante, seguida de los HP realizados con bromelina (39.65 mg/mL) y ESP (40.66 mg/mL). Indicando que, el proceso de hidrólisis incrementa la actividad antioxidante, ya que disminuyó la concentración de muestra que es necesaria agregar en la técnica in-vitro para lograr el mismo porcentaje de eliminación de radicales (50 %), en comparación con el lactosuero tratado (fracción sobrenadante) y sin tratar ($EC_{50} = 54.94$ mg/mL y 80.5 mg/mL, respectivamente), siendo la parte soluble del lactosuero (recuperada por centrifugación y denominado lactosuero tratado).

En comparación con otro reporte, Bertucci *et al.*, 2015 observaron mayor bioactividad (EC_{50} de 4.44 ± 0.44 mg/mL Eq Trolox) en hidrolizados realizados con asparto-proteasas precipitadas con etanol de naranjo de Luisisana (*Maclura pomifera*) durante 180 min, utilizando como sustrato lactosuero descremado, el cual llegó a 31.3% de GH, usando una relación enzima: lactosuero de 1:9, a un pH de 6.5 y 45 °C.

Debido a la variación en los mecanismos empleados en la evaluación de la actividad antioxidante por métodos in-vitro en muestras que poseen mezclas de compuestos con potencial bioactivo (tal como sucede en los hidrolizados del lactosuero y otros productos lácteos), se ha reportado que una de las técnicas que presenta resultados más consistentes es la relacionada con el mecanismo de barrido o eliminación de radicales ABTS, (Sadat *et al.*, 2011) siendo el más conveniente para las fracciones producidas por hidrólisis de proteínas del lactosuero (principalmente α -LA) mediante el empleo de las fitoproteasas utilizadas en el presente estudio, ya que la inhibición del radical $ABTS^{\cdot+}$ se asocia con la presencia de Tir/Trp y radicales peroxilo (Zheng *et al.*, 2015), comúnmente reportados en este tipo de hidrolizados.

La bromelina expone el grupo tiol reactivo de los residuos de cisteína para que estén disponibles para reducir agente oxidativos como los radicales peroxilo (Corrochano *et al.*, 2018 b), en este sentido, es posible que ciertas enzimas presentes en los extractos semipurificados tengan una relación con dicha enzima.

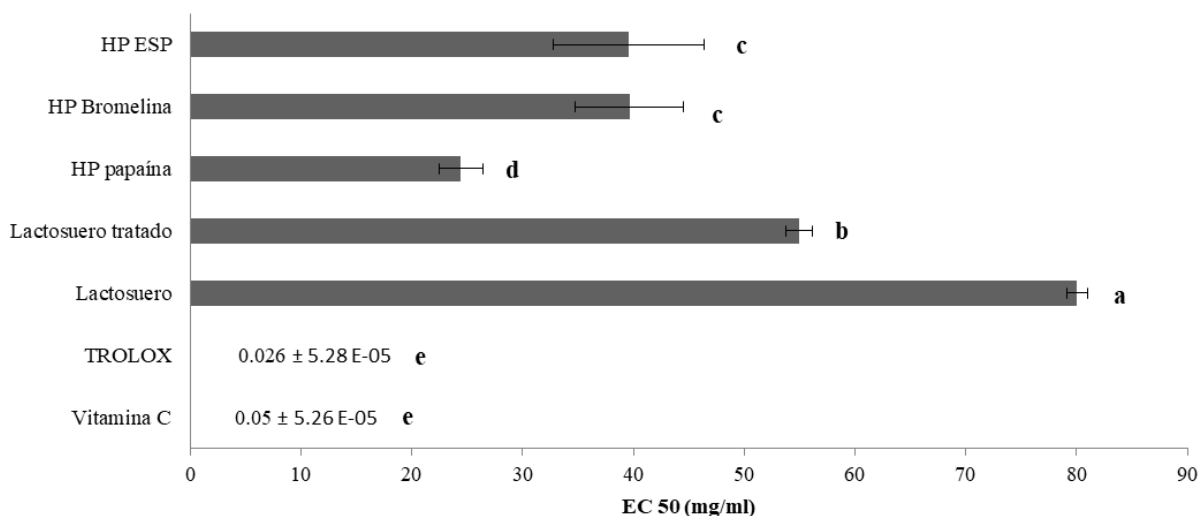


Figura 18. EC₅₀ de actividad antioxidante ABTS en lactosuero e hidrolizados proteínicos a diferentes concentraciones de muestra.

Las literales muestran las diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).

Los resultados representan el valor promedio \pm desviación estándar ($n=3$), en Equivalentes de Trolox (TE) por cada mg de muestra

¹ Lactosuero tratado: fracción soluble de lactosuero sometido a centrifugación posterior a un ajuste de PH y tratamiento térmicos

Todos los HP contienen un 10 % de Grado de Hidrólisis

Comparación de la capacidad Antioxidante por Distintas Técnicas in-vitro en Lactosuero e Hidrolizados

La importancia de evaluar mediante diferentes técnica in-vitro la capacidad antioxidante de las proteínas y péptidos obtenidos mediante un proceso de hidrólisis enzimática, radica en que los valores de actividad exhibida se asocia a diferentes mecanismos de reacción, de tal forma, que la diversidad de componentes y su interacción con los reactivos químicos y solventes utilizados en la técnica experimental, pueden arrojar resultados variables para una misma muestra y dificultar su interpretación.

Las técnicas de medición de actividad antioxidante *in-vitro* más utilizadas, emplean mecanismos de transferencia de electrones (TE), transferencia de hidrógenos (TH) o una combinación de ambos. Es así, que para la técnica de Potencial Antioxidante Reductor Férrica (FRAP), es ampliamente utilizadas para determinar si la muestra es capaz de comportarse como

un agente antioxidante al transferir un electrón al hierro presente en el reactivo con su consecuente reducción (Fe^{+3} a Fe^{+2}) (Benzie & Strain, 1996), por su parte la determinación de actividad antioxidante por eliminación o barrido de radicales DPPH, evalúa la capacidad que posee un compuesto para transferir electrones o átomos hidrógeno hacia el radical y de esta forma estabilizarlo (Prior, Wu & Schaich, 2005; Guija-Poma *et al.*, 2015); la técnica de barrido o reducción de radicales catiónicos ABTS, también incluye la neutralización de estos radicales catiónicos mediante TE y/o TH, siendo aplicable para el estudio de antioxidantes liposolubles e hidrosolubles, resultando algunas veces ventajoso en comparación con técnicas capaces de utilizar mecanismos similares con la técnica DPPH (Floegel *et al.*, 2011), la cual presenta varias desventajas por la influencia de reacciones no relacionadas al TE y TH del agente antioxidante, así como variación de resultados por el tamaño molecular asociado a la accesibilidad estérica y un rango de linealidad relativamente reducido (Prior *et al.*, 2005; Dawidowicz & Olszowy, 2011).

En el caso del lactosuero y sus hidrolizados, los valores de TEAC presentaron variaciones asociadas a las técnicas de evaluación, por lo que, en el caso de la determinación de capacidad antioxidante con FRAP y DPPH, el lactosuero mostró la mayor actividad antioxidante con diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al lactosuero tratado y los hidrolizados, siendo de 10.65 mmol TE/mg, para FRAP y DPPH, respectivamente (Tabla V). Al tratar el lactosuero térmicamente (95 °C por 10 min) y recuperar la fracción soluble por centrifugación, la actividad antioxidante se vio disminuida (7.36 y 1.3 mmol TE/mg, para FRAP y DPPH, respectivamente).

Un comportamiento diferente se observó para el TEAC medido por la técnica de ABTS, ya que en este caso, se observó un incremento de la actividad antioxidante por el tratamiento de

lactosuero y su hidrólisis, siendo los hidrolizados realizados con papaína los cuales presentaron el mayor TEAC (Tabla V).

Se ha demostrado que la técnica de eliminación de radicales ABTS es más sensible que la técnica de eliminación de radicales DPPH (Floegel *et al.*, 2011), es por ello que en este estudio se obtuvieron mayores valores de TEAC en ABTS, siendo que los HP realizados con las diferentes enzimas presentaron mayor actividad antioxidante que el lactosuero (tratado y no tratado) en las otras técnicas implementadas

Tabla V. Actividad antioxidante en Equivalentes Trolox (TEAC) medida por distintas técnicas en lactosuero e hidrolizados a una concentración de 10 mg/mL.

(mmol TE/mg)			
Muestra	FRAP	DPPH	ABTS
Lactosuero	10.65±0.87 ^a	4.62±0.25 ^a	1.83±0.09 ^b
Lactosuero tratado ¹	7.36±2.38 ^b	1.3± 0.42 ^b	2.5± 0.04 ^b
HP papa	3.3±1.71 ^c	1.45±1.19 ^b	5.18±0.37 ^a
HP Bromelina	4.07±0.35 ^c	0.52± 0.24 ^b	3.01± 0.49 ^b
HP extracto de aguama	3.93±0.9 ^c	0.52±0.24 ^b	3.06±0.89 ^b

Los resultados representan el valor promedio con E -05 ± desviación estándar (n=3), en Equivalentes de Trolox (TE) por cada mg de muestra.

¹ Lactosuero tratado: fracción soluble de lactosuero sometido a centrifugación posterior a un ajuste de pH y tratamiento térmico. Todos los hidrolizados proteínicos (HP) contienen un 10 % de Grado de Hidrólisis
Valores en la misma columna con distintas literales son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

CAPITULO

IV

CONCLUSIÓN

El protocolo utilizado para la semipurificación de fitoproteasas contenidas en mesocarpio de frutos de *Bromelia pinguin* fue eficiente para recuperar una fracción de proteasas activas con mayor estabilidad a diferentes condiciones de pH, temperaturas, solventes orgánicos, sales, surfactantes, agentes reductores que los extractos crudos, mostrando mayor factor de purificación que otros estudios realizados en especies vegetales similares, mostrando que puede ser usadas en la hidrólisis de proteínas y en procesos industriales como la formulación de detergentes; la elaboración de alimentos con altos contenidos de proteína como productos cárnicos y lácteos, o en productos en los que se requiera eliminar o modificar proteínas tales como la cerveza, vino y el cuero.

La caracterización bioquímica sugirió la presencia de proteasas tipo Serín, Cisteín y Asparto en el extracto semipurificado de fruto de Aguama podrían haber proteasas del tipo Serín, Cisteín y Asparto, de las cuales sobresalieron las del rango neutro-alcalino, por su estabilidad en un amplio rango de temperaturas (25-60 °C); por su parte la actividad en el rango ácido fue mayor en comparación con otros estudios, siendo de 25-55 °C.

Los hidrolizados proteínicos no presentaron diferencias significativas en el tiempo de hidrólisis por lo cual se puede deducir que el ESP de Aguama fue eficiente para alcanzar el mismo grado de hidrólisis comparada con las fitoproteasas comerciales.

Finalmente, se demostró mediante diferentes enfoques la capacidad antioxidante de las proteínas presentes en el lactosuero como en los hidrolizados proteínicos. En estos últimos, la proteasa más eficiente para liberar péptidos bioactivos fue la papaína, seguida de la bromelina y aguama, las cuales no presentaron diferencias para la producción de estos. Por otra parte, se observó actividad antioxidante de los hidrolizados proteínicos de ESP similar a bromelina

empleando la técnica de ABTS, la cual es conveniente para el análisis de biopéptidos, mostrando mayor eficiencia para determinar actividad antioxidante en los hidrolizados proteínicos que otras técnicas como DPPH.

Lo cual demuestra que el extracto semipurificado de aguama es eficiente para realizar hidrolizados de lactosuero, con el fin de generar péptidos con actividad antioxidante.

CAPÍTULO V

PERSPECTIVAS

Para mejorar la capacidad antioxidante de los hidrolizados generados con fitoproteasas de Aguama, es necesario realizar una optimización de dicho proceso, en el cual se contemple las unidades (U) necesarias a usar sin que se lleve a tiempos prolongados de hidrólisis. Para dicha optimización, sería conveniente utilizar la metodología de superficie de respuesta. Por otra parte, es necesario conocer las características catalíticas y de especificidad de las enzimas presentes en el extracto enzimático hacia las proteínas.

Además es importante realizar una semipurificación de las fracciones peptídicas con el propósito de identificar péptidos potencialmente antioxidantes de manera aislada, realizar una caracterización bioquímica y secuenciación de los péptidos generados, con el propósito de establecer una relación estructura-función para el potencial antioxidante, además de determinar la composición de aminoácidos de los hidrolizados generados.

También es importante conocer que otras interacciones químicas se efectuaron durante el proceso de hidrólisis, ya que el lactosuero al presentar carbohidratos, también puede ocasionar glucosilación de los péptidos presentes.

Por otra parte sería importante comparar la producción de hidrolizados generados con el EC y ESP para conocer si existen diferencias en la obtención de péptidos con actividad antioxidante y evaluar otras matrices proteínicas como proteína de soya o inclusive proteína de lactosuero aislada.

REFERENCIAS

- Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C., & Amaya-Llano, S. L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84–90. doi:10.1016/j.ifset.2016.08.010
url to share this paper: sci-hub.tw/10.1016/j.ifset.2016.08.010
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1435–1443. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.053.
- Adler-Nissen J (1986) In enzymatic hydrolysis of food proteins. *Elsevier Applied Science Publishers*, London, pp 32–35 (1971)
- Aehle, W. (2004). Industrial enzymes: Enzymes in food applications. In W. Aehle (Ed.), *Enzymes in industry: Production and applications*. Chichester: Wiley.
- Al-Shamsi, K. Mudgil, P. Mohamed, H. y Maqsood S. (2018). Camel milk protein hydrolysates with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential in in vitro and in food model system. *J. Dairy Sci.* 101:1–14. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13194>
- Ambrosi, V., Polenta, G., Gonzalez, C., Ferrari, G., & Maresca, P. (2016). High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 294–301. doi:10.1016/j.ifset.2016.05.009
- Amid, M., ABD Manap, M. Y., & Zohdi, N. K. (2014). Purification and Characterization of Alkaline-Thermostable Protease Enzyme from Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Waste: A Potential Low Cost of the Enzyme. *BioMed Research International*, 2014, 1–8. doi:10.1155/2014/259238.
- AOAC. (2010). Official Methods of Analysis. 24th. ed. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC.

- Aoi, W., Takanami, Y., Kawai, Y., Morifuji, M., Koga, J., Kanegae, M., Yoshikawa, T. (2011). Dietary whey hydrolysate with exercise alters the plasma protein profile: A comprehensive protein analysis. *Nutrition*, 27(6), 687–692. doi:10.1016/j.nut.2010.06.004
- Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K., & Ishihara, T. (1997). Purification and Characterization of Cathepsin B from Hepatopancreas of Carp *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 117(4), 579–587. doi:10.1016/s0305-0491(97)00191-0.
- Arez, R. (2019). La conducta de las plantas: *etología botánica*. 1ª edición. Fundación de Historia Natural Felix de Azara. 134 p. ISBN 978-987-3781-44-5.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244. doi:10.1016/s0308-8146(00)00324-1.
- Balakireva, A., & Zamyatnin, A. (2018). Indispensable Role of Proteases in Plant Innate Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 629. doi:10.3390/ijms19020629
- Barberis, S., Quiroga, E., Morcelle, S., Priolo, N., & Luco, J. M. (2006). Study of phytoproteases stability in aqueous-organic biphasic systems using linear free energy relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38(2), 95–103. doi:10.1016/j.molcatb.2005.11.011
- Baro, L., J. Jiménez, A. Martínez & J. Bouza. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *J. Ars. Pharmaceutica*. 42(3-4): 135-145.
- Benítez, R. Ibarz, A. Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, vol. 42, núm. 2, apr-june, 2008, pp. 227-236
- Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S. M., & Kristinsson, H. G. (2014). Fish protein hydrolysates: Production, bioactivities, and applications. In H. G. Kristinsson (Ed.), *Antioxidants and functional components in aquatic foods* (pp. 237–281). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd

- Benucci, I., Liburdi, K., Garzillo, A. M. V., & Esti, M. (2011). Bromelain from pineapple stem in alcoholic–acidic buffers for wine application. *Food Chemistry*, 124, 1349–1353.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292.
- Bertucci, J. Liggieri, C. Colombo, M. Vairo-Cavalli, S. Bruno, M. (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. 424 <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.041>.
- Beynon R, Bond JS. (2000). *Proteolytic Enzymes, Ed 2, Series Practical. Approach. Oxford University Press, Oxford*
- 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, 248–254.
- Bruno, M., Pardo, M., Caffini, N., López, L. (2002). Purification of a new endopeptidase isolated from Fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (*Bromeliaceae*). *Acta Farmaceutic Bonaerense* 21 21 (1): 51-6.
- Bruno, M., Trejo, S., Caffini, N. & López, L. (2008). Purification and Characterization of Hieronymain III. Comparison with Other Proteases Previously Isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *Springer Science Business Media*, 27, 426-433. doi:10.1007/s10930-008-9152-1.
- Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Herman-Lara, E., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2020). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) leaf as a new source to obtain protein hydrolysates: Physicochemical characterization, techno-functional properties and antioxidant capacity. *Food Hydrocolloids*, 106319. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106319

- Camacho-Hernández, I. L., Chávez-Velázquez, J. A., Uribe-Beltrán, M. J., Rios-Morgan, A., Delgado-Vargas, F. (2002). Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromelia pinguin*. *Fitoterapia*. 73 (5): pp 411-413.
- Chen, F., & Huang, G. (2019). Extraction, derivatization and antioxidant activity of bitter gourd polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 14–20. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.08.239
- Corrochano, A. Buckin, V. Kelly, P. Giblin, L. (2018 a). Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathway. *Journal of Dairy Science*. Vol. 101: 1-15. No. 6 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13618>
- Corrochano, A. R., Sariçay, Y., Arranz, E., Kelly, P. M., Buckin, V., & Giblin, L. (2018 b). Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/jds.2018-14581 url to share this paper: scihub.tw/10.3168/jds.2018-14581
- Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2011). Antioxidant properties of BHT estimated by ABTS assay in systems differing in pH or metal ion or water concentration. *European Food Research and Technology*, 232(5), 837-842.
- Di Bernardini R, Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, Am, Hayes, M. (2011) Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and byproducts. *Food Chemistry*. 124(4):1296–1307).
- Dubey, V. K., Pande, M., Singh, B. K., & Jagannadham, M. V. (2007). Papain-like proteases: applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*, 6(9), 1077–1086.
- Dullius A, Goettertb MI, Volken de Souza CF. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods—biotechnological facilitation of industrial scale-up. *J Functional Foods* 42:58–74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>.

- Esti, M., Benucci, I., Lombardelli, C., Liburdi, K., & Garzillo, A. M. V. (2013). Papain from papaya (*Carica papaya* L.) fruit and latex: preliminary characterization in alcoholic–acidic buffer for wine application. *Food and Bioproducts Processing*, 91, 595–598.
- Fanuel, L., Thamm, I., Kostanjevecki, V., Samyn, B., Joris, B., Goffin, C., Brannigan, J., Van Beeumen, J. & Frere, J.M. (1999). Two new aminopeptidases from *Ochrobactrum anthropi* active on D-alanyl-p-nitroanilide. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55, 812-818.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), FEPALE (Federación Panamericana de Lechería). (2012). Situación de la Lechería en América Latina y el Caribe en 2011. *Observatorio de la Cadena Lechera*. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. División de Producción y Sanidad animal. 2012
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), (2019). <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/239393/>. Revisado: 12/nov/2019
- Feijoo-Siota, L., & Villa, T. G. (2010). Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1066–1088. doi:10.1007/s11947-010-0431-4.
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048. doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008
- Folch, j., Lees, m., and Stanley, j. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Biological chemistry*. 226, 497.
- Franco, I., Pérez, M. D., Conesa, C., Calvo, M., & Sánchez, L. (2018). Effect of technological treatments on bovine lactoferrin: An overview. *Food Research International*, 106, 173–182. doi:10.1016/j.foodres.2017.12.016.

- Fraser CM, Rider LW, Chapple C. (2005). An expression and bioinformatics analysis of the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiology*. 138:1136–48.
- Fujinaga, M., Cherney, M., Oyama, H., Oda, K. & James, M.N. (2004) The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 101, 3364-3369.
- Gajanan PG, Elavarasan K, Shamasundar BA. (2016) Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environmental Science and Pollution Research*. 23:24901–24911
- García-Carreño, F. L., & Haard, N. F. (1993). Characterization of protease classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal Food Biochemistry*. 17, 97–113.
- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., & Haard, N. F. (1993). Sub-strate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteases or proteinaceous protease inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214, 65–69.
- García-Carreño, F.L., Navarrete-del-Toro, M.A., Diaz-López, M., Hernández-Cortés, M.P., and Ezquerro, J.M. 1996. Proteinase inhibition of fish muscle enzymes using legume seed extracts. *Journal of Food Protection*. 59: 312-318.
- García-González, F. Gutiérrez-Benicio, G. Iturriga, G. Raya-Pérez, J. Blanco-Labra, A. Ramírez-Pimentel. J. García-Gasca, T. Aguirre-Mancilla, C. (2017). Biocontrol de insectos plaga: origen de las estrategias y tendencias actuales. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México* Vol. 5, Núm. 2:1 – 10.
- García-Magaña, M., González-Borrojo, J., Montalvo-González, E., Rudiño-Piñera, E. Sáyago-Ayerdi, S. Salazar-Leyva, J. (2017). Isoelectric focusing, effect of reducing agents and inhibitors: partial

characterization of proteases extracted from *Bromelia karatas*. *Applied Biological Chemistry*.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13765-018-0380-6>

González-Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., & Oliver-Salvador, M. C. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review. *Biotechnology Advances*, 29, 983.

González, Z., & Trelles, M. (2007). Determinación de la actividad antihelmintico. Obtenido de Universidad de Cuenca- *Faculta de Ciencias Quimicas*:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/20261/1/TESIS.pdf>.

Görgüç, A., Gençdağ, E., Yılmaz, F. (2020). Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments – A review. *Food Research International*. Elsevier. Volume 136, October 2020, 109504.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109504>

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

Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M., Ponce-Pardo, J. & Zarzosa-Norabuena E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico* (Lima), [S.l.], v. 15, n. 1, p. 57-60, feb. 2015. ISSN 2227-3530.

Guo X, Zhang J, Ma Y, Tian S. (2013) Optimization of limited hydrolysis of proteins in rice residue and characterization of the functional properties of the products. *Journal of Food Processing and Preservation*. 37:245–253.

Halavach, T. M., Dudchik, N. v., Tarun, E. I., Zhygankov, V. G., Kurchenko, V. P. Romanovich, R. V., Khartitonov, V. D., Asafov, V. A. (2020). Biologically active properties of hydrolysed and fermented milk proteins. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. February-March 2020, Vol. 9. Num. 4. Pp. 714-720. DOI: 10.15414/jmbfs.2020.9.4.714-720

Hedstrom L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*. 102: 4501-4523.

- Hernández, T. R. (2015). Diagnóstico del uso de lactosuero derivado de queserías de la región Frailesca. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Agronómicas. *Universidad Autónoma de Chiapas*. Villaflores, Chiapas. México.
- Hernández-Sámamo, A.C., Guzmán-García, X., García-Barrientos, R., Ascencio-Valle, F., Sierra-Beltrán, A., Vallejo-Córdova, B., González-Córdova, A.F., Torres-Llanez, M.J., & Guerrero-Legarreta, I. (2015). Extracción y caracterización de proteasas de pepino de mar *Isostichopus fuscus* recolectado en el Golfo de California, México. *Revista mexicana de ingeniería química*. 14(1), 35-47. Recuperado en 09 de noviembre de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382015000100004&lng=es&tlng=.
- Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*. 11(4-7): 495-503.
- Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, Jia Z. (1999). Crystal structure of calpain reveals the structural basis of Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO Journal*. 18:6880–89
- James, M. (2004). Catalytic pathway of aspartic peptidases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edn (Barrett, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. eds), p.12-19, Elsevier, London.
- Kaneda, M., Eida, A. & Tominaga, N. (1975). Isolation and characterization of a proteinase from the Sarcocarp of melon fruit. *Journal Biochem*. 78, 1287–1296.
- Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., & Jaspal, M. H. (2019). Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*, 18(1). doi:10.1186/s12944-019-0969-8

- Kjeldahl, J. (1883). "Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern". Zeitschrift für Analytische Chemie, revista editada por el Dr. C. Remigius Fresenius. Año 22 , C.W. Kreidels Verlag 1883. Pág. 366-382 J.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2004). Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in Thailand. *Journal Food Biochem.* 28, 355–372. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2004.05203.x>
- Klomklao, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2013). Functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates from toothed ponyfish muscle treated with viscera extract from hybrid catfish. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1483-1489. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.12116>
- Klomklao, S. & Benjakul, S. (2018). Protein hydrolysates Preoared from the Viscera of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelmamis*): Antioxidative Activity and functional Properties. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 18 (1): 69-79.
- Kumar Dubey, V., & Jagannadham, M. (2003). Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, 62(7), 1057–1071. doi:10.1016/s0031-9422(02)00676-3
- Kumari, M., Sharma, A., & Jagannadham, M. V. (2012). Religosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry*, 131(4), 1295–1303. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.122
- Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2013). Inhibition of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV and α -Glucosidase Activities by Pepsin-Treated Whey Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(31), 7500–7506. doi:10.1021/jf401000s
- LaemmLi, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227-680- 685.

- Lafarga T, Hayes M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*. 98:227–239.
- Le, C. M., Donnay-Moreno, C., Bruzac, S., Baron, R., Nguyen, H. T., & Bergé, J. P. (2015). Proteolysis of Sardine (*Sardina pilchardus*) and Anchovy (*Stolephorus commersonii*) by Commercial Enzymes in Saline Solutions. *Food technology and biotechnology*, 53(1), 87–90. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.01.15.3893>
- Le Maux, S., S. Bouhallab, L. Giblin, A. Brodkorb, & Croguennec T. (2014). Bovine beta-lactoglobulin/fatty acid complexes: Binding, structural, and biological properties. *Dairy Science Technology*. 94:409–426. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0160-y>.
- Le Maux, S., A. B. Nongonierma, C. Barre & FitzGerald R. (2016). Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. *Food Chemistry*. 199:246–251. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.021>.
- Lee, J., Yoo, M., Koo, S., Baek, H. & Lee, H. (2008). Antioxidant and ACE inhibitory activities of soybean hydrolysates: effect of enzyme and degree of hydrolysis. *Food Science Biotechnology* 17:873–877.
- Madureira, A. R., C. I. Pereira, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado, and F. X. Malcata. (2007). Bovine whey proteins – overview on their main biological properties. *Food Research International*. 40:1197–1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>.
- Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., Athira. (2015). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*. 52, 3235–3241 (2015). <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3>
- Mares-Mares, E. Barboza-Corona, J. Sosa-Morales, M. Gutiérrez-Chávez, A. Gutiérrez-Vargas, S & León-Galván M. (2019). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV by enzymatic hydrolysates

derived from primary and secondary whey of fresh and Oaxaca cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. Vol 70. doi: 10.1111/1471-0307.12623

Mazorra-Manzano, M. A. Tanaka, T. Dee, D. R. & Yada, R.Y. (2010). Structure–function characterization of the recombinant aspartic proteinase A1 from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 71, 515–523.

Mazorra-Manzano, M. Moreno-Hernández, J. M. Ramírez-Suarez, J. C. Torres-Llanez, M. González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2013). Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: a new vegetable source of milk-clotting proteases. 2013 b. *LWT- Journal of Food Science and Technology*. 54, 325-330.

Mazorra-Manzano, M. & Moreno-Hernández, J. (2019). Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal. *CienciaUAT*, vol. 14, núm. 1. DOI: 10.29059/cienciauat.v14i1.1134.

Mazorra-Manzano, M. A., Robles-Porchas, G. R., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Martínez-Porchas, M., García-Sifuentes, C. O. & Vallejo-Córdova, B. (2020). Cheese Whey Fermentation by Its Native Microbiota: Proteolysis and Bioactive Peptides Release with ACE-Inhibitory Activity. *Fermentation*, 6(1), 19. doi:10.3390/fermentation6010019. Tomado de sci-hub.tw/10.3390/fermentation6010019

Memarpoor-Yazdi M, Asoodeh A, Chamania J (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4:278–286

Meza-Espinoza, L., García-Magaña¹, M., Vivar-Vera, M., Sáyago-Ayerdi¹, M., Chacón-López, A., Becerra-Verdín, E., Dolores Muy-Rangel, D. y Montalvo-González, E. (2017 a). Aspectos etnobotánicos, nutricionales y actividad biológica de extractos de frutos del género *Bromelia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 40, núm. 4, october-december, 2017, pp. 425-437.

- Meza-Espinoza, L., Vivar-Vera, M., García-Magaña, M. Sayago-Ayerdi, S. Chacoón-Loópez, A., Becerrea-Verdín, C., Montalvo-González, E. Mondragón, D. y G. I. Cruz-Ruiz. (2017 b). Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from *Bromelia karatas* fruit and compared with *Bromelia pinguin* proteases. *Food Science Biotechnology*. 27: 509. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0244-62007>.
- Miranda, O.; Ponce, I.; Fonseca, P.; Cutiño, M. y Díaz, R. (2009). Suero de queso un producto animal nutritivo. *Revista Cubana de Producción Animal*. 3(19).
- Mohamed-Ahmed, I. Morishima, I. Bebiker, E. Mori, N. (2009). Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. *Phytochemistry*: Volume 70, Issue 4, March 2009, Pages 483-491
- Mohan, A., M. C. Udechukwu, S. R. C. K. Rajendran, & C. C. Udenigwe. (2015). Modification of peptide functionality during enzymatic hydrolysis of whey proteins. *RSC Advances* 5:97400–97407. <https://doi.org/10.1039/c5ra15140f>.
- Mondragón-Chaparro, D., Ramírez, I., Flores, M., García, J. (2011). La familia Bromeliaceae en México. *Universidad Autónoma de Chapingo*. ISBN: 978-607-12-0200-0.
- Moreno-Hernández, J., Hernández-Mancillas, X., Coss, E., Mazorra-Manzano, M., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V., Salazar-Leyva, J. (2017 a). Partial Characterization of the proteolytic Properties of an Enzymatic Extract From “Aguama” *Bromelia pinguin* L. Fruit Grown in México. *Applied Biochemistry and Biotechnonology*. 182:181-196.
- Moreno-Hernández, J., Hernández-Mancillas, X., Coss, L., Bañuelos-Pérez, M., Salazar-Leyva, J., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V., Mazorra-Manzano, M. (2017 b). Caracterización parcial de la actividad coagulante y caseinolítica de las proteasas del fruto de “Aguama” (*Bromelia pinguin* L.). *Revista de ciencias biológicas y de la salud*. Vol. XIX (2): pp. 19-24.

- Moyano D. D., M. Osorio R., E. Murillo P., W. Murillo A., J. Solanilla D., J. Méndez A. & J. Aristizabal S. (2012) Evaluación de parámetros bromatológicos, fitoquímicos y funcionalidad antioxidante de frutos de *Bromelia karatas* (Bromeliaceae). *Vitae* 19:S439-S441.
- Nair I.C., Jayachandran K. (2019) Aspartic Proteases in Food Industry. In: Parameswaran B., Varjani S., Raveendran S. (eds) Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability. *Springer, Singapore*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_3
- Naturalista. <https://www.naturalista.mx/taxa/154798-Bromelia-pinguin>. Revisado: 15/05/2019.
- Natalucci, C., Payrol, A., Pardo, M., Martínez, M., Hernández, A., Caffini, M. (2009). Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales. Capítulo 4. Fuentes naturales de fitoproteasas. *Proteasas de Bromeliaceae. Publisher: Impreso en Mariscal & Asociados, Buenos Aires; Argentina, Editors: Buenos Aires. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED*, pp.41-50.
- Nongonierma, A. B. & FitzGerald, R. J. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction. *International Dairy Journal*, 32, 33–39.
- Ogawa, M. H., Portier, R. J., Moody, M. W., Bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N. (2004). Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum *Pogonia cromis* and sheepshead seabream *Archosargus probatocephalus*. *Food Chemistry*, 88, 495–501.
- Ogino, H., & Ishikawa, H. (2001). Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 109–116.
- Panesar, P., J. Kennedy, D. Gandhi and K. Bunko. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105: 1-14.

- Pardo, M. F., López, L. M. I., Canals, F., Avilés, F. X., Natalucci, C. L., & Caffini, N. O. (2000). Purification of Balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3795–3800.
- Parra-Huertas, R. (2009). Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 62(1): 4967-4982. 2009. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>
- Payrol, Miranda, Castillo, & Redondo. (2001). Ácidos carboxílicos del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón) por HPLC. *SciELO Cuba*, 35(2), 122-125. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475152001000200008
- Payrol, J., D. M. González M., A. Meneses, M. E. de la Cruz, F. Banze, M. Miranda M. y O. Ros L. (2005 a) Determinación de parámetros farmacognósticos y bromatológicos y evaluación de la actividad antiparasitaria de una preparación obtenida del fruto de *Bromelia pinguin* L. que crece en Cuba. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 24:377-382.
- Payrol, J., W.D. Obregón & N.O. Caffini (2005 b) Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit, *Fitoterapia* 76: 540-8.
- Payrol, J. Obregón, W., Trejo, S., Caffini, N. (2007). Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *Protein Journal* 27:88–96.
- Payrol, J., Obregón, W., Trejo, S., & Caffini, N. (2008). Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *The Protein Journal*, 27, 88–96.
- Pérez, A. Carvajal, C. Trejo, S. Torres, M. J. Martín, M. I., Lorenzo, J. C., Naztalucci, C. Henández, M. (2010). Penduliflorain I: A cysteine Protease Isolated from *Hohenbergia peduliflora* (A. Rich) Mez (Bromeliaceae). *Protein journal*. 29: 225-233.

- Piccolomini, A., Iskandar, M., Lands, L., & Kubow, S. (2012). High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. *Food & Nutrition Research*, 56(1), 17549. doi:10.3402/fnr.v56i0.17549
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306–1314.
- Pío-León, J., López-Angulo, G., Paredes-López, O., Uribe-Beltrán, M. (2009). Physicochemical, Nutritional and Antibacterial Characteristics of the Fruit of *Bromelia pinguin* L. *Plant Foods from Human Nutrition*. 64: 3. Pp 181-187.
- Poveda E. & Elpidia. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 40(4), 397-403. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>
- Powers JC, Asgian JL, Ekici OD & James KE. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical Reviews*. 102: 4639–4750.
- Praxedes-García, P., Cruz-Silva, I., Gozzo, A. J., Abreu Nunes, V., Torquato, R. J., Tanaka, A. S., Figueiredo-Ribeiro, R., Gonzalez, Y. G., & Araújo, M. (2012). Biochemical aspects of a serine protease from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) seeds: a potential tool to access the mobilization of seed storage proteins. *The Scientific World Journal*, 2012, 562715. <https://doi.org/10.1100/2012/562715>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698
- Raimbault, A.-K., Zuily-Fodil, Y., Soler, A., & Cruz de Carvalho, M. H. (2013). A novel aspartic acid protease gene from pineapple fruit (*Ananas comosus*): Cloning, characterization and relation to

postharvest chilling stress resistance. *Journal of Plant Physiology*, 170(17), 1536–1540.
doi:10.1016/j.jplph.2013.06.007

Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J., Barrett, A. J. (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 36, D320– D325.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids. Res* 2010; 38: D227–33.

Rawlings, N.D.; Waller, M.; Barrett, A.J.; Bateman, A. (2014). MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*. 2014, 42, D503–D509.
[CrossRef] [PubMed]

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A. & Finn, R.D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*. 46, D624-D632.

Reddy, A., Schneemann, A. & Johnson, J.E. (2004). Nodavirus endopeptidase. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edn (Barrett, A., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. eds), p.197-201, Elsevier, London.

Rocha GF, Kise F, Rosso AM, Parisi MG (2017) Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa origanifolia* fruits. *Food Chemistry*. 237:350–355.

Ruiz-Ruiz, C., Ramón-Sierra, J., Arias-Argaez, C., Magaña-Ortiz, D., & Ortiz-Vázquez, E. (2016). Antibacterial activity of proteins extracted from the pulp of wild edible fruit of *Bromelia pinguin* L. *International Journal of Food Properties*, 20(1), 220–230.
doi:10.1080/10942912.2016.1154572

Rutherford, S. M., & Gilani, G. S. (2009). Amino acid analysis. *Current Protocols in Protein Science*, 58(11.9). 11.9.1–11.9.37.

- Sadat, L., C. Cakir-Kiefer, M.-A. N'Negue, J.-L. Gaillard, J.-M. Girardet, and L. Miclo. 2011. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. *International Dairy Journal*. 21:214–221. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.011>.
- Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P. & Sharifi-Rad, J. (2018). antioxidants: Positive or Negative Actors?. *Biomolecules*, 8(4), 124. doi:10.3390/biom8040124
- Schaller, A (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220:183–197.
- Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. & Baumeister, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* (1995) 268, 579-582.
- Shah, M.A., Mir, S.A. & Paray, M.A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science. & Technology*. 94: 5. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3>.
- Shah M.A., Mir S.A. (2019) Plant Proteases in Food Processing. In: Mérillon JM., Ramawat K. (eds) Bioactive Molecules in Food. Reference Series in Phytochemistry. *Springer, Cham*
- Shaw, E. (1967). [80] Site-specific reagents for chymotrypsin and trypsin. *Enzyme Structure*, 677–686. doi:10.1016/s0076-6879(67)11084-7
- Silva, C. M., dos Santos da Fonseca, R. A., & Prentice, C. (2014). Comparing the hydrolysis degree of industrialization byproducts of Withemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) using microbial enzymes. *International Food Research Journal*, 21(5), 1757–1761.
- Sokol, C. L., Barton, G. M., Farr, A. G., & Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature immunology*, 9(3), 310–318. <https://doi.org/10.1038/ni1558>
- Sullivan, G.A. y Calkins, C.R. (2010). Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*. 85: 730-734.
- Sumantha, A, Larroche C. & Pandey A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol Biotechnol* 44(2):211–220.

- Sun, Q., Zhang, B., Yan, Q.-J., & Jiang, Z.-Q. (2016). Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. *Food Chemistry*, 213, 708–713. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.029. url to share this paper: [sci-hub.do/10.1016/j.foodchem.2016.07.029](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.029)
- Suzuki H, Xia Y, Cameron R, Shadle G, Blount J., Lamb, C. & Dixon, R. (2003). Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *Journal of Experimental Botany*. 55:169–79
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1–11.
- Terra W. & Ferreira, C. 2012. 11: Biochemistry and Molecular Biology of Digestion, in: Gilbert, L.I. (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Academic Press Inc., San Diego, CA, E.U. pp. 365-418.
- Theodorou, L. G., Bieth, J. G., & Papamichael, E. M. (2007). The catalytic mode of cysteine proteinases of papain (C1) family. *Bioresource Technology*, 98(10), 1931–1939. doi:10.1016/j.biortech.2006.07.037
- Toro-Goyco E, A. Marezki & M.L. Matos (1968) Isolation, purification and partial characterization of pinguinain, the proteolytic enzyme from *Bromelia pinguin* L., *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 126: 91-104.
- Toro-Goyco E, I. Rodríguez-Costas & H. Ehrig. (1980) Structural studies on pinguinain. Changes induced by carboxamidomethylation, *Biochimica et Biophysica Acta* 622: 151-9.
- Tripathi, P. Tomar, R. and Jagannadham, M. (2011). Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chemistry*, vol. 125, no. 3, pp. 1005–1012, 2011.
- Udenigwe CC, Aluko RE. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 71:R11–R24)

- Vairo-Cavalli S, Silva SV, Cimino C, Malcata FX & Priolo N. (2008). Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chem*; 106 (3): 997- 1003. 10.
- Van der Hoorn, R. A. L. (2008). Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 191–223. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835
- Vecteezy. (2020). <https://www.vecteezy.com/free-vector/plant-cell>. Consultado: 24/11/2020.
- Villamil, O., Váquiro, H., & Solanilla, J. F. (2017). Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 224, 160–171. doi:10.1016/j.foodchem.2016.12.057.
- Villanueva-Alonzo, G. Polanco-Hernández. G., Lizama-Uc, G., Acosta-Viana, K., Alvarado-Segura, A. (2019). Proteolytic activity of wild fruits of *Bromelia karatas* L. of Yucatán, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* | Vol. XXV, núm. 2.
- Xia, Y.; Suzuki, H.; Borevitz, J.; Blount, J.; Guo, Z.; Patel, K.; Dixon, R.A.; Lamb, C. An. (2004). Extracellular Aspartic Protease Functions in Arabidopsis Disease Resistance Signaling. *EMBO Journal* 2004, 23, 980–988.
- Yasumitsu, H. (2017). Serine Protease Zymography: Low-Cost, Rapid, and Highly Sensitive RAMA Casein Zymography. *Methods in Molecular Biology*, 13–24. doi:10.1007/978-1-4939-7111-4_2
- Zarei M, Ebrahimpour A, Abdul-Hamid A, Anwar F, Saari N (2012) Production of defatted palm kernel cake protein hydrolysate as a valuable source of natural antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 13:8097–8111.
- Zhang, Q., Chen, Q.-H., & He, G.-Q. (2019). Effect of Ultrasonic-Ionic Liquid Pretreatment on the Hydrolysis Degree and Antigenicity of enzymatic Hydrolysates from Whey Protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 104926. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104926

Zheng, L., Lin, L., Su, G., Zhao, Q., & Zhao, M. (2015). Pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: Its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides. *Food Research International*, 76, 359–365.

Zhidong, L., G. Benheng, C. Xuezhong, L. Zhenmin, D. Yun, H. Hongliang, & R. Wen. (2013). Optimisation of hydrolysis conditions for antioxidant hydrolysate production from whey protein isolates using response surface methodology. *Journal of Agriculture and Food Research*. 52:53–65.

ABREVIATURAS

EC: Extracto crudo de fruto de Aguama

EROS: Especies reactivas de oxígeno

ESP: Extracto semipurificado de aguama

FRAP: potencia antioxidante reductora férrica

GH: Grado de hidrólisis

HP: Hidrolizado proteínico

PE: Precipitado de etanol

S4E: Sobrenadante de 4 volúmenes de etanol

SE: Sobrenadante de etanol de fruto de Aguama

ANEXOS

Curva Estándar de Proteína con Albúmina de Suero Bovino (BSA)

Tabla VI. Absorbancia de las concentraciones de proteína (BSA), R2= 0.9767.

[BSA] mg/mL	ABSORBANCIA	Desviación estándar
0	0	0.0059
0.1	0.319	0.0026
0.2	0.472	0.0095
0.3	0.669	0.0316
0.4	0.821	0.0335
0.5	0.960	0.0185
0.6	1.082	0.0104

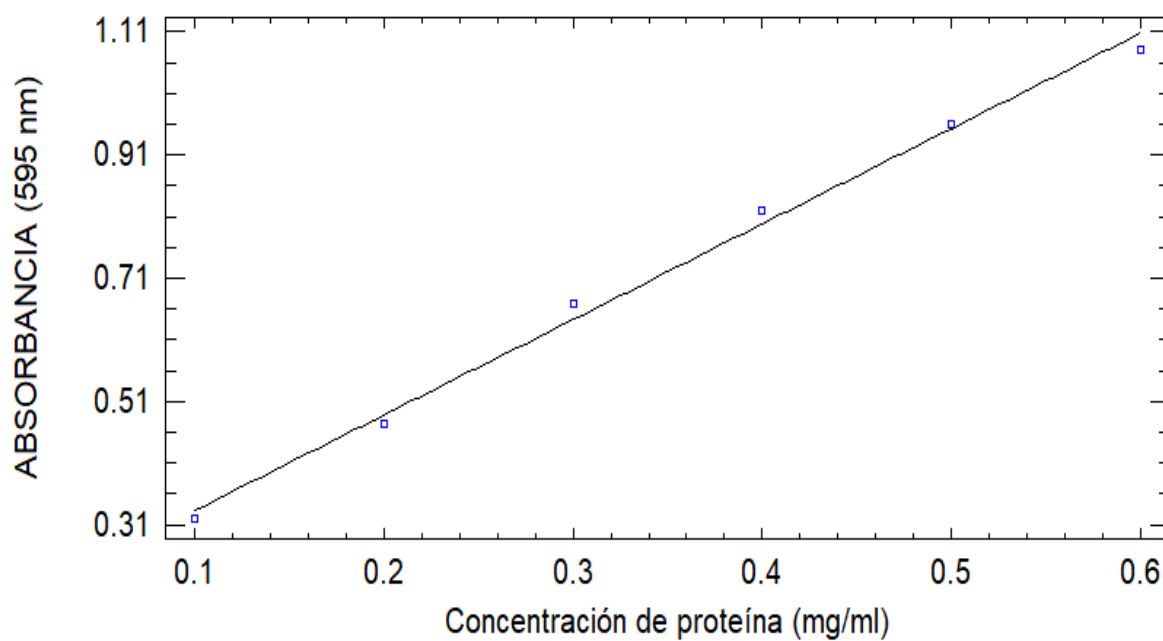


Figura 19. Curva estándar de concentración de proteína (BSA).